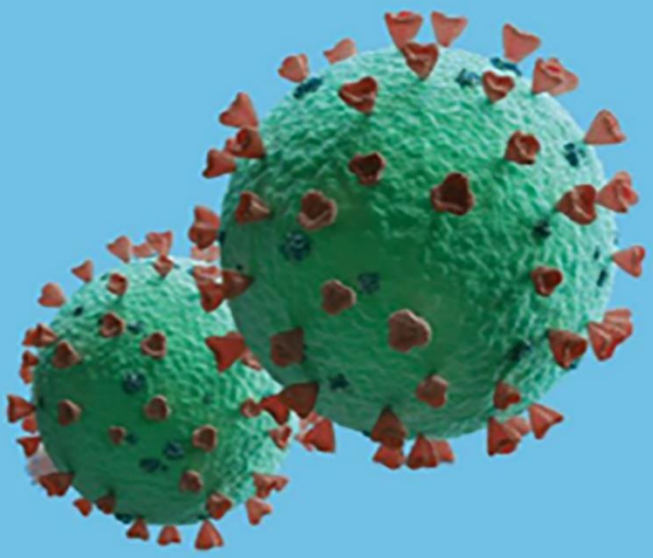
VACCINO COVID-19: LE PIATTAFORME INNOVATIVE A mRNA - PARTE I

DR.SSA LORETTA BOLGAN

Dottore in Chimica e Technologia Farmaceutiche
Dottorato in Scienze Farmaceutiche
Consulente Scientifico
loretta.bolgan@gmail.com



FEDERAZIONE RINASCIMENTO ITALIA

rinascimentoitalia.it

VACCINO COVID-19
LE PIATTAFORME INNOVATIVE – vaccini a mRNA

Sommario

introduzione **2**

vaccini ad acidi nucleici **6**

vaccini a mRNA **6**

tipi di vaccini a mRNA **7**

sviluppo tecnologico **10**

strategie di progettazione per i vaccini a mRNA contro il SARS-COV-2 ..... **11**

sintesi e ottimizzazione dell'mRNA **16**

capping dell'mRNA 18

regioni non tradotte 21

regioni tradotte 27

ottimizzazione della produzione dell'IVT-mRNA **29**

approfondimento il centro germinale (GC) e le cellule T helper follicolari (T_{fh}) **30**

generazione di un IVT-mRNA efficace **37**

tipi di nucleosidi modificati 38

approfondimento nucleosidi modificati in natura ed evoluzione dell'RNA **41**

modifica post-trascrizionale, capping e defosforilazione del 5'-mRNA 48

modificazioni dell'mRNA del vaccino "PFIZER" **50**

approfondimento la sintesi proteica **54**

potenziale disregolazione della sintesi proteica con il vaccino PFIZER **65**

produzione dell'mRNA del vaccino "MODERNA" **71**

produzione secondo le buone pratiche di produzione (GMP) **73**

veicolazione dell'mRNA **76**

approfondimento materiali utilizzati per la veicolazione di mRNA non virale **80**

il liposoma del vaccino PFIZER e MODERNA **89**

miglioramento dell'attività adiuvante dei vaccini a mRNA **91**

impatto dell'IFN di tipo I nella vaccinazione con mRNA **91**

tossicologia dei vaccini a mRNA **95**

approfondimento i meccanismi dell'anafilassi **100**

tossicologia dei liposomi **108**

pseudoallergia non-IgE mediata 108

integrazione nel DNA 111

INTRODUZIONE

I vaccini candidati ad oggi in corso di studio clinico e/o preclinico comprendono una vasta gamma di piattaforme vaccinali: a base di proteine (subunità e particelle simil-virali), a base di virus (vivo attenuato e inattivato) e nuove strategie di rilascio genico ad acido nucleico ingegnerizzato (DNA e RNA) e a vettore virale (replicativo e non replicativo). [1]

Le strategie convenzionali, come i vaccini virali inattivati e attenuati si sono evoluti, grazie all'applicazione delle biotecnologie e nanotecnologie, verso i vaccini di seconda generazione a subunità proteiche e a vettore, fino ai più recenti di terza generazione introdotti per la prima volta per la profilassi dell'infezione da SARS-Cov-2 (vaccini ad acidi nucleici e vaccini a nanomateriali) [2] per superarne gli svantaggi.
I vaccini convenzionali virali e a proteine presentano svantaggi per la sicurezza (ad es. i virus attenuati possono revertire al fenotipo infettivo), protezione limitata e immunogenicità (ad es. il principale svantaggio dei vaccini a subunità è che le proteine o i peptidi isolati sono generalmente immunogeni deboli perché non vengono riconosciuti come modelli molecolari associati ai patogeni (PAMP) e non attivano le risposte immunitarie innate, necessarie per il pieno sviluppo dell'immunità acquisita e devono essere accompagnati da potenti adiuvanti) come già ampiamente discusso nella parte dedicata alle piattaforme tradizionali.

I **vaccini su base genetica** (GBV) comprendono sia i vettori virali che i vaccini ad acidi nucleici, che codificano i geni dell'antigene bersaglio. [3]
La loro efficacia dipende dalla capacità di espressione di tali sequenze geniche in antigeni peptidici che devono essere presentati alle cellule immunitarie per stimolare una risposta immunitaria.

---

[1] Pushparajah D, Jimenez S, Wong S, Alattas H, Nafissi N, Slavcev RA.
Advances in gene-based vaccine platforms to address the COVID-19 pandemic.
Adv Drug Deliv Rev. 2021 Jan 7;170:113-141. doi: 10.1016/j.addr.2021.01.003
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789827/

[2] Li T, Zhang T, Gu Y, Li S, Xia N.
Current Progress and Challenges in the Design and Development of a Successful COVID-19 Vaccine
[published online ahead of print, 2021 Jan 26]. Fundamental Research. 2021;doi:10.1016/j.fmre.2021.01.011
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7835609/

Soleimanpour S, Yaghoubi A.
COVID-19 vaccine: where are we now and where should we go?
Expert Rev Vaccines. 2021 Jan 13. doi: 10.1080/14760584.2021.1875824.
https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14760584.2021.1875824

Dong Y, Dai T, Wei Y, Zhang L, Zheng M, Zhou F.
A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates.
Signal Transduct Target Ther. 2020 Oct 13;5(1):237. doi: 10.1038/s41392-020-00352-y.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7551521/

Wallis J, Shenton DP, Carlisle RC.
Novel approaches for the design, delivery and administration of vaccine technologies.
Clin Exp Immunol. 2019;196(2):189-204. doi:10.1111/cei.13287
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6468175/

Chakraborty S, Mallajosyula V, Tato CM, Tan GS, Wang TT.
SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: where do we stand
[published online ahead of print, 2021 Jan 19]. Adv Drug Deliv Rev. 2021;S0169-409X(21)00024-7. doi:10.1016/j.addr.2021.01.014
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7816567/

Liu MA. A
Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies.
Vaccines (Basel). 2019;7(2):37. Published 2019 Apr 24. doi:10.3390/vaccines7020037
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6631684/

[3] Prüβ BM.
Current State of the First COVID-19 Vaccines.
Vaccines (Basel). 2021;9(1):30. Published 2021 Jan 8. doi:10.3390/vaccines9010030
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7826947/

Dal punto di vista regolatorio, i vaccini a vettori virali sono stati già approvati dalle autorità sanitarie per uso terapeutico [4], mentre i primi due vaccini a mRNA (Comirnaty e mRNA-1273) contro la COVID-19 sono stati recentemente approvati dall'FDA per l'uso d'emergenza e dall'EMA con autorizzazione condizionale *, [5] ed entrambi non sono mai stati testati sull'uomo come vaccini ad uso profilattico delle malattie infettive [6].

* L'EMA nella sezione "Questions and Answers: Conditional Marketing Authorisation of COVID-19 Vaccines in the EU" (update 21.01.2021) [7] descrive la differenza tra autorizzazione condizionale alla commercializzazione (CMA) e l'autorizzazione per l'uso d'emergenza (EUA).
La tematica verrà discussa più in dettaglio nella terza parte dedicata all'iter di registrazione dei vaccini COVID-19.

*Un'**autorizzazione condizionale all'immissione in commercio** (CMA) segue una procedura controllata e robusta che fornisce garanzie che le autorizzazioni per l'uso d'emergenza non potrebbero fare.*
In realtà, un'autorizzazione all'uso di emergenza non è un'autorizzazione del vaccino ma un'autorizzazione all'uso temporaneo del vaccino non autorizzato.
La CMA garantisce che tutta la farmacovigilanza, i controlli di produzione, inclusi i controlli sui lotti per i vaccini e altri obblighi post-approvazione, si applichino in modo legalmente vincolante e siano valutati dai comitati scientifici dell'EMA su base continua e che possa essere intrapresa un'azione normativa, se necessario. In particolare:

- *Garantisce un monitoraggio rigoroso, attraverso il sistema di farmacovigilanza dell'UE, della sicurezza del medicinale in tutta l'UE. Inoltre, potrebbero esserci misure speciali per raccogliere e valutare tutte le nuove informazioni che emergono rapidamente al fine di soddisfare le esigenze specifiche della vaccinazione pandemica e di massa.*
- *Garantisce il monitoraggio della sicurezza post-autorizzazione e consente la raccolta di dati aggiuntivi in modo strutturato. Un piano di gestione del rischio (RMP) è implementato dalla società come concordato prima dell'autorizzazione, che costituisce un elemento esecutivo dell'autorizzazione.*

(…)

[4] Rauch S, Jasny E, Schmidt KE, Petsch B.
New Vaccine Technologies to Combat Outbreak Situations.
Front Immunol. 2018 Sep 19;9:1963. doi: 10.3389/fimmu.2018.01963.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7816567/

[5] Mahase E.
Covid-19: UK approves Pfizer and BioNTech vaccine with rollout due to start next week.
BMJ. 2020 Dec 2;371:m4714. doi: 10.1136/bmj.m4714.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33268330/

Oliver SE, Gargano JW, Marin M, et al.
The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine - United States, December 2020.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2020;69(50):1922-1924. Published 2020 Dec 18. doi:10.15585/mmwr.mm6950e2
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7745957/

O. of the Commissioner
Pfizer-BioNTech COVID-19 Vaccine
FDA (2020)
https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/pfizer-biontech-covid-19-vaccine,
Accessed 16th Dec 2020

Moderna Announces FDA Authorization of Moderna COVID-19 Vaccine in the U.S,
Moderna, Inc. (2019)
https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-fda-authorization-moderna-covid-19-vaccine-us,
Accessed 21st Dec 2020

Oliver SE et al
The Advisory Committee on Immunization Practices' Interim Recommendation for Use of Moderna COVID-19 Vaccine - United States, December 2020.
MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2021 Jan 1;69(5152):1653-1656. doi: 10.15585/mmwr.mm695152e1. PMID: 33382675.
https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/wr/mm695152e1.htm?s_cid=mm695152e1_w

[6] Abbasi J.
COVID-19 and mRNA Vaccines-First Large Test for a New Approach.
JAMA. 2020 Sep 22;324(12):1125-1127. doi: 10.1001/jama.2020.16866.
https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2770485

[7] https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/en/qanda_20_2390

*Un'**autorizzazione all'uso d'emergenza** (EUA) consente l'uso temporaneo di un medicinale in condizioni specifiche, purché si applichino circostanze di emergenza. Il medicinale, tuttavia, rimane senza licenza e non può essere immesso sul mercato, contrariamente ad un'autorizzazione all'immissione in commercio (condizionale).*
Sebbene le autorizzazioni per l'uso di emergenza siano consentite dalla legislazione farmaceutica dell'UE, l'uso di un vaccino per il quale uno Stato membro ha rilasciato tale autorizzazione è limitato allo Stato membro che lo autorizza solo sotto la sua responsabilità. Anche alcuni paesi terzi stanno utilizzando procedure simili per consentire l'uso temporaneo di emergenza dei vaccini COVID-19 prima dell'autorizzazione.

l'Unione Europea ha programmato la produzione e la commercializzazione di 2,3 miliardi di dosi, sulla base degli accordi con sei diverse società:

- BioNTech-Pfizer (Comiranty) fino a 600 milioni di dosi;
- AstraZeneca (COVID-19 Vaccine AstraZeneca) fino a 400 milioni di dosi;
- Sanofi-GSK fino a 300 milioni di dosi;
- Johnson and Johnson fino a 400 milioni di dosi;
- CureVac fino a 405 milioni di dosi;
- Moderna (COVID-19 Vaccine Moderna) fino a 160 milioni di dosi.

Inoltre, la Commissione ha concluso gli accordi con Novavax, per un massimo di 200 milioni di dosi, e con Valneva, per un massimo di 60 milioni di dosi.
I vaccini prodotti da tre di queste aziende sono stati approvati dalla Commissione per essere immessi sul mercato con autorizzazione condizionale: BioNTech/Pfizer (21 dicembre 2020), Moderna (6 gennaio 2021) e AstraZeneca (29 gennaio) a seguito della valutazione positiva dell'EMA sulla sua sicurezza ed efficacia.

Nessun altro produttore di vaccini ha formalmente richiesto un'autorizzazione all'immissione in commercio all'EMA. Per accelerare il processo, l'EMA ha avviato una revisione continua del vaccino prodotto da Johnson and Johnson.

Aggiornamento
https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines

Per garantire la disponibilità delle informazioni più recenti, il WHO aggiorna la tabella due volte a settimana (martedì e venerdì, 17:00 CET) mediante la ricerca, la raccolta e il controllo incrociato dei dati da più fonti come lo strumento di mappatura del vaccino Cochrane, Pubmed, ClinicalTrials. gov, WHO ICTRP e da una rete di ricercatori e industria per nuovi vaccini candidati e screening di studi registrati per informazioni cliniche.

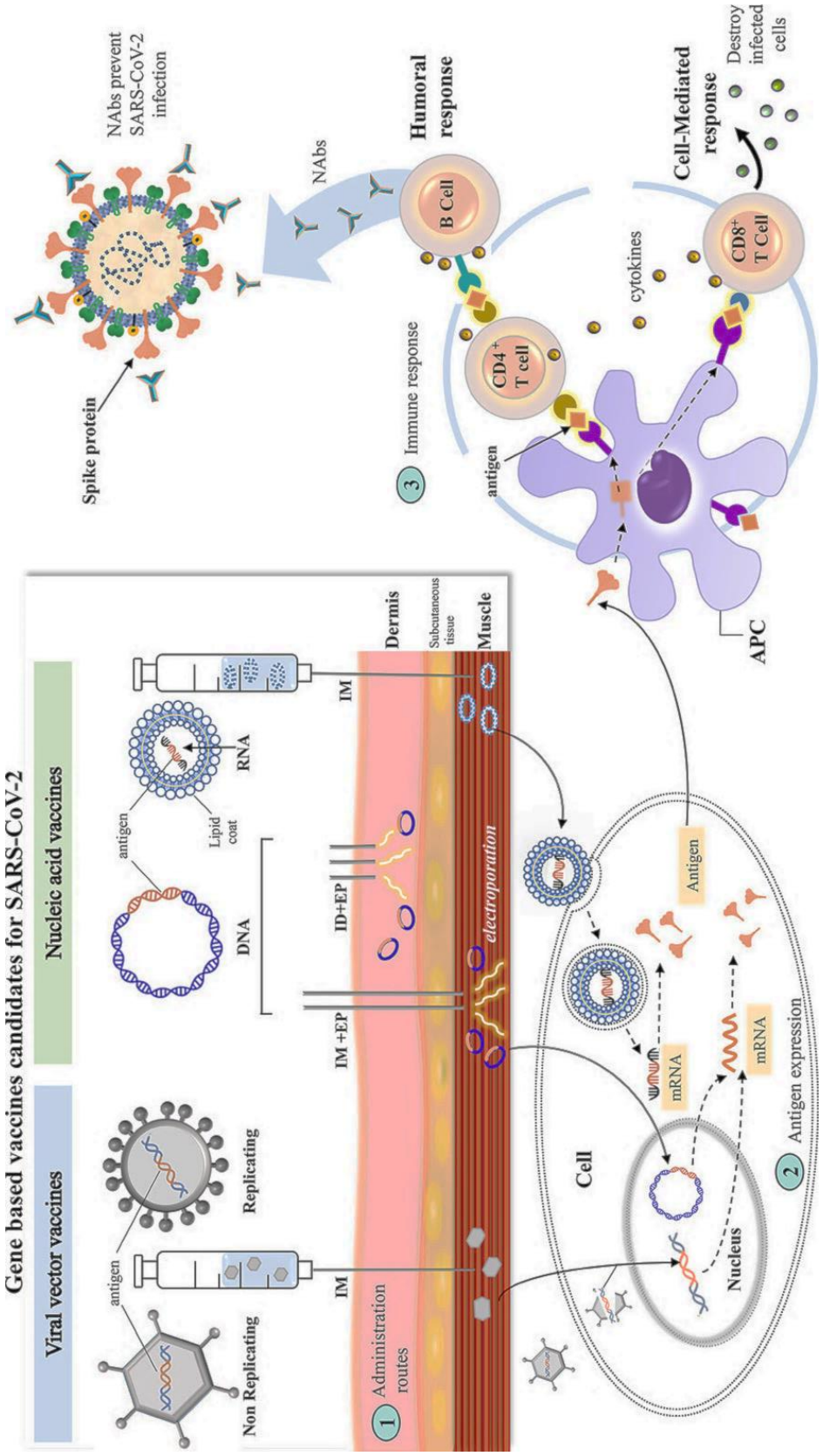
Il progressivo interesse per lo sviluppo di GBV è attribuito ad alcuni vantaggi significativi rispetto alle piattaforme di vaccini convenzionali, quali una maggiore sicurezza e stabilità, una potente immunità cellulo-mediata, una maggiore specificità, facilità di manipolazione, bassi costi di produzione e sviluppo più semplice e rapido.[8]

[8] Lim M, Badruddoza AZM, Firdous J, et al.
Engineered Nanodelivery Systems to Improve DNA Vaccine Technologies.
Pharmaceutics. 2020;12(1):30. Published 2020 Jan 1. doi:10.3390/pharmaceutics12010030
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7022884/

Johansson DX, Ljungberg K, Kakoulidou M, Liljeström P.
Intradermal electroporation of naked replicon RNA elicits strong immune responses.
PLoS One. 2012;7(1):e29732. doi:10.1371/journal.pone.0029732
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3251598/

Rodríguez-Gascón A, del Pozo-Rodríguez A, Solinís MÁ.
Development of nucleic acid vaccines: use of self-amplifying RNA in lipid nanoparticles.
Int J Nanomedicine. 2014;9:1833-1843. Published 2014 Apr 10. doi:10.2147/IJN.S39810
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3986288/

Nei seguenti capitoli si discuteranno, in sezioni distinte, i vari tipi di GBV, il loro meccanismo d'azione, il metodo di preparazione e le criticità relative alla qualità, efficacia, sicurezza, e la stabilità allo stoccaggio.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7789827/

Geall AJ, Mandl CW, Ulmer JB.
RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines.
Semin Immunol. 2013 Apr;25(2):152-9. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.001. Epub 2013 Jun 2. PMID: 23735226.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23735226/

VACCINI AD ACIDI NUCLEICI

Vaccini a mRNA

- mRNA -1273 / *Moderna + National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID)*
- Comirnaty- BNT162 (3 LNP-mRNAs) / *BioNTech + Fosun Pharma; Jiangsu Provincial Center for Disease Prevention and Control + Pfizer*
- CVnCoV Vaccine / *CureVac AG*
- ARCT-021 / *Arcturus Therapeutics*
- LNP-nCoVsaRNA / *Imperial College London*
- SARS-CoV-2 mRNA vaccine / *Shulan (Hangzhou) Hospital + Center for Disease Control and Prevention of Guangxi Zhuang Autonomous Region*
- ChulaCov19 mRNA vaccine / *Chulalongkorn University*

Glossario [9]

3'-UTR mRNA: regione codificante non proteica importante per l'espressione della proteina e la stabilità dell'mRNA.

5'-UTR mRNA: regione codificante non proteica importante per il riconoscimento del complesso ribosoma-mRNA e l'inizio della traduzione, l'espressione della proteina e la stabilità dell'mRNA.

Cellule presentanti l'antigene (APC): sono i principali attori nel mediare la risposta immunitaria adattativa, in quanto elaborano e presentano gli antigeni ai linfociti T. Esempi di APC sono le cellule dendritiche (DC), i macrofagi e le cellule B.

RNA a doppio filamento (dsRNA): queste molecole sono riconosciute come PAMPs da differenti PRR nel citoplasma di cellule di mammifero. Le molecole di dsRNA sono normalmente il risultato di un'infezione virale, sebbene alcuni dsRNA endogeni possano essere trovati principalmente nel nucleo cellulare.

miRNA: molecole di RNA di 19-22 nucleotidi di lunghezza. Possono agire come regolatori post-trascrizionali, inibendo la traduzione degli RNA.

mRNA trascritto in vitro (IVTmRNA): metodo per produrre mRNA utilizzando il DNA come stampo. È prodotto da una reazione enzimatica in cui il DNA contiene il promotore per una RNA-polimerasi DNA-dipendente e tutte le sequenze ad hoc. Successivamente, la reazione viene trattata con DNAsi che degradano lo stampo di DNA, e purificata per ottenere l'mRNA puro.

Open reading frame (ORF): corrisponde alla sequenza che codifica l'antigene, inizia con un codone di inizio (AUG) e termina con un codone di stop. Per un inizio di traduzione ottimale, l'ORF dovrebbe contenere una sequenza di Kozak ottimale (GCC- (A/G) - CCAUGG) che circonda il codone AUG di inizio.

Pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP): molecole che si trovano in diversi agenti patogeni e non si trovano naturalmente nell'ospite. Esempi sono il dsRNA, l'RNA 5'-trifosfato e senza cappuccio, l'LPS e la flagellina.

Recettori di riconoscimento del pattern (PRR): parte del sistema immunitario innato cellulare. Questi recettori sono invariabili e codificati nella linea germinale. I PRR si trovano nel citosol (recettore RIG-like, recettore Nod-like) o nella membrana extracellulare e nelle vescicole intracellulari (TLR, recettori della lectina di tipo C). La loro funzione è riconoscere e rilevare i PAMPs per avviare la risposta immunitaria.

Coda Poli-A (poly (A)): conferisce stabilità all'mRNA e la sua lunghezza è stata correlata all'aumento positivo dell'emivita dell'mRNA.

[9] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, Verrier B.
Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response.
Trends Mol Med. 2020 Mar;26(3):311-323. doi: 10.1016/j.molmed.2019.10.002. Epub 2019 Nov 5.
https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8

RNA a filamento singolo (ssRNA): è rappresentato nella cellula dall'mRNA, rRNA, RNA piccolo interferente (si), RNA lungo non codificante e tRNA. L'ssRNA può formare strutture secondarie di dsRNA intramolecolari come un'elica, una forcina o pseudo-nodi che innescano i PRR.

Interferoni di tipo I (IFN): insieme di citochine che raggruppano i più importanti interferoni IFN-α, IFN-β, ma anche IFN-ε, -k, -τ, -δ, -ζ, -ω, -v. Sono prodotti come risposta antivirale e sono responsabili dell'attivazione di centinaia di ISG (geni stimolati dagli IFN), fornendo uno stato cellulare antivirale delle cellule stesse (autocrino) e circostanti (paracrino), che include il blocco della traduzione dell'mRNA e la sua degradazione.

APPROFONDIMENTO

LE BASI DELLA GENETICA UMANA
Metabolismo del DNA
Processamento degli RNA messaggeri
L'mRNA ED IL CODICE GENETICO

TIPI DI VACCINI A mRNA

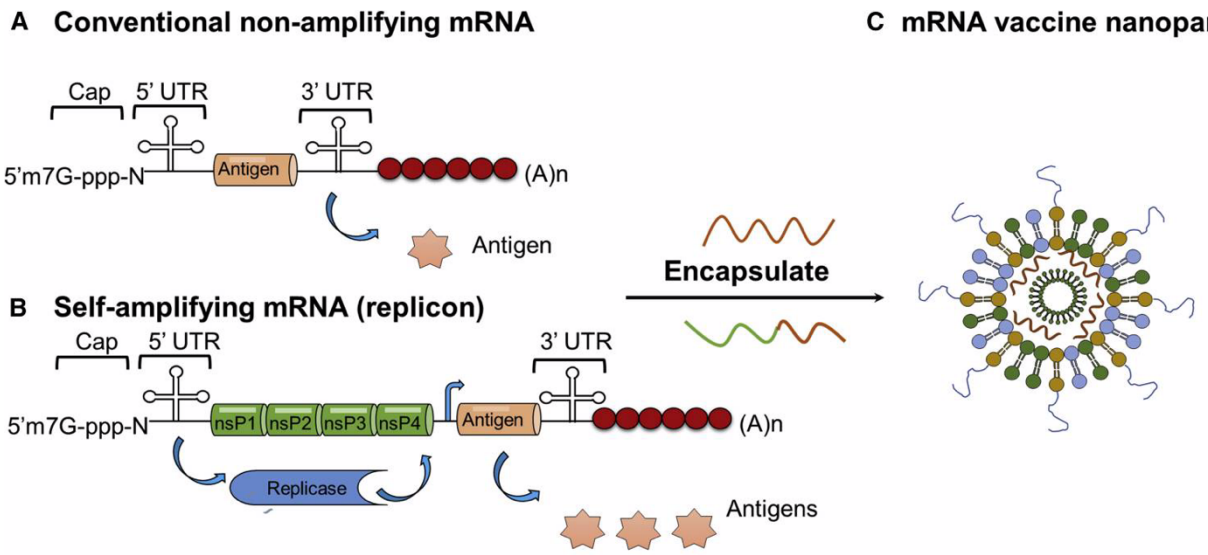
L'mRNA è il passaggio intermedio tra la traduzione del DNA che codifica per le proteine e la produzione di proteine da parte dei ribosomi nel citoplasma.
Sono attualmente studiati come vaccini due principali tipi di costrutti a RNA:

- l'mRNA non replicante
- RNA auto-amplificante di derivazione virale.

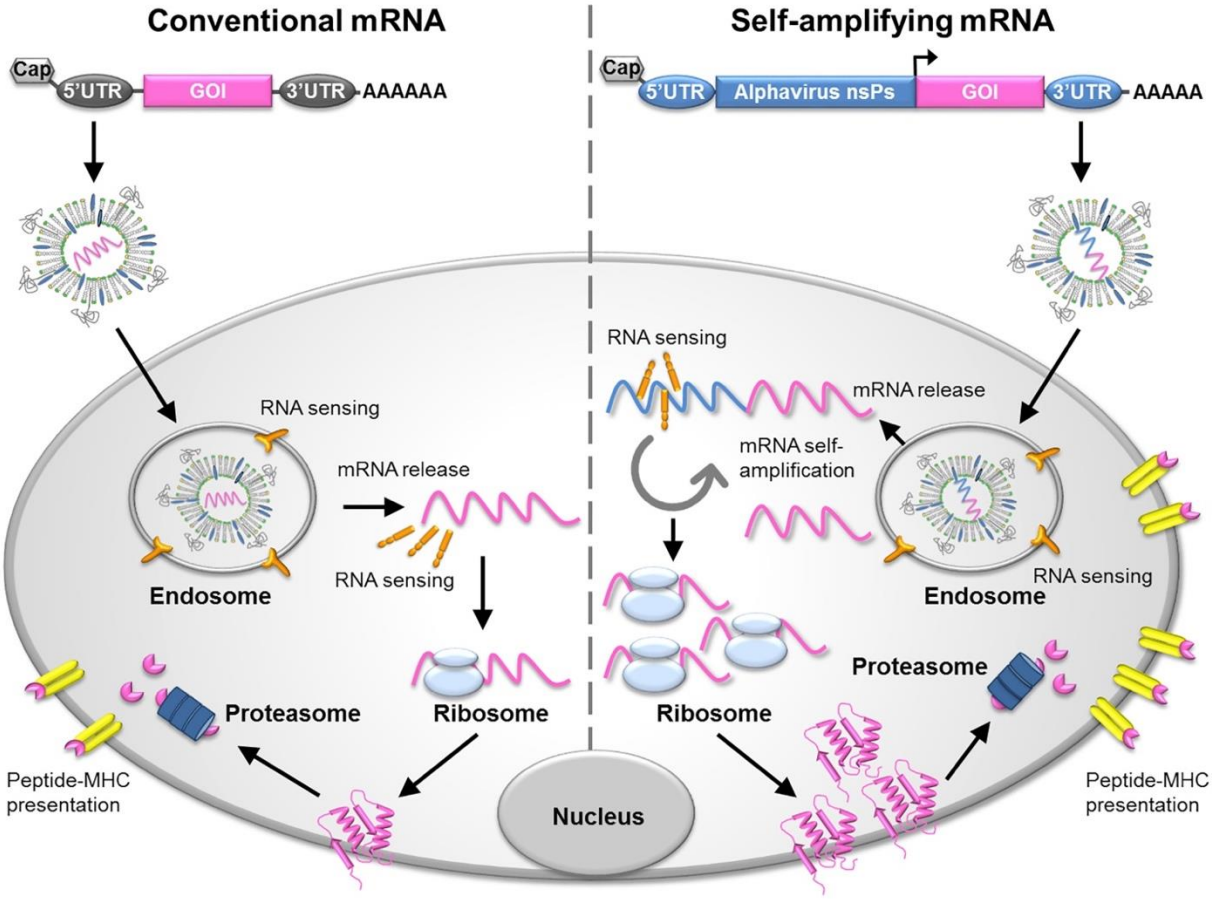
I vaccini convenzionali a base di mRNA codificano l'antigene di interesse e contengono regioni 5' e 3' non tradotte (UTR), mentre gli RNA autoamplificanti codificano non solo l'antigene ma anche il meccanismo di replicazione virale che consente di prolungare la breve emivita dell'mRNA, aumentare l'amplificazione dell'RNA intracellulare e di conseguenza portare ad un'abbondante espressione proteica.

Il sistema autoreplicante (saRNA) fa uso di elementi di alfavirus, che sono virus a RNA a filamento positivo, non segmentati.
Il genoma alfavirale è diviso in due ORF: il primo codifica le proteine per l'RNA-polimerasi RNA-dipendente (replicasi) e il secondo codifica per le proteine strutturali. Nei costrutti dei vaccini a saRNA, l'ORF che codifica per le proteine strutturali virali viene sostituito con qualsiasi antigene di scelta, mentre la replicasi virale rimane parte integrante del vaccino e guida l'amplificazione intracellulare dell'RNA dopo l'immunizzazione. [10]

[10] Ljungberg K, Liljeström P.
Self-replicating alphavirus RNA vaccines.
Expert Rev Vaccines. 2015 Feb;14(2):177-94. doi: 10.1586/14760584.2015.965690. Epub 2014 Oct 1.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25269775/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/
Vaccino a mRNA non amplificante e autoamplificante
(A) Struttura schematica del vaccino a mRNA non amplificante convenzionale.
(B) Struttura schematica del vaccino a mRNA autoamplificante (replicone), che contiene gli antigeni codificanti la sequenza e le proteine non strutturali che facilitano il capping e la replicazione dell'RNA.
(C) Un'illustrazione del vaccino mRNA o del replicone incapsulato in nanoparticelle per migliorare le prestazioni in vivo.



https://www.cell.com/molecular-therapy-family/molecular-therapy/fulltext/S1525-0016(19)30041-3
Rappresentazione schematica dei vaccini a mRNA e meccanismo di espressione dell'antigene
L'mRNA convenzionale trasporta la sequenza codificante dell'antigene di interesse (GOI) affiancata da UTR 5'e 3', una struttura terminale 5'-cap e una coda 3' poliA. Una volta trasportato nella cellula e rilasciato dall'endosoma nel citoplasma, l'mRNA viene tradotto immediatamente. L'mRNA autoamplificante è spesso derivato dal genoma di virus a RNA a filamento singolo con senso positivo, come gli alfavirus. Codifica sia l'antigene di interesse che le proteine virali non strutturali (nsPs) necessarie per l'amplificazione dell'RNA intracellulare e per alti livelli di espressione dell'antigene. L'mRNA autoamplificante può dirigere la sua auto-amplificazione per generare intermedi di RNA e molte copie di mRNA subgenomico codificanti per l'antigene, producendo alti livelli dell'antigene codificato. Sia i vaccini mRNA convenzionali che quelli autoamplificanti richiedono un sistema di rilascio per l'assorbimento cellulare, solitamente per endocitosi, che è seguito dal rilascio del carico di mRNA dall'endosoma nel citosol, dove si verificano la traduzione e l'elaborazione delle proteine per la presentazione dell'MHC. Una volta trasferito nella cellula, l'mRNA viene quasi immediatamente rilevato dai recettori di riconoscimento del pattern (PRR) nell'endosoma e nel citoplasma. I PRR come i recettori Toll-like TLR3, TLR7 e TLR8 sono localizzati nell'endosoma e i sensori citosolici come RIG-I, MDA5, PKR e OAS riconoscono anche gli RNA a doppio filamento e singolo filamento nel citoplasma. GOI, gene di interesse; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità; nsPs, proteine non strutturali.

I vaccini a mRNA contenenti la spike del SARS-Cov-2 commercializzati dalla Pfizer e Moderna sono di tipo non amplificante e contengono la struttura di base dell'mRNA, con un frame di lettura aperto (ORF) che codifica per l'antigene desiderato.

I vantaggi principali dei vaccini con mRNA non replicante includono:

(1) la dimensione relativamente piccola dell'mRNA rispetto a un vaccino autoamplificante (~2–3 kb contro ~10 kb);
(2) l'assenza di proteine aggiuntive (rispetto al sistema virale), riducendo al minimo la possibilità di suscitare interazioni immunogeniche indesiderate con l'ospite. A ciò si aggiunge una ridotta permanenza nel citoplasma che rende trascurabile la possibilità che si formi DNA retrotrascritto.
(3) sono relativamente facili da espandere e produrre, consentendo un rapido utilizzo in caso di focolaio;
(4) una facile ingegnerizzazione delle sequenze per migliorare le prestazioni del vaccino e ridurre al minimo gli effetti indesiderati.

Il più grande ostacolo all'impiego dei vaccini con mRNA è la necessità della veicolazione intracellulare.
Le modifiche chimiche e l'ingegnerizzazione delle sequenze hanno migliorato sia la traduzione che la durata di conservazione dei vaccini a mRNA sintetico, mentre la veicolazione dell'mRNA è stata ottenuta attraverso l'uso di lipidi (liposomi) o materiali a base di polimeri.[11]

[11] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG.
Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery.
Mol Ther. 2019;27(4):710-728. doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.012
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/

SVILUPPO TECNOLOGICO

Dal punto di vista tecnologico, come già detto, i vaccini a mRNA sono stati sviluppati per superare i limiti dei vaccini tradizionali, rispetto ai quali hanno dimostrato di possedere molti vantaggi specifici.

Prima di tutto, l'mRNA può teoricamente soddisfare tutti i requisiti per codificare l'informazione genetica ed esprimere tutti i tipi di proteine.
L'efficienza per lo sviluppo del vaccino può essere ottimizzata modificando la sequenza dell'mRNA, che è un modo più conveniente rispetto ad altri tipi di modifica per la produzione di un nuovo antigene vaccinale. [12]
Inoltre, i processi di produzione e purificazione di un vaccino ad mRNA sono abbastanza simili, nonostante i diversi antigeni codificati, quindi è possibile che vengano mantenuti o addirittura standardizzati per sviluppare altri vaccini simili a mRNA. [13]
Modificando la sequenza dell'mRNA e il sistema di rilascio, l'attività di espressione e l'emivita *in vivo* dell'mRNA possono essere efficacemente regolate. [14]
L'utilizzo della trascrizione *in vitro* facilita la produzione dei vaccini a mRNA, con risparmio di tempo e costi e può anche evitare la contaminazione da proteine e da virus provenienti dalle colture cellulari.

In secondo luogo, l'mRNA ha proprietà auto-adiuvanti che attivano risposte immunitarie adattative forti e durature attraverso la secrezione del fattore di necrosi tumorale-α (TNF-α), l'interferone-α (IFN-α) e di altre citochine da parte delle cellule immunitarie [15], mentre i vaccini a base di polipeptidi e proteine necessitano di adiuvanti aggiuntivi per raggiungere un obiettivo simile. [16]

In terzo luogo, rispetto ai vaccini a DNA (sia ad acido nucleico che a vettore), i vaccini a mRNA possono esprimere le proteine bersaglio in modo più efficiente a causa della loro espressione nel citoplasma senza entrare nel nucleo. Inoltre, la costituzione chimica della sequenza dell'mRNA, per la mancanza di isole CpG, riduce il rischio di integrazione nel genoma del DNA dell'ospite e di reazione immunitaria.

---

[12] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ.
Developing mRNA-vaccine technologies.
RNA Biol. 2012;9(11):1319-1330. doi:10.4161/rna.22269
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597572/

Tombácz I, Weissman D, Pardi N.
Vaccination with Messenger RNA: A Promising Alternative to DNA Vaccination.
Methods Mol Biol. 2021;2197:13-31. doi: 10.1007/978-1-0716-0872-2_2. P
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32827130/

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.
mRNA vaccines - a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov. 2018;17(4):261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/

[13] Linares-Fernández S, Lacroix C, Exposito JY, Verrier B.
Tailoring mRNA Vaccine to Balance Innate/Adaptive Immune Response.
Trends Mol Med. 2020 Mar;26(3):311-323. doi: 10.1016/j.molmed.2019.10.002. Epub 2019 Nov 5.
https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1471-4914%2819%2930244-8

[14] Verbeke, Rein, I. Lentacker, S. D. Smedt and Heleen Dewitte.
"Three decades of messenger RNA vaccine development."
Nano Today 28 (2019): 100766.
https://biblio.ugent.be/publication/8628303/file/8628317.pdf

[15] Van Lint S, Renmans D, Broos K, Dewitte H, Lentacker I, Heirman C, Breckpot K, Thielemans K.
The ReNAissanCe of mRNA-based cancer therapy.
Expert Rev Vaccines. 2015 Feb;14(2):235-51. doi: 10.1586/14760584.2015.957685. Epub 2014 Sep 29.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25263094/

[16] Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, Delahaye NF, Ulmer JB.
Mechanism of action of mRNA-based vaccines.
Expert Rev Vaccines. 2017 Sep;16(9):871-881. doi: 10.1080/14760584.2017.1355245. Epub 2017 Jul 28.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28701102/

Infine, l'mRNA rimane attivo solo in maniera transitoria, e viene completamente decomposto attraverso vie metaboliche fisiologiche. [17]

Strategie di progettazione per i vaccini a mRNA contro il SARS-COV-2

La progettazione dei vaccini a mRNA potrebbe sembrare abbastanza banale, a causa del loro semplice meccanismo d'azione dei vaccini: in seguito alla somministrazione dell'mRNA vaccinale che codifica per un antigene bersaglio, le cellule assorbono l'mRNA, lo traducono in proteine *in situ*, in modo che il sistema immunitario dell'individuo sia in grado di indurre una robusta risposta immunitaria adattativa contro la proteina bersaglio. Tuttavia, l'attuale processo di progettazione dei vaccini a mRNA richiede importanti considerazioni sulle modifiche dell'mRNA per ridurre la reattogenicità e ottimizzare l'espressione delle proteine, sulla corretta selezione dell'antigene bersaglio e sulla formulazione ottimale per consentire una veicolazione efficiente.[18]

Modifiche all'mRNA

Il primo aspetto da considerare nello sviluppo di vaccini a mRNA è che lo stesso mRNA non modificato non è l'ideale per l'uso.
Infatti, l'mRNA è sia estremamente labile che rapidamente degradato in condizioni sfavorevoli. Inoltre, è altamente immunogenico e in grado di attivare una varietà di sensori di pattern molecolari associati a patogeni.
Nel tentativo di migliorare l'emivita, la traducibilità e la sicurezza, Karikó et al. hanno testato varie modifiche naturali ai nucleosidi nelle molecole di mRNA, tra cui la pseudouridina, la 5-metilcitidina, la N6-metiladenosina, la 5-metiluridina e la 2-tiouridina [19].
Di queste varianti, hanno scoperto che l'incorporazione dell'N1-metil-pseudouridina (m1Ψ) al posto dell'uridina portava ad un aumento di 10 volte della traduzione rispetto all'mRNA non modificato. Inoltre, sono stati in grado di dimostrare che le molecole di mRNA che possiedono questa modifica non attivavano i meccanismi di rilevamento del pattern molecolare associati ai patogeni, come i recettori toll-like (TLR) o il gene I inducibile dall'acido retinoico (RIG-I). Questo è fondamentale per evitare un'infiammazione eccessiva, che potrebbe provocare effetti collaterali indesiderati del vaccino.
Per questi motivi, molti candidati, inclusi i due vaccini a mRNA recentemente autorizzati mRNA-1273 e BNT162b2, hanno adottato la modifica dell'mRNA con l'm1Ψ nella progettazione del loro vaccino. [20]

---

[17] Sahin U, Karikó K, Türeci Ö.
mRNA-based therapeutics--developing a new class of drugs.
Nat Rev Drug Discov. 2014 Oct;13(10):759-80. doi: 10.1038/nrd4278. Epub 2014 Sep 19.
https://www.nature.com/articles/nrd4278

[18] Bettini E, Locci M.
SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond.
Vaccines (Basel). 2021 Feb 12;9(2):147. doi: 10.3390/vaccines9020147.
https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/147/pdf

Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.
mRNA vaccines - a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr;17(4):261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243. Epub 2018 Jan 12.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/

[19] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D.
Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.
Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40. doi: 10.1038/mt.2008.200. Epub 2008 Sep 16.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775451/

[20] Jackson LA, et al
mRNA-1273 Study Group. An mRNA Vaccine against SARS-CoV-2 - Preliminary Report.
N Engl J Med. 2020 Nov 12;383(20):1920-1931. doi: 10.1056/NEJMoa2022483. Epub 2020 Jul 14.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7377258/

Corbett KS, et al
Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates.
N Engl J Med. 2020 Oct 15;383(16):1544-1555. doi: 10.1056/NEJMoa2024671. Epub 2020 Jul 28.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7449230/

Corbett KS, et al
SARS-CoV-2 mRNA vaccine design enabled by prototype pathogen preparedness.

Selezione dell'antigene

Nella selezione dell'antigene per un vaccino a mRNA, è essenziale scegliere un bersaglio che sia immunogenico e in grado di suscitare una risposta immunitaria protettiva.
Degli epitopi multipli del SARS-CoV-2, la glicoproteina spike (S) è il bersaglio comunemente selezionato per lo sviluppo del vaccino COVID-19 [21], in quanto è la principale proteina di superficie del SARS-CoV-2 e media l'ingresso virale legandosi al recettore dell'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2) nelle cellule ospiti [22].

Nature. 2020 Oct;586(7830):567-571. doi: 10.1038/s41586-020-2622-0. Epub 2020 Aug 5.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7581537/

Anderson EJ, et al mRNA-1273 Study Group.
Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccine in Older Adults.
N Engl J Med. 2020 Dec 17;383(25):2427-2438. doi: 10.1056/NEJMoa2028436. Epub 2020 Sep 29.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7556339/

Baden LR, et al COVE Study Group.
Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine.
N Engl J Med. 2021 Feb 4;384(5):403-416. doi: 10.1056/NEJMoa2035389. Epub 2020 Dec 30.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7787219/

Widge AT, et al
mRNA-1273 Study Group. Durability of Responses after SARS-CoV-2 mRNA-1273 Vaccination.
N Engl J Med. 2021 Jan 7;384(1):80-82. doi: 10.1056/NEJMc2032195. Epub 2020 Dec 3.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7727324/

Annette B. Vogel, et al
A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates
bioRxiv 2020.09.08.280818; doi: https://doi.org/10.1101/2020.09.08.280818
https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.08.280818v1.full.pdf

Sahin U, et al
COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and TH1 T cell responses.
Nature. 2020 Oct;586(7830):594-599. doi: 10.1038/s41586-020-2814-7. Epub 2020 Sep 30. Erratum in: Nature. 2021 Feb;590(7844):E17.
https://www.nature.com/articles/s41586-020-2814-7

Mulligan MJ,et al
Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults.
Nature. 2020 Oct;586(7830):589-593. doi: 10.1038/s41586-020-2639-4. Epub 2020 Aug 12. Erratum in: Nature. 2021 Feb;590(7844):E26.
https://www.nature.com/articles/s41586-020-2639-4

Walsh EE,
Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates.
N Engl J Med. 2020 Dec 17;383(25):2439-2450. doi: 10.1056/NEJMoa2027906. Epub 2020 Oct 14.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7583697/

Polack FP, et al C4591001 Clinical Trial Group.
Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine.
N Engl J Med. 2020 Dec 31;383(27):2603-2615. doi: 10.1056/NEJMoa2034577. Epub 2020 Dec 10.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7745181/

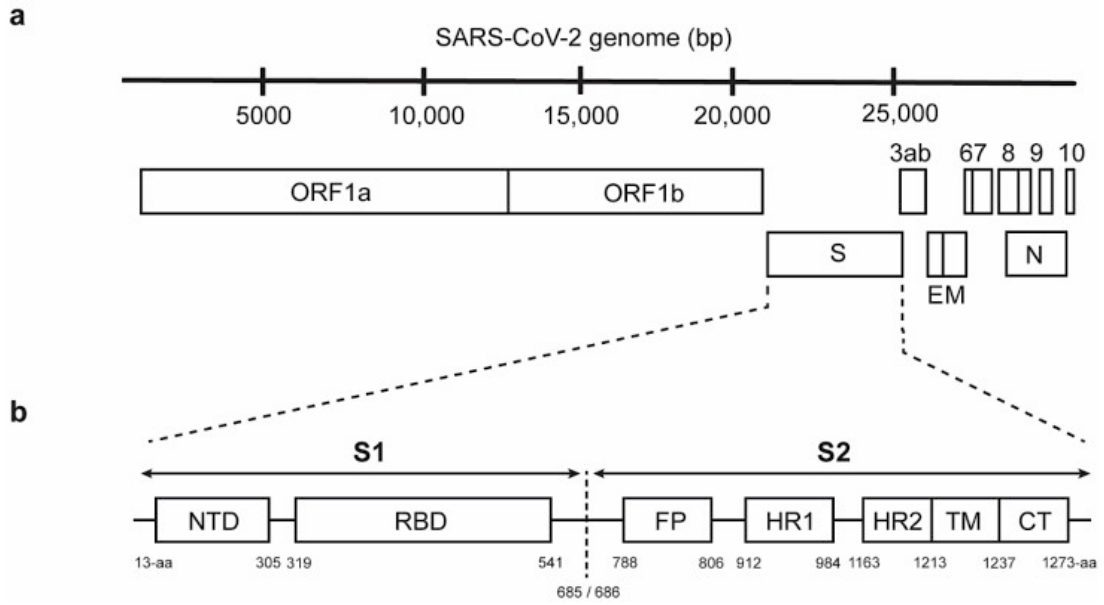
[21] Krammer, F.
SARS-CoV-2 vaccines in development.
Nature 586, 516–527 (2020). https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3
https://doi.org/10.1038/s41586-020-2798-3

[22] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS.
Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.
Science. 2020 Mar 13;367(6483):1260-1263. doi: 10.1126/science.abb2507. Epub 2020 Feb 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7164637/

Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D.
Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein.
Cell. 2020 Apr 16;181(2):281-292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058. Epub 2020 Mar 9. Erratum in: Cell. 2020 Dec 10;183(6):1735.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102599/

Letko M, Marzi A, Munster V.
Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses.
Nat Microbiol. 2020 Apr;5(4):562-569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y. Epub 2020 Feb 24.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7095430/

La spike è una glicoproteina di fusione virale di classe I, costituita da una subunità di legame del recettore (S1) e una subunità di fusione (S2) unite da un sito di scissione della furina, unico per questo coronavirus [23].
La spike è scissa a livello post-traduzionale in questo sito furinico. Tuttavia, le subunità S1 e S2 rimangono associate fino a quando la spike è legata al recettore ACE2 tramite il dominio di legame del recettore (RBD).



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7923282/
La glicoproteina S contiene due subunità, cioè l'N-terminale S1 e il C-terminale S2. La lunghezza della glicoproteina SARS-CoV-2 S è di 1273 aminoacidi (aa), disposti in sequenza con un peptide segnale di 13-aa situato all'estremità N seguita dalla subunità S1 (residui 14-685) e dalla subunità S2 (residui 686–1273). All'interno della subunità S1, c'è un dominio N-terminale (residui 14-305) e un dominio di legame del recettore (RBD; residui 319-541), mentre il peptide di fusione (FP; residui 788-806), la sequenza di ripetizione dell'eptapeptide 1 e 2 (HR1; residui 912–984 e HR2; residui 1163–1213), il dominio transmembrana (TMD; residui 1213–1237) e il dominio citoplasmatico (residui 1237–1273) formano la subunità S2.[24]

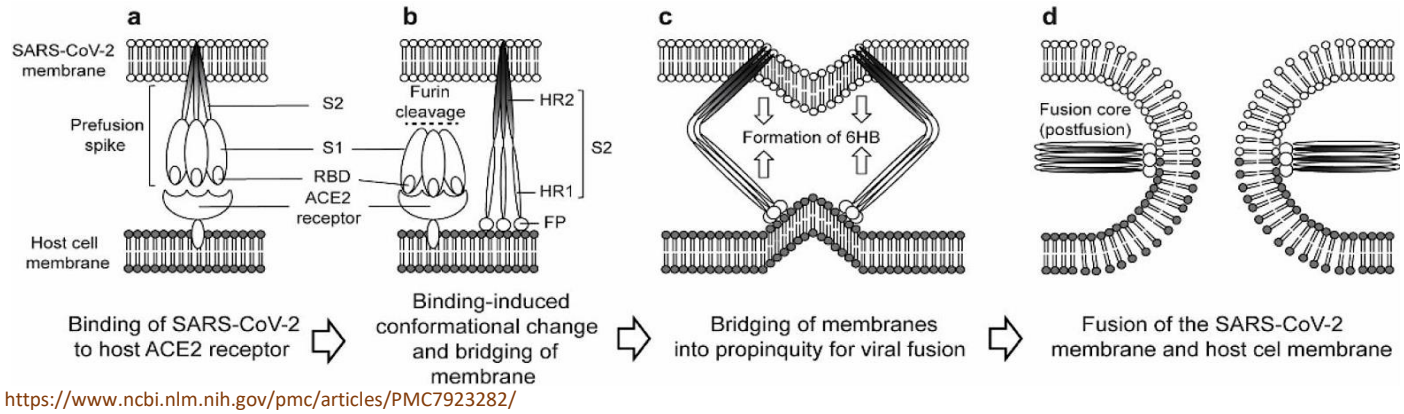
[23] Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallesen J, Yassine HM, Turner HL, Corbett KS, Graham BS, McLellan JS, Ward AB.
Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein.
Nature. 2016 Mar 3;531(7592):118-21. doi: 10.1038/nature17200.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4860016/

Juraszek J, Rutten L, Blokland S, et al.
Stabilizing the closed SARS-CoV-2 spike trimer.
Nat Commun. 2021;12(1):244. Published 2021 Jan 11. doi:10.1038/s41467-020-20321-x
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7801441/

Xia X.
Domains and Functions of Spike Protein in Sars-Cov-2 in the Context of Vaccine Design.
Viruses. 2021;13(1):109. Published 2021 Jan 14. doi:10.3390/v13010109
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7829931/

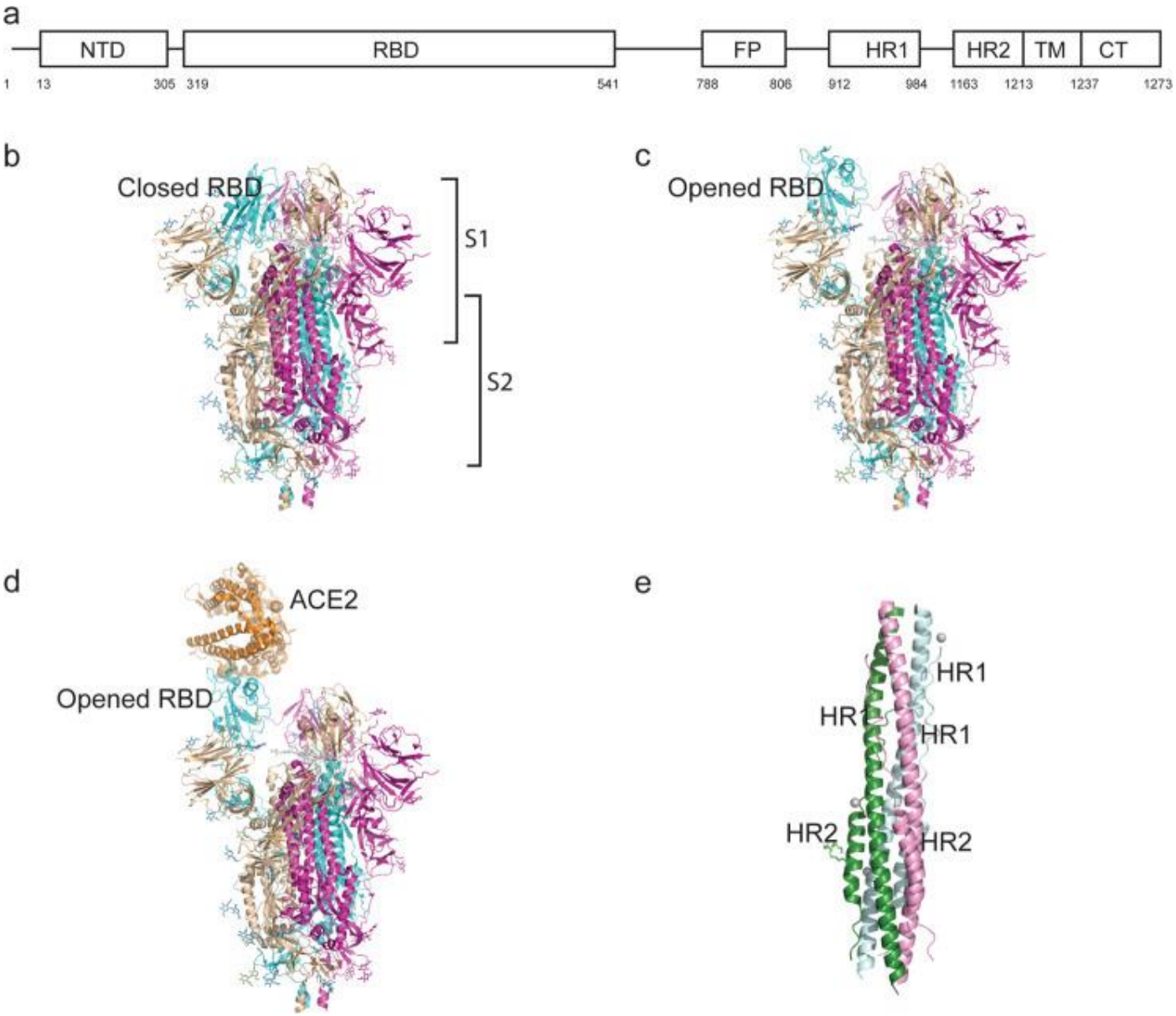
Ng KT, Mohd-Ismail NK, Tan YJ.
Spike S2 Subunit: The Dark Horse in the Race for Prophylactic and Therapeutic Interventions against SARS-CoV-2.
Vaccines (Basel). 2021;9(2):178. Published 2021 Feb 20. doi:10.3390/vaccines9020178
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7923282/

[24] Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW.
Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19.
Acta Pharmacol Sin. 2020 Sep;41(9):1141-1149. doi: 10.1038/s41401-020-0485-4. Epub 2020 Aug 3.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7396720/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7923282/

Rappresentazione schematica di **(a)** legame della spike di prefusione dell'RBD del SARS-CoV-2 (S) per ospitare il recettore ACE2, **(b)** scissione della proteina S nella subunità S1 e nella subunità S2 da parte della furina, risultando nel peptide di fusione (FP) di S2 esposto e impiantato nella membrana della cellula bersaglio, **(c)** formazione del fascio a 6 eliche (6HB) che collega le membrane in prossimità per la fusione virale, e **(d)** tre HR1 e HR2 che si combinano per formare il nucleo di fusione (post-fusione) per fondere la membrana virale-ospite.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7396720/

Struttura della proteina SARS-CoV-2 S. **a)** rappresentazione schematica della spike del SARS-CoV-2. **b) – c)** Stato di chiusura e apertura della proteina S RBD. **d)** La proteina S si lega ad ACE2 con RBD aperto nella subunità S1. **e)** La struttura a sei eliche formata da HR1 e HR2 della subunità S2.

Le informazioni raccolte da precedenti lavori con glicoproteine di fusione simili, hanno dimostrato quanto sia importante utilizzare proteine stabilizzate in pre-fusione che preservino epitopi sensibili alla neutralizzazione per lo sviluppo di vaccini efficaci [25].
Per stabilizzare la proteina S, sono state adottate diverse strategie. L'approccio utilizzato nei vaccini autorizzati mRNA-1273 e BNT162b2 è l'introduzione di una mutazione in cui gli amminoacidi 986 e 987 sono sostituiti con proline (S-2P), che stabilizzano la glicoproteina S nella conformazione di pre-fusione ma consentono comunque la scissione delle subunità S1 e S2.

Veicolazione dell'mRNA

Sebbene l'mRNA nudo possa essere iniettato direttamente per l'immunizzazione, questo metodo di somministrazione è piuttosto inefficiente. Infatti, le molecole di mRNA devono essere in grado di penetrare attraverso la membrana lipidica di una cellula per raggiungere gli apparati necessari per tradurre i trascritti in proteine.
Pertanto, i metodi di veicolazione che facilitano la localizzazione citosolica dei vaccini a mRNA sono importanti per ottenere una traduzione efficiente in proteine.
L'avvento dell'incapsulamento in nanoparticelle lipidiche (LNP) è stato un punto di svolta nello sviluppo dei vaccini a mRNA, in quanto sono in grado di fornire efficacemente mRNA *in vivo* [26].
Quando iniettati per via intramuscolare, gli mRNA-LNP possono essere fagocitati e tradotti rapidamente nelle cellule presentanti l'antigene sia nel sito di iniezione che nei linfonodi drenanti, promuovendo così l'inizio di risposte immunitarie adattative [27]. Inoltre, le LNP possono proteggere l'mRNA dalla degradazione da parte delle nucleasi.

Sebbene la composizione precisa delle LNP utilizzate da molti sviluppatori di vaccini sia un'informazione riservata, è noto che le LNP contengono una combinazione di lipidi cationici ionizzabili, colesterolo, fosfolipidi e PEG che si auto-assemblano in nanoparticelle da ~ 100 nm che incapsulano l'mRNA. [28]

---

[25] Pallesen J, et al
Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017 Aug 29;114(35):E7348-E7357. doi: 10.1073/pnas.1707304114. Epub 2017 Aug 14.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584442/

Graham BS, Gilman MSA, McLellan JS.
Structure-Based Vaccine Antigen Design.
Annu Rev Med. 2019 Jan 27;70:91-104. doi: 10.1146/annurev-med-121217-094234.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6936610/

[26] Pardi N, Tuyishime S, Muramatsu H, Kariko K, Mui BL, Tam YK, Madden TD, Hope MJ, Weissman D.
Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes.
J Control Release. 2015 Nov 10;217:345-51. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.007. Epub 2015 Aug 8.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4624045/

Pardi N, et al
Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.
J Exp Med. 2018 Jun 4;215(6):1571-1588. doi: 10.1084/jem.20171450. Epub 2018 May 8.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987916/

[27] Liang F, Lindgren G, Lin A, Thompson EA, Ols S, Röhss J, John S, Hassett K, Yuzhakov O, Bahl K, Brito LA, Salter H, Ciaramella G, Loré K.
Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques.
Mol Ther. 2017 Dec 6;25(12):2635-2647. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006. Epub 2017 Aug 12.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768558/

[28] Maier MA, et al
Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics.
Mol Ther. 2013 Aug;21(8):1570-8. doi: 10.1038/mt.2013.124. Epub 2013 Jun 25.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734658/

Kauffman KJ, Webber MJ, Anderson DG.
Materials for non-viral intracellular delivery of messenger RNA therapeutics.
J Control Release. 2016 Oct 28;240:227-234. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.12.032. Epub 2015 Dec 21.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26718856/

Cullis PR, Hope MJ.
Lipid Nanoparticle Systems for Enabling Gene Therapies.
Mol Ther. 2017 Jul 5;25(7):1467-1475. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.013. Epub 2017 Apr 13.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5498813/

Tra i vaccini candidati negli studi clinici, le LNP sono il metodo standard utilizzato per veicolare i vaccini a mRNA ai partecipanti.

Sintesi e ottimizzazione dell'mRNA [29]

L'mRNA sintetico funzionale può essere ottenuto mediante trascrizione *in vitro* di uno stampo di cDNA, tipicamente DNA plasmidico (pDNA), utilizzando una RNA polimerasi del batteriofago. [30]
Quindi, la preparazione del pDNA è il primo passo nella produzione dell'mRNA.
Il pDNA grezzo contiene tracce di DNA genomico batterico e tre forme di pDNA (superavvolto, circolare rilassato o lineare) in proporzioni variabili, quindi la preparazione di pDNA puro e standardizzato, come richiesto per un vaccino, è impegnativa.
I residui di DNA batterico e l'eterogeneità del pDNA non rappresentano però un problema se il pDNA linearizzato viene trascritto utilizzando l'RNA polimerasi del batteriofago, [31] perché tutto il DNA residuale viene rimosso durante le fasi produttive successive (vedi sotto).

Ad oggi, la tecnologia di trascrizione in vitro dell'mRNA è stata ottimizzata, e il metodo più diffuso utilizza per la sintesi dell'mRNA, l'RNA polimerasi T3, T7 o SP6 e il DNA lineare (DNA plasmidico linearizzato o DNA sintetico preparato mediante PCR).
Ci sono alcuni elementi strutturali di base che sono necessari per mantenere l'mRNA funzionale, tra cui un cappuccio in 5' (5'-cap), cioè un residuo di 7-metil-guanosina unito all'estremità 5' tramite un 5'-5' trifosfato, [32] una regione non tradotta in 5' (5'-UTR), una regione con frame di lettura aperto (ORF), una regione in 3' non tradotta (3'-UTR) e una coda a base di poli(A). [33]

[29] Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ.
Developing mRNA-vaccine technologies.
RNA Biol. 2012;9(11):1319-1330. doi:10.4161/rna.22269
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597572/

[30] Krieg PA, Melton DA.
Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs
Nucleic Acids Res. 1984;12(18):7057-7070. doi:10.1093/nar/12.18.7057
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC320142/pdf/nar00336-0141.pdf

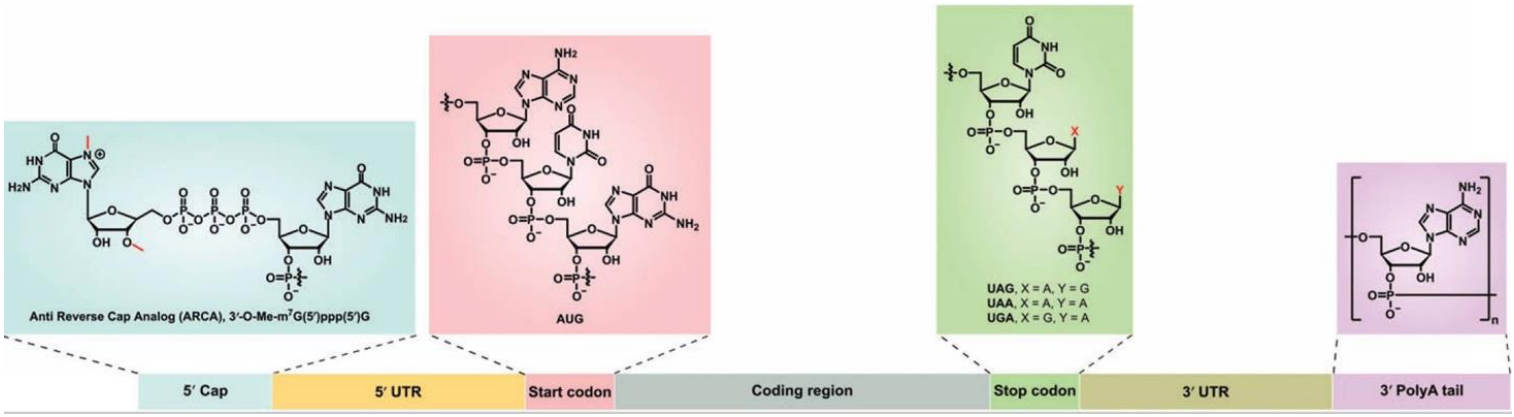
[31] Pascolo S.
Vaccination with messenger RNA.
Methods Mol Med. 2006;127:23-40. doi: 10.1385/1-59745-168-1:23. PMID: 16988444.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16988444/

[32] Banerjee AK.
5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids.
Microbiol Rev. 1980;44(2):175-205.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373176/pdf/microrev00063-0005.pdf

[33] Pardi N., Muramatsu H., Weissman D., Karikó K.
In Vitro Transcription of Long RNA Containing Modified Nucleosides. In: Rabinovich P.M.,
editor. Synthetic Messenger RNA and Cell Metabolism Modulation: Methods and Protocols. Humana Press; Totowa, NJ, USA: 2012. pp. 29–42.
https://www.researchgate.net/publication/234086698_In_Vitro_Transcription_of_Long_RNA_Containing_Modified_Nucleosides

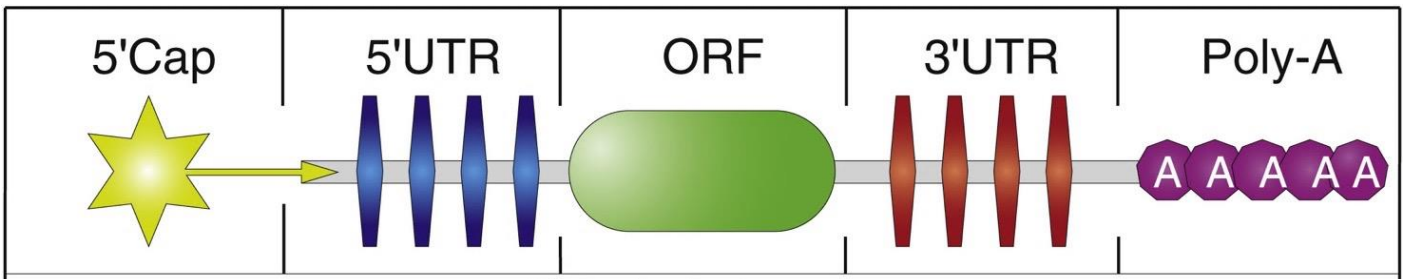
Weng Y, Li C, Yang T, Hu B, Zhang M, Guo S, Xiao H, Liang XJ, Huang Y.
The challenge and prospect of mRNA therapeutics landscape.
Biotechnol Adv. 2020 May-Jun;40:107534. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107534. Epub 2020 Feb 21.
https://www.researchgate.net/publication/339409095_The_challenge_and_prospect_of_mRNA_therapeutics_landscape

Bardwell VJ, Zarkower D, Edmonds M, Wickens M.
The enzyme that adds poly(A) to mRNAs is a classical poly(A) polymerase.
Mol Cell Biol. 1990 Feb;10(2):846-9. doi: 10.1128/mcb.10.2.846.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC360888/pdf/molcellb00038-0422.pdf



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443240/

Di conseguenza, uno stampo a pDNA per la trascrizione *in vitro* deve contenere almeno un promotore del batteriofago, un ORF, eventualmente una coda poli(d (A/T)) trascritta in poli(A) e un unico sito di restrizione per la linearizzazione del plasmide per garantire la terminazione definita della trascrizione.

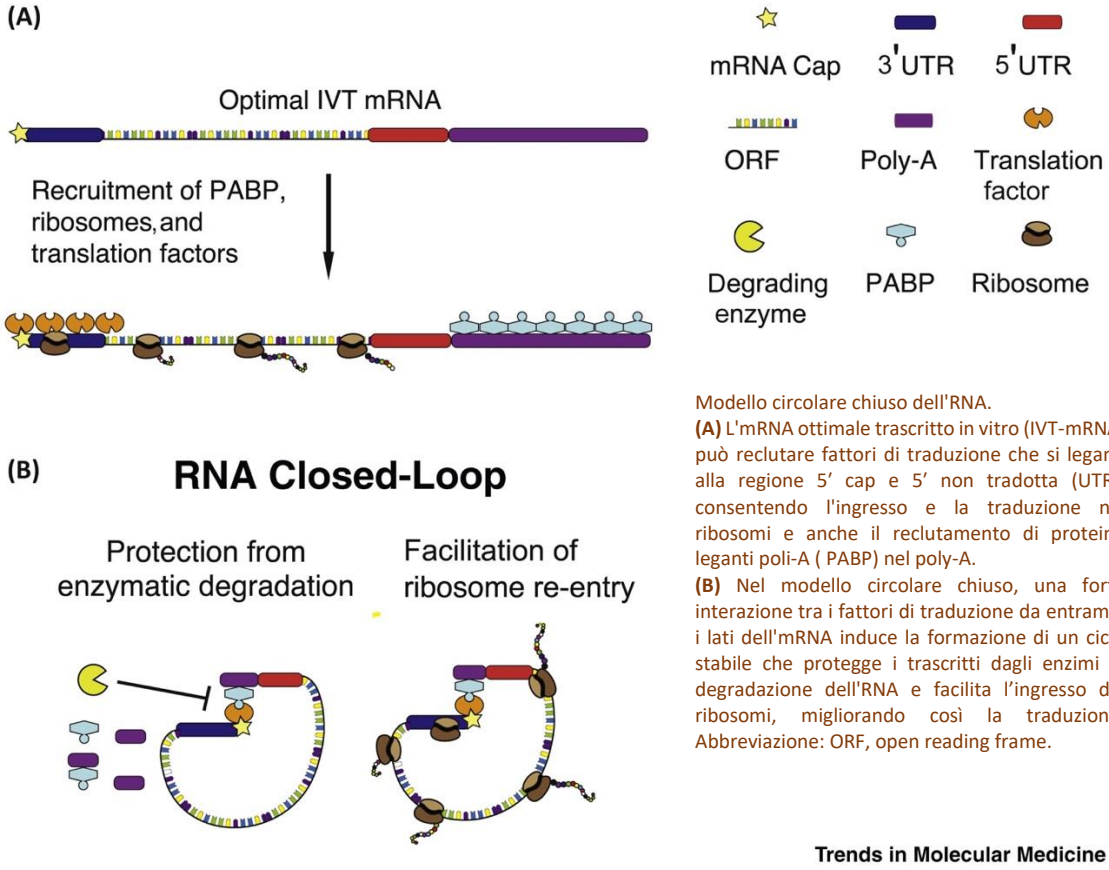


Biological relevance				
Cap -Eukaryotic modification -Important for translation initiation, mRNA stability, nuclear export. -When suboptimal, recognized as PAMPs by the innate immunity. -RNA Closed-Loop.	**5' UTR** -Recognition by translation machinery. -Recognized and scanned by ribosomes. -Important for mRNA translation and stability. -RNA Closed-Loop.	**ORF** -Sequence encoding the gene of interest (GOI), in mRNA vaccine encodes the antigen.	**3'UTR** -Important for translation initiation and mRNA stability.	**Poly A** -Important for mRNA stability. -Recognition by Poly-A binding proteins (PABP) and recruitment of translation factors. -Important for translation initiation (RNA Closed-Loop).
Region optimization				
-Natural Cap-1 to avoid PRR recognition and enhance translation. -Enzymatic capping for higher capping efficiency.	-Inclusion of Kozak sequence. -No strong secondary structures. -No other start codon. -Polysome profiling to count the ribosome loading in sequences *in-silico*.	-Codon optimization increases translation. -Low optimal codons may be important for adequate folding.	-Optimal sequences derived from highly stable mRNA (β-Globin). -2x copies in tandem -RNA Closed-Loop	-Poly-A sequences of 120 units. -Adding a poly-U sequence, providing a dsRNA in the poly-A, increases adjuvant effect.
Whole molecule optimization				
-Avoiding binding sites of miRNAs present in the target cells. -Uridine depletion to avoid recognition by innate immunity. -Production at high temperature (50ºC) using a thermostable polymerase and/or low Mg^{2+} concentration, to decrease dsRNA levels. -mRNA purification using HPLC to decrease dsRNA amount. -Avoidance of highly stable and long secondary structures that could activate PRRs.				

Trends in Molecular Medicine

https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8
Progettazione dell'mRNA, dalla sua organizzazione del dominio alla sua ottimizzazione della sequenza.
Nella parte superiore della figura è presentata una rappresentazione schematica delle regioni principali 5 ' cap, 5 ' regione non tradotta (UTR), open reading frame (ORF), 3 ' UTR e poliadenilazione (Poly-A) di qualsiasi mRNA. Sotto questa struttura sono indicate le principali funzioni di queste regioni, la loro potenziale interazione con i recettori di riconoscimento dei pattern (PRR) e le possibili ottimizzazioni. Abbreviazione: PAMP, pattern molecolari associati ai patogeni.

Il modello di pDNA linearizzato viene trascritto in mRNA in una miscela contenente RNA-polimerasi ricombinante (T7, T3 o SP6) e trifosfati nucleosidici.
Per ottenere un mRNA chiuso, nella reazione può essere incluso un analogo del cap come il dinucleotide m7G(5')-ppp-(5')G (chiamato "analogo del cappuccio regolare"). [34]
Se l'analogo del cap è in eccesso rispetto al GTP, la trascrizione inizia con l'analogo del cappuccio invece che con il GTP, producendo un mRNA chiuso.
In alternativa, il cappuccio può essere aggiunto per via enzimatica dopo la trascrizione.



Modello circolare chiuso dell'RNA.
(A) L'mRNA ottimale trascritto in vitro (IVT-mRNA) può reclutare fattori di traduzione che si legano alla regione 5' cap e 5' non tradotta (UTR), consentendo l'ingresso e la traduzione nei ribosomi e anche il reclutamento di proteine leganti poli-A (PABP) nel poly-A.
(B) Nel modello circolare chiuso, una forte interazione tra i fattori di traduzione da entrambi i lati dell'mRNA induce la formazione di un ciclo stabile che protegge i trascritti dagli enzimi di degradazione dell'RNA e facilita l'ingresso dei ribosomi, migliorando così la traduzione. Abbreviazione: ORF, open reading frame.

https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8

Una coda di poli(A) può anche essere aggiunta dopo la trascrizione se non è fornita dallo stampo di pDNA. [35]
Dopo la trascrizione, lo stampo di pDNA e il DNA batterico contaminante vengono digeriti dalla DNasi.

Capping dell'mRNA

Il cappuccio 5' degli mRNA è caratteristico dell'mRNA eucariotico e consiste nell'aggiunta di una guanosina metilata in N7 al primo nucleotide di queste molecole. [36]

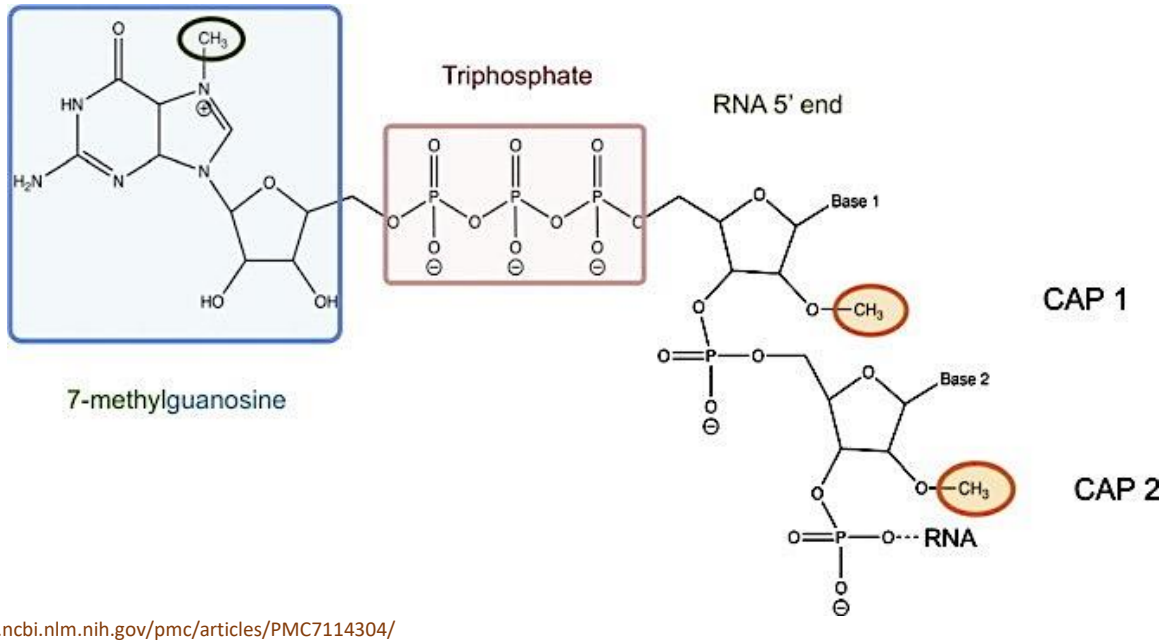
[34] Konarska MM, Padgett RA, Sharp PA.
Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors.
Cell. 1984 Oct;38(3):731-6. doi: 10.1016/0092-8674(84)90268-x.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6567484/

Jang SK, Paek KY.
Cap-dependent translation is mediated by 'RNA looping' rather than 'ribosome scanning'.
RNA Biol. 2016;13(1):1-5. doi: 10.1080/15476286.2015.1107700.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829323/

[35] Munroe D, Jacobson A.
mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation.
Mol Cell Biol. 1990 Jul;10(7):3441-55. doi: 10.1128/mcb.10.7.3441.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC360780/

[36] Ramanathan A, Robb GB, Chan SH.
mRNA capping: biological functions and applications.
Nucleic Acids Res. 2016;44(16):7511-7526. doi:10.1093/nar/gkw551

Oltre alle sue funzioni nello splicing del pre-mRNA, nella poliadenilazione, nell'esportazione nucleare e nella protezione contro le esonucleasi, altri aspetti chiave del cappuccio 5' sono importanti ai fini della produzione del costrutto vaccinale.
In primo luogo, gli mRNA del vaccino dovrebbero essere riconosciuti come molecole del self.
Il cappuccio 5' può essere presente in diverse conformazioni negli mRNA ed è richiesta una struttura naturale di tipo CAP-1.
Infatti, gli mRNA con capping anormale (CAP-0) o senza cappuccio (5'ppp o 5'pp) sono riconosciuti dai PRR [37], come RIG-I e IFIT, che innescano la produzione di IFN di tipo I e la loro distruzione.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114304/
La struttura del cappuccio dell'RNA: il cappuccio è costituito da una 7-metilguanosina (riquadro blu) collegata al 5' del nucleoside della catena dell'RNA messaggero attraverso un ponte trifosfato 5' – 5 ' (riquadro rosa). Il gruppo metilico della guanosina nella sua posizione N-7 è circondato in verde, e il gruppo metilico 2'-O del primo e del secondo residuo nucleotidico che formano le strutture cap-1 e cap2, rispettivamente, è circondato in arancione chiaro.

Nella via convenzionale, viene aggiunta una struttura a cappuccio al nascente mRNA 5'-trifosfato in una serie di reazioni.
Il 5'-trifosfato viene prima idrolizzato da una RNA 5'-trifosfatasi (RTPasi).
Una guaniltransferasi (GTasi), chiamata anche "enzima di cappaggio", aggiunge la struttura del cappuccio sotto forma di una guanosina 5'-monofosfato con orientamento 5' – 5 '.
Il cappuccio viene quindi metilato nella posizione N-7 della sua guanina da un RNA-cap guanina N-7-metiltransferasi (N-7 MTasi).
Questo genera il cap-0 minimo (m7GpppN…), che si trova nei metazoi e negli eucarioti inferiori.

---

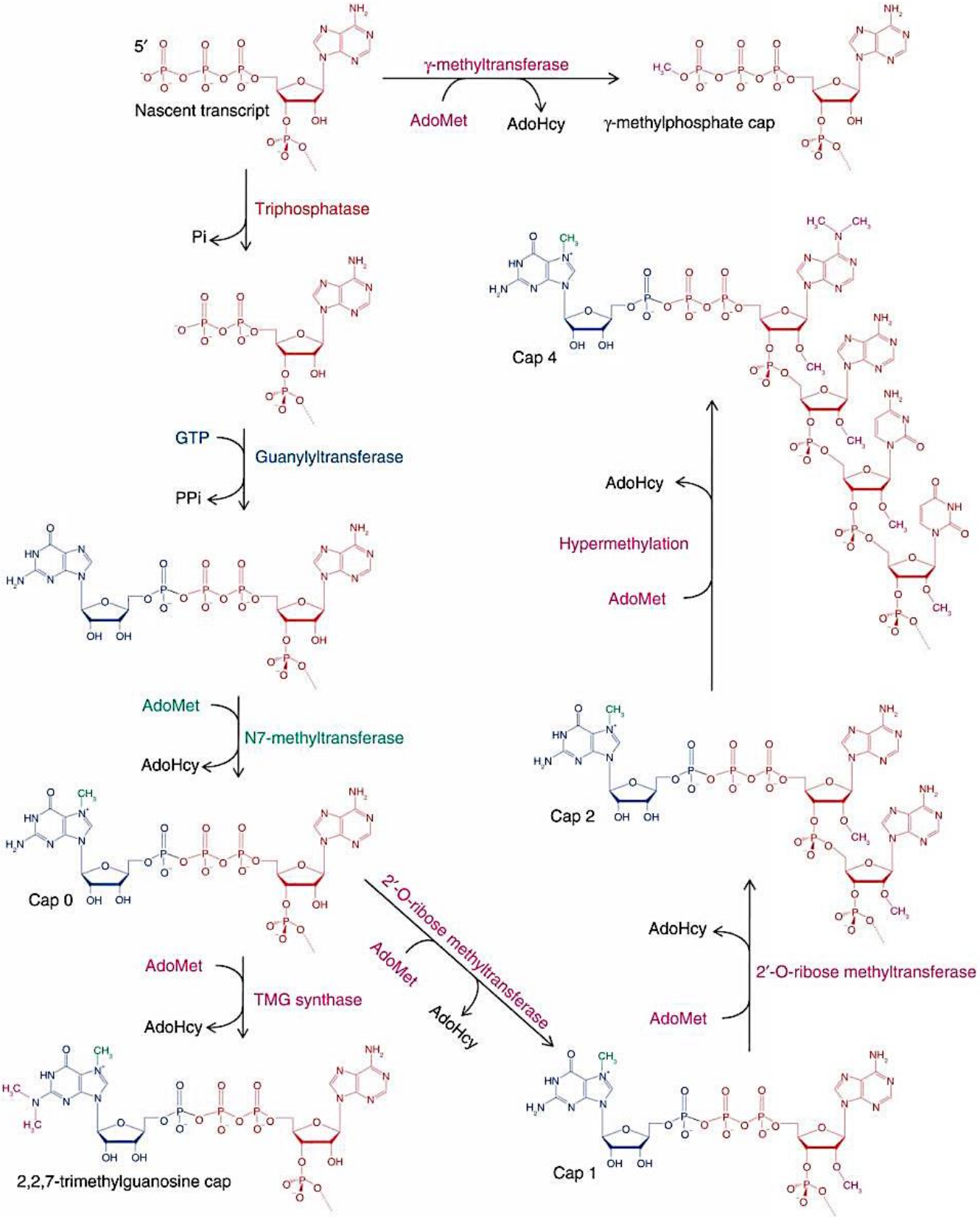
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5027499/

Ferron F, Decroly E, Selisko B, Canard B.
The viral RNA capping machinery as a target for antiviral drugs.
Antiviral Res. 2012;96(1):21-31. doi:10.1016/j.antiviral.2012.07.007
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7114304/

37 Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G.
5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.
Science. 2006 Nov 10;314(5801):994-7. doi: 10.1126/science.1132505. Epub 2006 Oct 12.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038590/

Kumar P, Sweeney TR, Skabkin MA, Skabkina OV, Hellen CU, Pestova TV.
Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1- and 5'ppp- mRNAs.
Nucleic Acids Res. 2014 Mar;42(5):3228-45. doi: 10.1093/nar/gkt1321. Epub 2013 Dec 25.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3950709/

Negli eucarioti superiori, l'ulteriore metilazione da parte della ribosio 2'-O-metiltransferasi (2'-O MTasi) si verifica nella posizione 2' dei ribosi del trascritto originale per produrre principalmente strutture cap-1 (m7GpppNmN ...) ma anche cap-2 (m7GpppNmNmN…).[38]



[38] Ghosh A, Lima CD.
Enzymology of RNA cap synthesis.
Wiley Interdiscip Rev RNA. 2010;1(1):152-172. doi:10.1002/wrna.19
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962952/

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3962952/
Strutture e sintesi di RNA caps. I tappi Cap 0 o m7G (GMP colorati in blu) sono formati in fasi sequenziali da tre attività enzimatiche che agiscono sull'estremità 5 'trifosfato (colorata in rosso) dei trascritti nascenti. Il trasferimento di un gruppo metile (colorato in verde) dalla S-adenosilmetionina (AdoMet) completa la sintesi del cappuccio 0. Il trasferimento di due gruppi metilici (colorato in magenta) dalla S-adenosilmetionina (AdoMet) è necessario per formare il cappuccio TMG. Le strutture dei cappucci 1 e 2 richiedono la metilazione (magenta colorato) del cappuccio 0 al ribosio 2'-O del primo e del secondo nucleoside, rispettivamente. La struttura del cappuccio 4 è generata da sei cicli di metilazione (color magenta). I primi tre cicli di metilazione (color magenta) si verificano in due posizioni sulla base e ribosio del primo nucleoside del trascritto primario. I successivi tre cicli di metilazione (color magenta) si verificano sulle posizioni del ribosio 2'-O dei prossimi tre nucleosidi. Il cappuccio γ-metilfosfato è formato dal trasferimento di un gruppo metile (colorato in magenta) da AdoMet al γ-fosfato del trascritto primario.

A causa del suo accoppiamento alla trascrizione dell'RNA, il capping è principalmente un processo nucleare, sebbene si sospetti che alcuni eventi di re-capping dell'RNA si verifichino nel citoplasma [39].
I virus generalmente si replicano nel citoplasma, determinando una finestra temporale durante la quale gli RNA virali vengono sintetizzati ma non ancora addizionati del cappuccio.

La coevoluzione di virus e cellule ha generato una serie di vie cellulari e proteine coinvolte nel rilevamento della presenza di RNA virali.
L'assenza di RNA-cap e la presenza di RNA a doppio filamento sono segnali forti di un'infezione virale. Queste specie di RNA, da sole o insieme, vengono rilevate come RNA "non-self" dai sensori cellulari che attivano una risposta immunitaria cellulare innata. [40] I virus hanno sviluppato numerose strategie per sfuggire al rilevamento, incluso il rapido ed efficiente capping dell'RNA virale.

La struttura del cappuccio svolge importanti funzioni nella traduzione dell'mRNA attraverso il reclutamento di fattori di inizio della traduzione e probabilmente anche facilitando la formazione di mRNA circolare chiuso [41].
Pertanto, nel contesto del costrutto vaccinale, è importante ottenere la massima efficienza nella produzione di mRNA con CAP-1 per evitare l'eccessiva attivazione dell'immunità innata attraverso i prodotti rimanenti senza cappuccio o con cappucci inadeguati.

Regioni non tradotte

Le regioni non tradotte (UTR) sono importanti regolatori della degradazione dell'mRNA e dell'efficienza traduzionale tramite le proteine leganti l'RNA.
L'uso di UTR dell'α-globina o β-globina da Xenopus laevis o dall'uomo, è stato l'approccio standard storico nella vaccinazione con mRNA a causa della loro elevata stabilità.
Tuttavia, le prestazioni delle UTR dipendono dalla specie, dal tipo di cellula e dallo stato cellulare.
Pertanto, qualsiasi vaccino a mRNA deve definire quali sono le sequenze UTR più rilevanti nelle cellule bersaglio per la sua forte espressione.
Di seguito sono discussi approcci recenti per il miglioramento dell'UTR per ottenere un'elevata espressione e stabilità dell'mRNA nelle cellule / nei tessuti bersaglio.

5'-UTR

Sono state descritte diverse caratteristiche delle 5'-UTR che influenzano la traduzione dell'mRNA.

[39] Schoenberg DR, Maquat LE.
Re-capping the message.
Trends Biochem Sci. 2009 Sep;34(9):435-42. doi: 10.1016/j.tibs.2009.05.003. Epub 2009 Sep 2.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2743798/

[40] Wilkins C, Gale M Jr.
Recognition of viruses by cytoplasmic sensors.
Curr Opin Immunol. 2010 Feb;22(1):41-7. doi: 10.1016/j.coi.2009.12.003. Epub 2010 Jan 12.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3172156/

[41] Jang SK, Paek KY.
Cap-dependent translation is mediated by 'RNA looping' rather than 'ribosome scanning'.
RNA Biol. 2016;13(1):1-5. doi:10.1080/15476286.2015.1107700
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829323/

Tomek W, Wollenhaupt K.
The "closed loop model" in controlling mRNA translation during development.
Anim Reprod Sci. 2012 Sep;134(1-2):2-8. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.005. Epub 2012 Aug 11.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22917874/

Ad esempio, dovrebbero essere evitati nella 5'-UTR un codone di inizio canonico (AUG) e codoni di inizio non canonici (AUG e CUG).
Un'altra caratteristica che influisce negativamente sulla traduzione dell'mRNA è la presenza di strutture secondarie altamente stabili, che impediscono il reclutamento dei ribosomi, la scansione e l'avvio del riconoscimento del codone.
A parte questi requisiti di sequenza, si sa poco su come ottimizzare le sequenze 5'-UTR.
La bioinformatica è uno strumento promettente per prevedere l'efficienza della traduzione dell'mRNA in base alle caratteristiche delle sequenze 5'-UTR, come la presenza di strutture secondarie. [42]

3'-UTR

La 3'-UTR è normalmente considerata una regione concentrata di fattori instabili, quindi l'evitare sequenze instabili e l'introduzione di elementi stabili durante la sintesi della 3'-UTR può aumentare la stabilità dell'mRNA ed espandere la sua emivita. [43]
Le sequenze arricchite con AU e GU sono sfruttate per questo,[44] in quanto la 3'-UTR determina i livelli di proteine attraverso la regolazione della stabilità e della traduzione dell'mRNA mediata in gran parte da elementi ricchi di AU e miRNA (vedi sotto). [45]
Oltre a utilizzare sequenze di mRNA stabili, l'espressione della proteina potrebbe essere migliorata aggiungendo sequenze 3'-UTR due volte in tandem. [46]

---

[42] Gaspar P, Moura G, Santos MA, Oliveira JL.
mRNA secondary structure optimization using a correlated stem-loop prediction
[published correction appears in Nucleic Acids Res. 2016 Jun 20;44(11):5490]. Nucleic Acids Res. 2013;41(6):e73. doi:10.1093/nar/gks1473
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3616703/

[43] Mayr C.
Regulation by 3'-Untranslated Regions.
Annu Rev Genet. 2017 Nov 27;51:171-194. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024704. Epub 2017 Aug 30.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28853924/

Ferizi M, Leonhardt C, Meggle C, Aneja MK, Rudolph C, Plank C, Rädler JO.
Stability analysis of chemically modified mRNA using micropattern-based single-cell arrays.
Lab Chip. 2015 Sep 7;15(17):3561-71. doi: 10.1039/c5lc00749f. Epub 2015 Jul 23.
https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2015/LC/C5LC00749F

Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al.
Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening.
Mol Ther. 2019;27(4):824-836. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453560/

[44] Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, et al.
Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification.
Mol Ther Nucleic Acids. 2018;12:530-542. doi:10.1016/j.omtn.2018.06.010
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6076213/

Vlasova-St Louis I, Bohjanen PR.
Coordinate regulation of mRNA decay networks by GU-rich elements and CELF1.
Curr Opin Genet Dev. 2011;21(4):444-451. doi:10.1016/j.gde.2011.03.002
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3146975/

[45] Barreau C, Paillard L, Osborne HB.
AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles?
Nucleic Acids Res. 2006 Jan 3;33(22):7138-50. doi: 10.1093/nar/gki1012.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1325018/

Bartel DP.
MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.
Cell. 2009 Jan 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3794896/

Chen CY, Shyu AB.
AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.
Trends Biochem Sci. 1995 Nov;20(11):465-70. doi: 10.1016/s0968-0004(00)89102-1.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8578590/

[46] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Türeci O, Sahin U.
Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells.
Blood. 2006 Dec 15;108(13):4009-17. doi: 10.1182/blood-2006-04-015024. Epub 2006 Aug 29.
https://ashpublications.org/blood/article/108/13/4009/6595/Modification-of-antigen-encoding-RNA-increases

Un metodo recentemente sviluppato per identificare le sequenze 3'-UTR che stabilizzano l'mRNA utilizza l'arricchimento progressivo dell'mRNA sintetico di emivita più lunga attraverso diversi cicli [trasfezione in cellule dendritiche umane (DC), inibizione della trascrizione e purificazione dell'mRNA] della trascrittasi inversa (RT)-PCR.
Questo metodo identifica anche una correlazione negativa tra il numero di siti di legame degli miRNA * nelle DC e l'emivita dell'mRNA.
Pertanto, le sequenze UTR potrebbero essere controllate per ridurre al minimo il numero di siti di legame degli miRNA nelle APC, in quanto queste molecole promuovono la degradazione dell'mRNA.
È anche possibile incorporare siti di legame per gli miRNA nella sequenza di mRNA per diminuire l'espressione dell'antigene nei tessuti non mirati. [47]

** I microRNAs (miRNAs) sono dei piccoli RNA non codificanti (21 – 25 nucleotidi) che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale, ed esplicano il loro ruolo mediante il riconoscimento e l'appaiamento a specifiche sequenze di mRNA*

I microRNA: il loro geni e i loro target
microRNA Struttura e Funzione

Le 3'-UTR consentono anche la traduzione locale attraverso la regolazione della localizzazione dell'mRNA [48].
Nuove acquisizioni hanno permesso di comprendere che la lunghezza della 3'-UTR può essere regolata da scissione e poliadenilazione alternative (APA) [49], così come che le 3'-UTR possono essere staccate e agire come lunghi RNA non codificanti indipendenti dalla regione codificante.[50]

Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al.
Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening.
Mol Ther. 2019;27(4):824-836. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453560/

[47] Jain R, Frederick JP, Huang EY, et al.
MicroRNAs Enable mRNA Therapeutics to Selectively Program Cancer Cells to Self-Destruct.
Nucleic Acid Ther. 2018;28(5):285-296. doi:10.1089/nat.2018.0734
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6157376/

Hewitt SL, et al
Durable anticancer immunity from intratumoral administration of IL-23, IL-36γ, and OX40L mRNAs.
Sci Transl Med. 2019 Jan 30;11(477):eaat9143. doi: 10.1126/scitranslmed.aat9143.
https://stm.sciencemag.org/content/11/477/eaat9143.full

[48] Martin KC, Ephrussi A.
mRNA localization: gene expression in the spatial dimension.
Cell. 2009 Feb 20;136(4):719-30. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.044.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819924/

Niedner A, Edelmann FT, Niessing D.
Of social molecules: The interactive assembly of ASH1 mRNA-transport complexes in yeast.
RNA Biol. 2014;11(8):998-1009. doi: 10.4161/rna.29946. Epub 2014 Oct 31.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615550/

[49] Lianoglou S, Garg V, Yang JL, Leslie CS, Mayr C.
Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression.
Genes Dev. 2013 Nov 1;27(21):2380-96. doi: 10.1101/gad.229328.113. Epub 2013 Oct 21.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3828523/

Martin KC, Ephrussi A.
mRNA localization: gene expression in the spatial dimension.
Cell. 2009 Feb 20;136(4):719-30. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.044.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2819924/

Sandberg R, Neilson JR, Sarma A, Sharp PA, Burge CB.
Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites.
Science. 2008 Jun 20;320(5883):1643-7. doi: 10.1126/science.1155390. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2587246/

[50] Chao Y, Vogel J.
A 3' UTR-Derived Small RNA Provides the Regulatory Noncoding Arm of the Inner Membrane Stress Response.
Mol Cell. 2016 Feb 4;61(3):352-363. doi: 10.1016/j.molcel.2015.12.023. Epub 2016 Jan 21.
https://www.cell.com/molecular-cell/pdfExtended/S1097-2765(15)01005-9

Infine, è stato scoperto che le 3'-UTR sono in grado di mediare le interazioni proteina-proteina (PPI), con una ricaduta sulla formazione del complesso proteico, la localizzazione e le funzioni delle proteine [51] e regolano l'espressione genica attraverso il legame delle proteine leganti l'RNA (RBP). [52]
Le RBP si legano agli elementi *cis* delle 3'-UTR e mediano le funzioni delle 3'-UTR attraverso il reclutamento di proteine effettrici.
Lo stato cellulare determina le RBP che sono in grado di accedere alle 3'-UTR in un dato momento, pertanto, le funzioni delle 3'-UTR possono essere valutate solo nel contesto delle loro RBP con cui sono associate.
La composizione delle RBP legate a una 3'-UTR in un dato momento è dinamica e può cambiare a seconda dell'ambiente locale, ad esempio, attraverso l'aggiunta di modifiche post-traduzionali (PTM), l'espressione locale di altre RBP con cui si legano per consentire la specificità funzionale in vivo e le interazioni con membrane e filamenti del citoscheletro [53].

Kocabas A, Duarte T, Kumar S, Hynes MA.
Widespread Differential Expression of Coding Region and 3' UTR Sequences in Neurons and Other Tissues.
Neuron. 2015 Dec 16;88(6):1149-1156. doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.048.
https://www.cell.com/neuron/pdfExtended/S0896-6273(15)00978-2

Mercer TR, Wilhelm D, Dinger ME, Soldà G, Korbie DJ, Glazov EA, Truong V, Schwenke M, Simons C, Matthaei KI, Saint R, Koopman P, Mattick JS.
Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions.
Nucleic Acids Res. 2011 Mar;39(6):2393-403. doi: 10.1093/nar/gkq1158. Epub 2010 Nov 12. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3064787/

[51] Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R.
Global analysis of yeast mRNPs.
Nat Struct Mol Biol. 2013 Jan;20(1):127-33. doi: 10.1038/nsmb.2468. Epub 2012 Dec 9.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537908/

Berkovits BD, Mayr C.
Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization.
Nature. 2015 Jun 18;522(7556):363-7. doi: 10.1038/nature14321. Epub 2015 Apr 20.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4697748/

Duncan CD, Mata J.
Widespread cotranslational formation of protein complexes.
PLoS Genet. 2011 Dec;7(12):e1002398. doi: 10.1371/journal.pgen.1002398. Epub 2011 Dec 1.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228823/

Halbach A, Zhang H, Wengi A, Jablonska Z, Gruber IM, Halbeisen RE, Dehé PM, Kemmeren P, Holstege F, Géli V, Gerber AP, Dichtl B.
Cotranslational assembly of the yeast SET1C histone methyltransferase complex.
EMBO J. 2009 Oct 7;28(19):2959-70. doi: 10.1038/emboj.2009.240. Epub 2009 Aug 27.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2760116/

[52] Baltz AG, et al
The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. Mol Cell. 2012 Jun 8;46(5):674-90. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.021.
https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2812%2900437-6

Castello A, Fiset al
Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins.
Cell. 2012 Jun 8;149(6):1393-406. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.031. Epub 2012 May 31.
https://www.cell.com/cell/pdfExtended/S0092-8674(12)00576-4

Hogan DJ, Riordan DP, Gerber AP, Herschlag D, Brown PO.
Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system.
PLoS Biol. 2008 Oct 28;6(10):e255. doi: 10.1371/journal.pbio.0060255.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2573929/

Mitchell SF, Jain S, She M, Parker R.
Global analysis of yeast mRNPs.
Nat Struct Mol Biol. 2013 Jan;20(1):127-33. doi: 10.1038/nsmb.2468. Epub 2012 Dec 9.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3537908/
[53] Jansen RP.
RNA-cytoskeletal associations.
FASEB J. 1999 Mar;13(3):455-66. PMID: 10064612.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10064612/

Jansen RP, Niessing D, Baumann S, Feldbrügge M.
mRNA transport meets membrane traffic.
Trends Genet. 2014 Sep;30(9):408-17. doi: 10.1016/j.tig.2014.07.002. Epub 2014 Aug 7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25110341/

Singh G, Pratt G, Yeo GW, Moore MJ.

Infine, il legame delle RBP è anche influenzato dalla struttura dell'RNA secondario e terziario che regola l'accessibilità della 3'-UTR [54].

Coda Poli-Adenilata

Uno degli ultimi passaggi della trascrizione dell'mRNA è l'aggiunta di una coda poli-A, che di solito è di circa 250 unità di lunghezza nei Metazoi.
Tuttavia, i recenti progressi nel sequenziamento dell'RNA mettono in dubbio questo dogma: i geni altamente espressi, quindi mRNA presenti in natura con una forte efficienza traduzionale, ricchi di codoni e associazione ribosomiale ottimali, contengono le code poli-A più corte. [55]
Secondo il modello di pruning ("accorciamento"), la proteina poli-A-binding (PABP) prossimale al 3'-UTR negli mRNA stabili è strettamente associata al 5'-cap tramite i fattori di inizio della traduzione eiF4G ed eiF4E, favorendo la formazione di una struttura circolare chiusa (modello closed-loop * vedi figura pag. 75) ed una traduzione efficiente.

** Il modello più sofisticato per l'inizio della traduzione attualmente è il cosiddetto **modello "closed-loop"**, in cui una circolarizzazione dell'mRNA è mediata da proteine che si legano ai 5'-cap e 3'-poly (A).*
A seconda delle interazioni differenziali, questo evento può provocare stimolazione o repressione traslazionale.

Le molteplici interazioni proteina-proteina e proteina-RNA presenti nella struttura circolare chiusa impediscono un'ulteriore deadenilazione del trascritto e la degradazione dell'mRNA.

https://escholarship.org/content/qt6cp950hv/qt6cp950hv_noSplash_03fa99c2eb7b8090b5eb49be4f901351.pdf?t=oil1l7
Sintesi, elaborazione e traduzione di mRNA. Gli mRNA vengono trascritti dall'RNA Pol II nel nucleo. Le trascrizioni nascenti passano attraverso un processo di maturazione co-trascrizionale che coinvolge il 5'-capping, la giunzione di introni, il clivaggio in 3' e poliadenilazione. Due complessi leganti l'RNA sono responsabili della promozione della scissione e della poliadenilazione. Il CPSF (fattore di specificità di scissione e poliadenilazione) riconosce il PAS (segnale di poliadenilazione) e il CSTF (fattore di stimolazione della scissione) interagisce con il DSE (downstream sequence element). Una volta che entrambi questi fattori sono ancorati all'mRNA, un'endonucleasi nella CPSF (fattore di speicificità della poliadenilazione) scinde il messaggero tra i due elementi della sequenza. Il CPSF recluta quindi PAP (poli (A) polimerasi) per estendere una coda di adenosine non contemplate fino alla fine dell'mRNA. La coda in crescita è rivestita con la proteina legante il poli (A) nucleare (PABPN). Dopo aver completato l'elaborazione, le trascrizioni mature vengono esportate nel citoplasma, dove PABPN viene sostituito con la sua controparte citoplasmatica, PABP. Durante la traduzione, PABP interagisce con il fattore di iniziazione cap-bound eIF4G, migliorando l'efficienza della traduzione e il riciclaggio dei ribosomi promuovendo la circolarizzazione del messaggero.

The Clothes Make the mRNA: Past and Present Trends in mRNP Fashion.
Annu Rev Biochem. 2015;84:325-54. doi: 10.1146/annurev-biochem-080111-092106. Epub 2015 Mar 11.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4804868/

[54] Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP.
Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs.
Elife. 2015 Aug 12;4:e05005. doi: 10.7554/eLife.05005.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4532895/

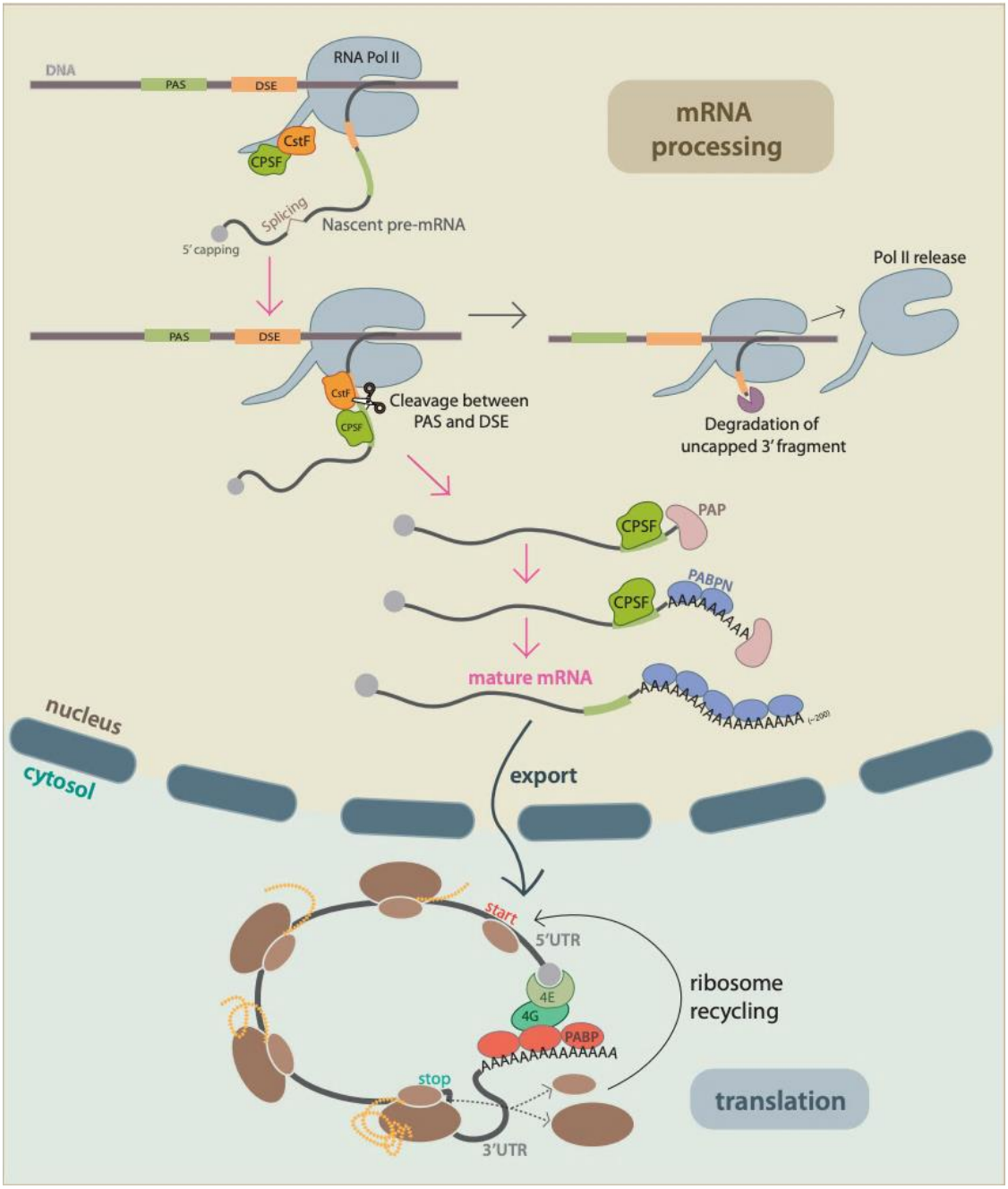
Grimson A, Srivastava M, Fahey B, Woodcroft BJ, Chiang HR, King N, Degnan BM, Rokhsar DS, Bartel DP.
Early origins and evolution of microRNAs and Piwi-interacting RNAs in animals.
Nature. 2008 Oct 30;455(7217):1193-7. doi: 10.1038/nature07415. Epub 2008 Oct 1.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3837422/

Kim D, Kim J, Baek D.
Global and local competition between exogenously introduced microRNAs and endogenously expressed microRNAs.
Mol Cells. 2014 May;37(5):412-7. doi: 10.14348/molcells.2014.0100. Epub 2014 May 13.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4044313/

Taliaferro JM, Lambert NJ, Sudmant PH, Dominguez D, Merkin JJ, Alexis MS, Bazile C, Burge CB. RNA Sequence Context Effects Measured In Vitro Predict In Vivo Protein Binding and Regulation.
Mol Cell. 2016 Oct 20;64(2):294-306. doi: 10.1016/j.molcel.2016.08.035. Epub 2016 Oct 6.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5107313/

[55] Lima SA, Chipman LB, Nicholson AL, et al.
Short poly(A) tails are a conserved feature of highly expressed genes.
Nat Struct Mol Biol. 2017;24(12):1057-1063. doi:10.1038/nsmb.3499
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5877826/

Zlotorynski, E.
The short tail that wags the mRNA.
Nat Rev Mol Cell Biol 19, 2–3 (2018). https://doi.org/10.1038/nrm.2017.120
https://www.nature.com/articles/nrm.2017.120



Secondo studi precedenti, erano preferibili sequenze lunghe di poli-A per la stabilità dell'mRNA.
Le sequenze Poly-A di 120 unità forniscono degli IVT-mRNA più stabili e una traduzione più efficiente rispetto alle code più corte nelle DC derivate da monociti umani [56], e nelle cellule T primarie umane una coda poli-A più lunga di 300 nucleotidi è più favorevole per una traduzione efficiente. [57]

Questi risultati non sono in contraddizione con il modello di pruning poiché gli IVT-mRNA con code poli-A medie e lunghe possono inizialmente reclutare PABP ed essere accorciati a una coda di 30 A.

[56] Holtkamp S, Kreiter S, Selmi A, Simon P, Koslowski M, Huber C, Türeci O, Sahin U.
Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells.
Blood. 2006 Dec 15;108(13):4009-17. doi: 10.1182/blood-2006-04-015024. Epub 2006 Aug 29.
https://ashpublications.org/blood/article/108/13/4009/6595/Modification-of-antigen-encoding-RNA-increases

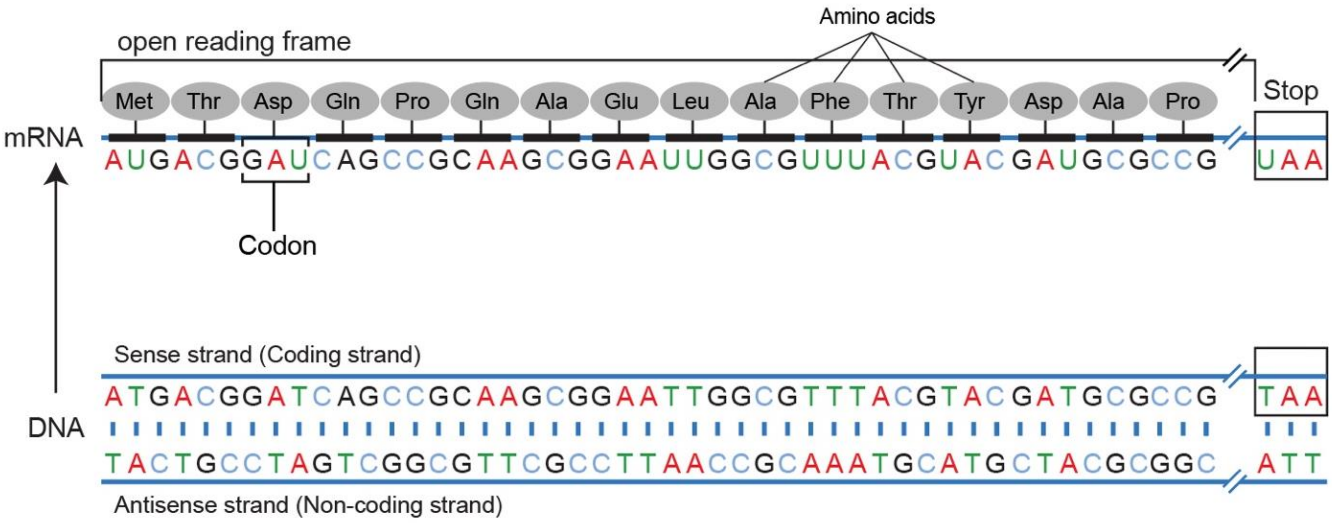
[57] Grier AE, Burleigh S, Sahni J, et al.
pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences.
Mol Ther Nucleic Acids. 2016;5(4):e306. Published 2016 Apr 19. doi:10.1038/mtna.2016.21
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5014522/

Ulteriori studi dovrebbero valutare il ruolo della dimensione del poli-A per l'espressione dell'antigene IVT-mRNA nel corso del tempo, in quanto idealmente, l'espressione dell'antigene dovrebbe essere ottenuta una volta che le APC migrano verso il linfonodo drenante.

Regioni tradotte

Sono stati eseguiti diversi approcci per modificare la sequenza ORF (open reading frame) * per migliorare l'efficienza trascrizionale e per impedire una forte reazione immunitaria innata dovuta al riconoscimento dei PRR.

** Codoni con funzioni specifiche*
- ***Codone d'inizio (AUG)**: segnala l'inizio delle catene polipeptidiche in tutte le cellule; codifica per l'AA METIONINA.*
- ***Codoni di terminazione**: sono tre (UAA, UAG, UGA) e non codificano per alcun AA. Essi segnalano la fine della catena polipetidica.*
- ***Open Reading Frame (ORF)** denominata anche Quadro di lettura aperto. Si ha se un quadro non presenza un codone di terminazione per più di 50 nucleotidi consecutivi.*
- ***Degenerazione del codice**: è forse la caratteristica più sorprendente del codice genetico. Ad ogni singolo AA può corrispondere più di un codone. La differenza si realizza di solito a carico del terzo nucleotide.*



L'ORF può essere modificato a livello di codone (bias di utilizzo del codone) per regolare la velocità di allungamento della traduzione o tramite il contenuto GC per evitare strutture secondarie, ed è stata valutata l'ottimizzazione del codone per migliorare la traduzione e la stabilità dell'mRNA. [58]
Esistono diverse strategie per l'ottimizzazione del codone; ad esempio, l'uso dei codoni più frequenti per ogni amminoacido, o anche l'utilizzo di codoni con maggiore abbondanza di tRNA. [59]

[58] Hanson G, Coller J.
Codon optimality, bias and usage in translation and mRNA decay.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2018;19(1):20-30. doi:10.1038/nrm.2017.91
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6594389/

Mauro VP.
Codon Optimization in the Production of Recombinant Biotherapeutics: Potential Risks and Considerations.
BioDrugs. 2018 Feb;32(1):69-81. doi: 10.1007/s40259-018-0261-x.
https://link.springer.com/article/10.1007/s40259-018-0261-x

Mauro VP, Chappell SA.
A critical analysis of codon optimization in human therapeutics.
Trends Mol Med. 2014;20(11):604-613. doi:10.1016/j.molmed.2014.09.003
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4253638/

[59] Fuglsang A.
Codon optimizer: a freeware tool for codon optimization.
Protein Expr Purif. 2003 Oct;31(2):247-9. doi: 10.1016/s1046-5928(03)00213-4.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14550643/

Un'altra strategia è ottimizzare l'utilizzo del di-codone, cioè utilizzare le migliori coppie di codoni che sono ottimali insieme. [60]

Una terza strategia consiste nel modificare la sequenza ORF in modo da avere lo stesso rapporto di ogni codone che si trova naturalmente nelle proteine altamente espresse delle specie e cellule bersaglio.
L'ottimizzazione del codone aumenta i tassi di traduzione [61] e i codoni ottimali vicino al codone di inizio aumentano i tassi di allungamento [62], fornendo alti livelli di traduzione dell'mRNA.
Al contrario, i codoni rari forniscono un basso tasso di allungamento che favorisce l'affollamento dei ribosomi.
Questo allungamento alterato consente il legame di un'elicasi di RNA DEAD-Box al trascritto e accelera il decadimento dell'mRNA dopo il decapaggio del 5' [63].

Tuttavia, i tassi di allungamento rapidi non sono sempre vantaggiosi.
Potrebbero impedire un adeguato ripiegamento della proteina codificata, come mostrato in un mRNA di luciferasi ottimizzato per il codone che ha perso il 50% della sua attività [64]. Codoni meno frequenti potrebbero fornire una velocità di traduzione inferiore e quindi un ripiegamento proteico adeguato, importante per ottenere una conformazione antigenica adeguata. Pertanto, a seconda dell'antigene, possono essere utilizzate diverse strategie del codone.

L'ottimizzazione di tutti i codoni può essere interessante nel caso di vaccini a mRNA basati su epitopi lineari.
Al contrario, antigeni complessi possono richiedere velocità di traduzione più lente per ripiegare i domini proteici critici.
In ogni caso, l'uso di codoni rari dovrebbe essere evitato in entrambe le strategie per ottimizzare l'espressione della proteina. [65]
Inoltre, il contenuto di GC può modificare l'espressione proteica influenzando la traduzione a seconda dello stadio di differenziazione cellulare; [66] ne segue che il contenuto di GC nei vaccini a mRNA potrebbe essere importante per le cellule immunitarie bersaglio a seconda dello stato cellulare (ad esempio monociti vs macrofagi).
L'esaurimento dell'uridina, che può essere collegato a un aumento del contenuto di GC, ha mostrato un miglioramento

[60] Alexaki A, et al
Codon and Codon-Pair Usage Tables (CoCoPUTs): Facilitating Genetic Variation Analyses and Recombinant Gene Design.
J Mol Biol. 2019 Jun 14;431(13):2434-2441. doi: 10.1016/j.jmb.2019.04.021. Epub 2019 Apr 26.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31029701/

[61] Yan X, Hoek TA, Vale RD, Tanenbaum ME.
Dynamics of Translation of Single mRNA Molecules In Vivo.
Cell. 2016 May 5;165(4):976-89. doi: 10.1016/j.cell.2016.04.034.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4889334/

[62] Chu D, Kazana E, Bellanger N, Singh T, Tuite MF, von der Haar T.
Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs.
EMBO J. 2014;33(1):21-34. doi:10.1002/embj.201385651
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3990680/

[63] Radhakrishnan A, Chen YH, Martin S, Alhusaini N, Green R, Coller J.
The DEAD-Box Protein Dhh1p Couples mRNA Decay and Translation by Monitoring Codon Optimality.
Cell. 2016;167(1):122-132.e9. doi:10.1016/j.cell.2016.08.053
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5635654/

[64] Spencer PS, Siller E, Anderson JF, Barral JM.
Silent substitutions predictably alter translation elongation rates and protein folding efficiencies.
J Mol Biol. 2012;422(3):328-335. doi:10.1016/j.jmb.2012.06.010
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3576719/

[65] Al-Hawash, Adnan & Zhang, Xiaoyu & Ma, Fuying.
Strategies of codon optimization for high-level heterologous protein expression in microbial expression systems.
Gene Reports. (2017) 9. 10.1016/j.genrep.2017.08.006.
https://www.researchgate.net/publication/319389242_Strategies_of_codon_optimization_for_high-level_heterologous_protein_expression_in_microbial_expression_systems

[66] Bornelöv S, Selmi T, Flad S, Dietmann S, Frye M.
Codon usage optimization in pluripotent embryonic stem cells.
Genome Biol. 2019;20(1):119. Published 2019 Jun 7. doi:10.1186/s13059-019-1726-z
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6555954/

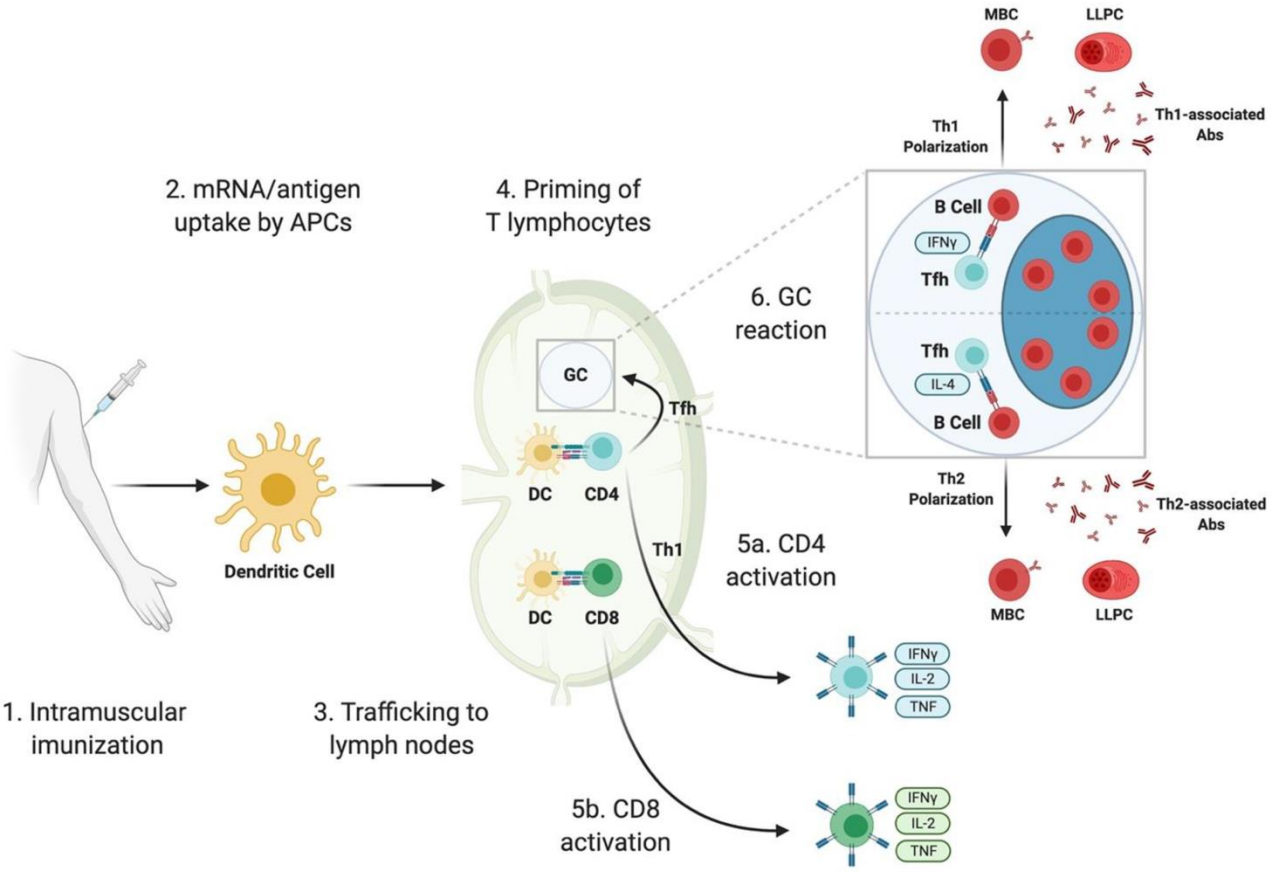
dell'espressione proteica nell'IVT-mRNA, in quanto le regioni ricche di uridina sono riconosciute dal RIG-I e la sua attivazione blocca il meccanismo della traduzione. [67]

Infine, le strutture secondarie dell'mRNA possono svolgere un ruolo importante nella traduzione dell'mRNA. Ad esempio, dovrebbero essere evitate strutture secondarie altamente stabili e anelli a forcina.
Queste strutture possono impedire l'ingresso, la scansione e l'allungamento dei ribosomi ed essere riconosciute come PAMP dal sistema immunitario innato.

OTTIMIZZAZIONE DELLA PRODUZIONE DI IVT-mRNA PER LA STIMOLAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA

Per un vaccino ad mRNA iniettabile, le principali considerazioni sull'efficacia includono quanto segue: [68]

1) il livello di espressione dell'antigene nelle cellule presentanti l'antigene professionale (APC), il quale è influenzato dall'efficienza del vettore, dalla presenza di pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) sotto forma di RNA a doppio filamento (dsRNA) o nucleosidi non modificati e dal livello di ottimizzazione della sequenza di RNA (utilizzo del codone, contenuto G:C, regioni 5' e 3' non tradotte (UTR) ect);
2) maturazione e migrazione delle cellule dendritiche (DC) al tessuto linfoide secondario, favorite dai PAMP;
3) la capacità del vaccino di attivare risposte robuste delle cellule T helper follicolari (T_{FH}) e del centro germinale (GC), un'area che rimane tuttora scarsamente compresa.



https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/147/htm

[67] Vaidyanathan S, Azizian KT, Haque AKMA, et al.
Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification.
Mol Ther Nucleic Acids. 2018;12:530-542. doi:10.1016/j.omtn.2018.06.010
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6076213/

[68] Bettini E, Locci M.
SARS-CoV-2 mRNA Vaccines: Immunological Mechanism and Beyond.
Vaccines. 2021; 9(2):147. https://doi.org/10.3390/vaccines9020147
https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/147/htm

Risposte immunitarie provocate dai vaccini mRNA SARS-CoV-2. I vaccini SARS-CoV-2 mRNA vengono somministrati per via intramuscolare (1). O mRNA-LNP o antigene prodotto localmente vengono assorbiti dalle cellule presentanti l'antigene (APC) (2), come le cellule dendritiche (DC). Questi APC trasferiscono quindi ai linfonodi (3) dove sono in grado di innescare i linfociti T CD4 e CD8 (4). Gli eventi in (2) - (4) sono esaminati in dettaglio in [36]. Il priming delle cellule T CD8 può indurre la formazione di linfociti T citotossici (5b) in grado di uccidere direttamente le cellule infette. Le cellule T CD4 innescate dall'antigene possono differenziarsi in cellule Th1 (5a) o cellule T helper follicolare (Tfh). Le cellule Tfh aiutano ad avviare una reazione del centro germinale (GC) (6). Le reazioni GC indotte dalla vaccinazione risulteranno nella formazione di cellule B della memoria maturate per affinità (MBC) e di plasmacellule a lunga vita (LLPC) che secernono anticorpi. Le cellule Tfh possono essere inclinate verso un fenotipo Th1 o Th2, il che influenzerà il passaggio di classe degli anticorpi (Abs) prodotti dagli LLPC agli Abs associati a Th1 o Th2 (6).

Approfondimento Il centro germinale (GC) e le cellule T helper follicolari (T_{FH})

La maggior parte dei vaccini antimicrobici più potenti induce risposte anticorpali di lunga durata contro il patogeno bersaglio.
Gli anticorpi ad alta affinità vengono prodotti in siti microanatomici specializzati all'interno dei follicoli delle cellule B presenti negli organi linfoidi secondari chiamati centri germinali (*GC*).
La proliferazione delle cellule B, l'ipermutazione somatica e la selezione di anticorpi ad alta affinità si verificano nei GC e per questi processi è necessario un aiuto efficiente delle cellule T. [69]

Le cellule T_{FH} rappresentano un sottoinsieme specializzato di cellule T $CD4^+$ che producono segnali critici per la sopravvivenza, la proliferazione e la differenziazione delle cellule B oltre a segnali per la commutazione isotipica degli anticorpi e per l'introduzione di mutazioni diversificanti nei geni delle immunoglobuline. [70]

Le cellule T_{FH} sono prevalentemente residenti nei linfonodi (LN) e nella milza (tranne in situazioni patologiche come si vedrà sotto nell'interazione tra microbiota e cellule T_{FH}) perché il loro scopo primario è aiutare le cellule B, mentre le cellule effettrici non T_{FH} come Th1, Th2, Th17, le cellule T CD4 citotossiche o le cellule Th9 sono prevalentemente destinate a lasciare il tessuto linfoide e a spostarsi verso i siti di infezione o infiammazione, in quanto le azioni in questi siti sono lo scopo principale della maggior parte delle cellule non-T_{FH}.
L'aiuto fornito dalle cellule *GC*-T_{FH} alle cellule *GC*-B è mediato dal CXCL13, oltre che alle citochine più ampiamente espresse come l'IL-2 e il TNF. La combinazione dell'espressione di IL-21, IL-4 e CD40L da parte delle cellule *GC*-T_{FH} supporta in maniera efficiente le cellule *GC*-B. [71]

Le interazioni tra le T_{FH} e le cellule *GC*-B assomigliano alle connessioni cellulari e alla comunicazione sinaptica all'interno del sistema nervoso, che consentono ai segnali di essere trasdotti rapidamente ed efficacemente attraverso la fessura sinaptica.
Tali "sinapsi immunologiche" sono particolarmente critiche nel *GC* dove la velocità delle interazioni delle cellule T-B è maggiore e la loro durata è più breve che in altri siti.
Nel contesto dei *GC*, che contengono un gran numero di cellule in una struttura altamente compatta, il rilascio mirato di segnali tra le cellule interagenti diventa particolarmente importante.
l rilascio promiscuo o da parte di terzi di segnali di selezione positivi potrebbe potenzialmente portare alla comparsa di cloni di cellule B auto-reattivi di lunga durata.

---

[69] Biram A, Davidzohn N, Shulman Z.
T cell interactions with B cells during germinal center formation, a three-step model.
Immunol Rev. 2019 Mar;288(1):37-48. doi: 10.1111/imr.12737.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30874355/

[70] Crotty S.
T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases.
Immunity. 2019 May 21;50(5):1132-1148. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.011.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6532429/

[71] Crotty S.
T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease.
Immunity. 2014 Oct 16;41(4):529-42. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.004.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4223692/

Weinstein JS, Herman EI, Lainez B, et al.
T_{FH} cells progressively differentiate to regulate the germinal center response.
Nat Immunol. 2016;17(10):1197-1205. doi:10.1038/ni.3554
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030190/

È stato dimostrato che le citochine, i granuli citotossici e più recentemente i neurotrasmettitori vengono trasferiti dalle T_{FH} alle cellule B in seguito ad interazioni specifiche.[72]

Le cellule T_{FH} nelle malattie infettive, autoimmuni e nelle vaccinazioni

La funzione principale delle cellule T_{FH} è quella di fornire protezione dalle malattie infettive, in quanto facilitano le risposte anticorpali alle infezioni virali, batteriche, parassitarie e fungine.
Ad esempio, la risposta IgG all'infezione da virus vaccinico è ridotta del 98% in assenza di cellule T_{FH}.[73]

I dati degli studi sulle infezioni indicano un ruolo primario delle cellule T_{FH} nel limitare lo sviluppo di cellule B autoreattive.
Sebbene le cellule T_{FH} siano rare all'inizio (giorno 10) nell'influenza o nell'infezione da LCMV, si accumulano in maniera sostanziale nel tempo (giorno 30) e prevengono lo sviluppo di cellule B autoreattive (anti-istone) [74].
Questa azione regolatoria è di grande rilevanza nella prevenzione o, in caso di disregolazione, di induzione di malattie autoimmuni. [75]

Un'espansione esagerata delle cellule T_{FH} si traduce in un'eccessiva reazione del centro germinale, con la proliferazione delle cellule B autoreattive, un eccesso nella differenziazione di plasmacellule a lunga vita, nonché una sovrapproduzione di autoanticorpi patogeni ad alta affinità.
L'abbondanza patologica di cellule T_{FH} potrebbe fornire un supporto cruciale per la sopravvivenza dei linfociti B auto-reattivi affini e per sfuggire ai punti di controllo della tolleranza nel centro germinale.

L'alterazione delle cellule T_{FH} è stata segnalata in pazienti con varie malattie autoimmuni, come artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico e malattie tiroidee autoimmuni, dove le cellule T_{FH} sono presenti con maggiore frequenza e mostrano una correlazione positiva con il titolo sierico di autoanticorpi.[76]

---

[72] Papa I, Vinuesa CG.
Synaptic Interactions in Germinal Centers.
Front Immunol. 2018;9:1858. Published 2018 Aug 13. doi:10.3389/fimmu.2018.01858
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6099157/

[73] Xiao N, Eto D, Elly C, Peng G, Crotty S, Liu YC.
The E3 ubiquitin ligase Itch is required for the differentiation of follicular helper T cells.
Nat Immunol. 2014;15(7):657-666. doi:10.1038/ni.2912
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4289613/

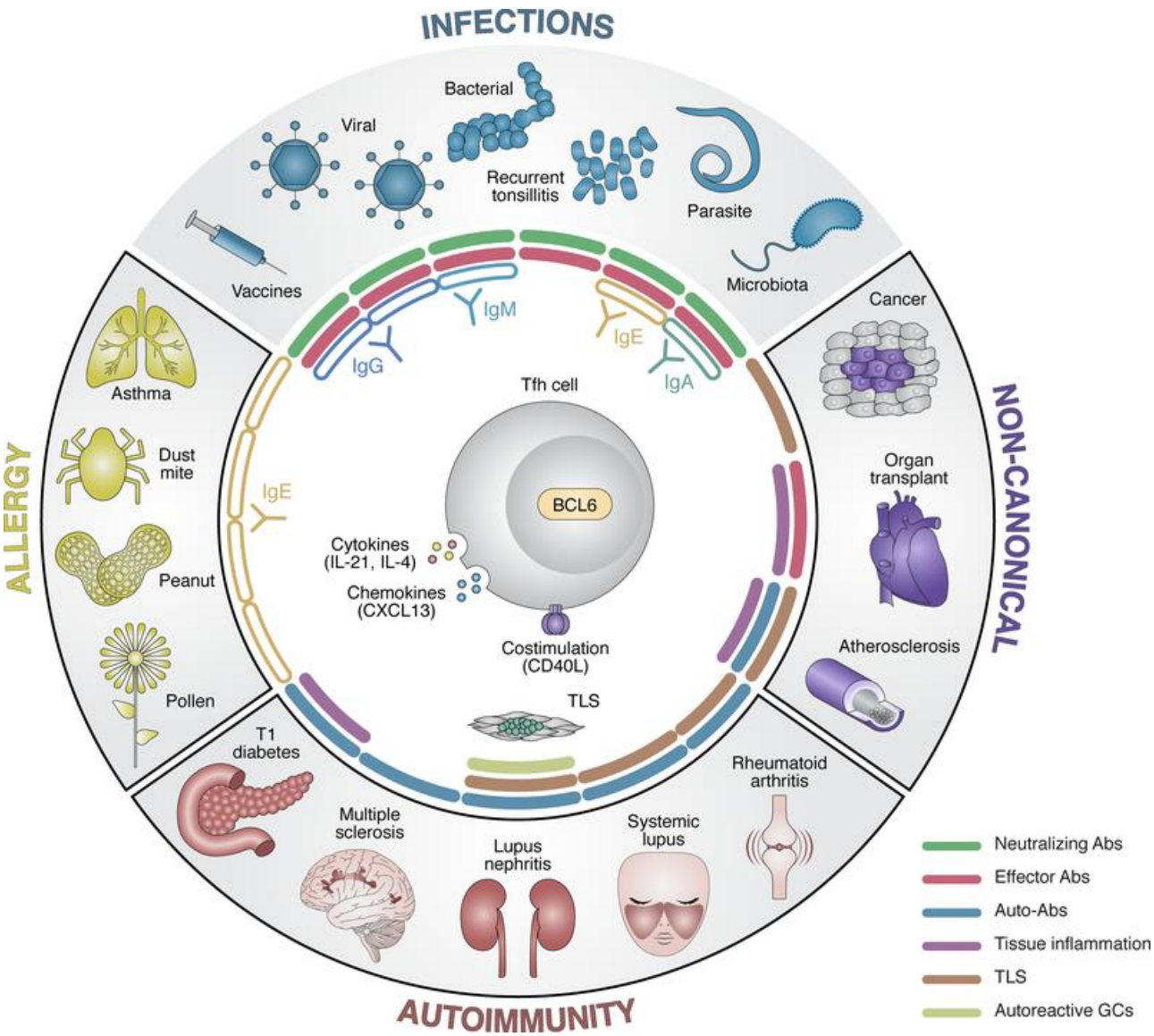
[74] Botta D, Fuller MJ, Marquez-Lago TT, et al.
Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection.
Nat Immunol. 2017;18(11):1249-1260. doi:10.1038/ni.3837
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5679073/

[75] Seth A, Craft J.
Spatial and functional heterogeneity of follicular helper T cells in autoimmunity.
Curr Opin Immunol. 2019 Dec;61:1-9. doi: 10.1016/j.coi.2019.06.005. Epub 2019 Jul 30.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31374450/

Dong L, He Y, Cao Y, Wang Y, Jia A, Wang Y, Yang Q, Li W, Bi Y, Liu G.
Functional differentiation and regulation of follicular T helper cells in inflammation and autoimmunity.
Immunology. 2020 Oct 31. doi: 10.1111/imm.13282. Epub ahead of print.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33128768/

Park HJ, Kim DH, Lim SH, Kim WJ, Youn J, Choi YS, Choi JM.
Insights into the role of follicular helper T cells in autoimmunity.
Immune Netw. 2014 Feb;14(1):21-9. doi: 10.4110/in.2014.14.1.21. Epub 2014 Feb 21.
https://immunenetwork.org/DOIx.php?id=10.4110/in.2014.14.1.21

[76] Mesquita D Jr, Cruvinel WM, Resende LS, Mesquita FV, Silva NP, Câmara NO, Andrade LE.
Follicular helper T cell in immunity and autoimmunity.
Braz J Med Biol Res. 2016;49(5):e5209. doi: 10.1590/1414-431X20165209. Epub 2016 Apr 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4843212/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6532429/

L'importante ruolo delle cellule T_{FH} nelle risposte immunitarie ai vaccini è parallelo a quello nello sviluppo delle risposte immunitarie alle infezioni da patogeni, di conseguenza sono in corso di sviluppo nuovi adiuvanti e piattaforme vaccinali in grado di attivare in modo potente questo tipo di cellule.

In particolare, è stato recentemente dimostrato che la piattaforma del vaccino m1Ψ-mRNA-LNP induce forti risposte immunitarie delle cellule T_{FH} e *GC*-B, che generano alti livelli di anticorpi vaccinali neutralizzanti a lunga durata nei topi e nei macachi rhesus.
Sono stati suggeriti due possibili azioni che contribuiscono a questo effetto: la produzione robusta e sostenuta di antigene dall'mRNA con nucleosidi modificati e gli effetti adiuvanti dell'LNP vaccinale che favoriscono l'attivazione delle cellule *GC*-B. [77]

Interazione tra le cellule T_{FH} e il microbiota

Oltre a facilitare l'immunità protettiva contro i patogeni, le cellule T_{FH} sono importanti regolatori del microbiota, grazie alla generazione di risposte IgA ad alta affinità nelle placche di Peyer, follicoli presenti nel tessuto linfoide associato

[77] Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, et al.
Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.
J Exp Med. 2018;215(6):1571-1588. doi:10.1084/jem.20171450
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29739835/

all'intestino (GALT) [78], ricche di *GC* contro i patogeni [79], e viceversa il microbiota intestinale influisce sulla biologia cellulare delle T_{FH} [80].

I batteri filamentosi segmentati ([SFB] Candidatus arthromitus) appartengono alla classe più aggressiva di microorganismi presenti all'interno del microbiota.
Questo organismo si è evoluto in una nicchia profonda attaccata alle cellule epiteliali dell'intestino tenue inferiore.
La posizione è ideale per gli SFB per raccogliere i molti amminoacidi di cui hanno bisogno dall'ospite o dalla dieta (il loro genoma ha eliminato i percorsi sintetici necessari).
Utilizzano strutture speciali chiamate "holdfasts" ("prese") per ancorarsi allo strato epiteliale ed evitare di essere espulsi nell'intestino crasso dove sarebbe molto più difficile soddisfare il fabbisogno di aminoacidi essenziali.[81]

Oltre a provocare risposte IgA estremamente efficaci (che sembrano limitare la crescita eccessiva durante la colonizzazione), gli SFB inducono una popolazione notevolmente specifica e numerosa di cellule TH17 della mucosa, che sebbene non sia direttamente proinfiammatoria, nelle giuste condizioni di suscettibilità può fornire il centro germinale necessario per generare l'artrite tramite autoanticorpi.

Una domanda urgente a cui si sta cercando di rispondere è il meccanismo con cui il microbiota intestinale predispone il proprio ospite alle malattie nei siti distali dall'intestino.

---

[78] Jung C, Hugot JP, Barreau F.
Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine.
Int J Inflam. 2010 Sep 19;2010:823710. doi: 10.4061/2010/823710.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3004000/

[79] Bunker JJ, Flynn TM, Koval JC, et al.
Innate and Adaptive Humoral Responses Coat Distinct Commensal Bacteria with Immunoglobulin A.
Immunity. 2015;43(3):541-553. doi:10.1016/j.immuni.2015.08.007
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4575282/

Kubinak JL, Petersen C, Stephens WZ, et al.
MyD88 signaling in T cells directs IgA-mediated control of the microbiota to promote health.
Cell Host Microbe. 2015;17(2):153-163. doi:10.1016/j.chom.2014.12.009
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4451207/

Proietti M, et al
ATP-gated ionotropic P2X7 receptor controls follicular T helper cell numbers in Peyer's patches to promote host-microbiota mutualism.
Immunity. 2014 Nov 20;41(5):789-801. doi: 10.1016/j.immuni.2014.10.010. Epub 2014 Nov 13.
https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(14)00386-0

Wei M, Shinkura R, Doi Y, Maruya M, Fagarasan S, Honjo T.
Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense.
Nat Immunol. 2011 Mar;12(3):264-70. doi: 10.1038/ni.1991. Epub 2011 Jan 23.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21258321/

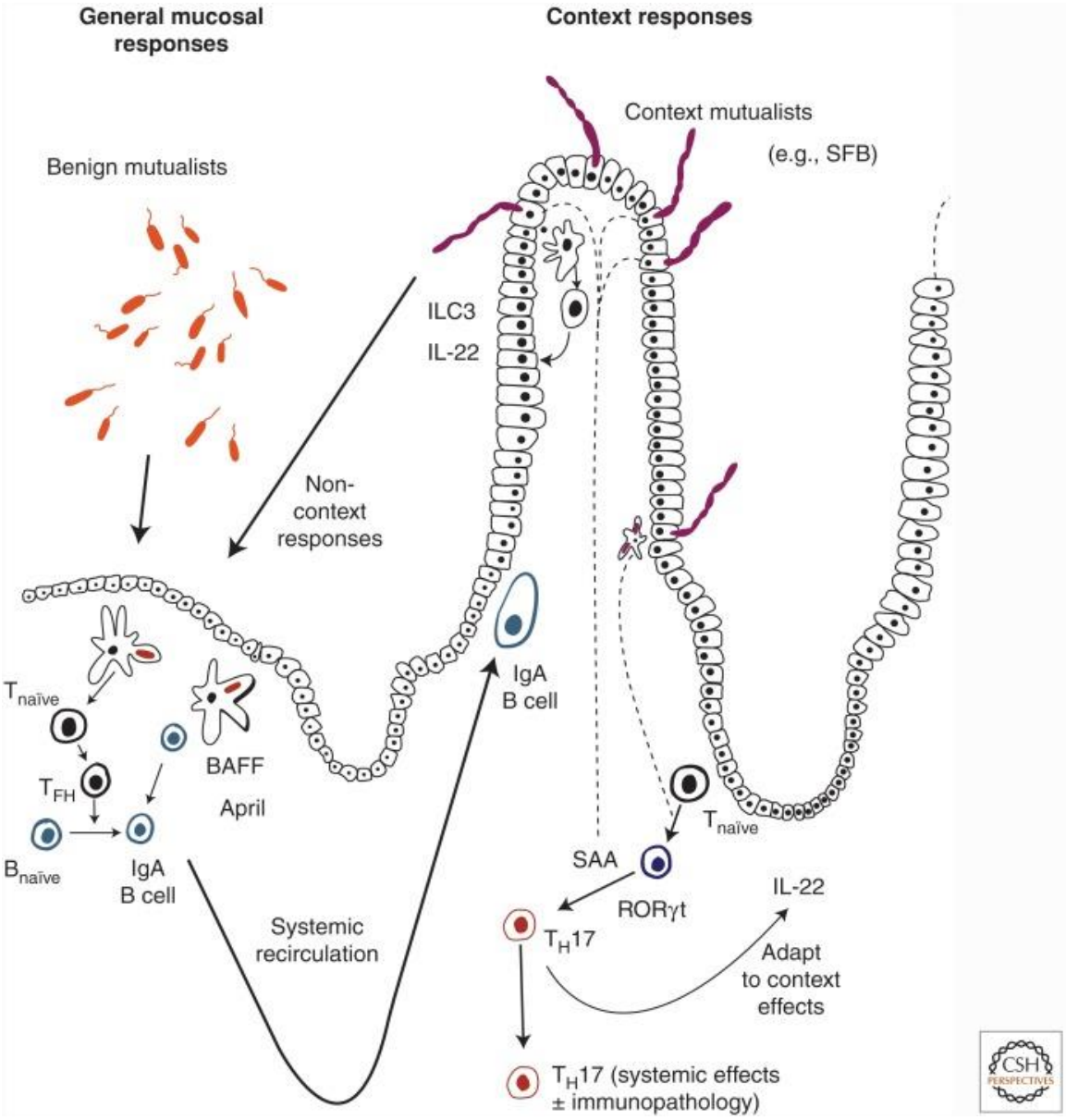
[80] Macpherson AJ.
Do the Microbiota Influence Vaccines and Protective Immunity to Pathogens? Issues of Sovereignty, Federalism, and Points-Testing in the Prokaryotic and Eukaryotic Spaces of the Host-Microbial Superorganism.
Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018;10(2):a029363. Published 2018 Feb 1. doi:10.1101/cshperspect.a029363
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793759/

Preite S, Cannons JL, Radtke AJ, et al.
Hyperactivated PI3Kδ promotes self and commensal reactivity at the expense of optimal humoral immunity.
Nat Immunol. 2018;19(9):986-1000. doi:10.1038/s41590-018-0182-3
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6140795/

81 Kuwahara T, et al
The lifestyle of the segmented filamentous bacterium: a non-culturable gut-associated immunostimulating microbe inferred by whole-genome sequencing.
DNA Res. 2011 Aug;18(4):291-303. doi: 10.1093/dnares/dsr022. Epub 2011 Jul 26.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158464/

Sczesnak A, Segata N, Qin X, Gevers D, Petrosino JF, Huttenhower C, Littman DR, Ivanov II.
The genome of th17 cell-inducing segmented filamentous bacteria reveals extensive auxotrophy and adaptations to the intestinal environment.
Cell Host Microbe. 2011 Sep 15;10(3):260-72. doi: 10.1016/j.chom.2011.08.005.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3209701/

Fei et al hanno affrontato questa domanda utilizzando un modello di artrite autoimmune per chiarire come i segnali autoimmuni generati nell'intestino dai commensali intestinali vengono trasposti ai siti sistemici. [82]
I risultati ottenuti hanno dimostrato che gli SFB aumentavano la popolazione di cellule T_{FH} non solo nelle placche di Peyer, ma anche in siti sistemici come la milza e i linfonodi poplitei drenanti (PLN).
Le risposte delle cellule T_{FH} indotte dagli SFB erano precedenti allo sviluppo dell'artrite e le cellule T_{FH} erano necessarie per il potenziamento dell'artrite autoimmune mediata dagli SFB, i quali aumentavano la popolazione di cellule T_{FH} sistemiche guidando la differenziazione e l'uscita delle cellule T_{FH} dalle PP in siti sistemici.
Questo processo era cruciale per lo sviluppo dell'artrite perché gli auto-anticorpi erano prodotti principalmente in siti sistemici e molto meno nelle PP. Agli autori hanno dimostrato che gli SFB induceva la differenziazione delle cellule T_{FH} nelle PP inibendo la via di segnalazione dell'IL-2 nelle PP e hanno identificato le DC come il tipo di cellula critico richiesto per l'induzione delle cellule T_{FH} mediata dagli SFB e la soppressione del recettore IL-2 α (IL-2Rα) nelle PP.

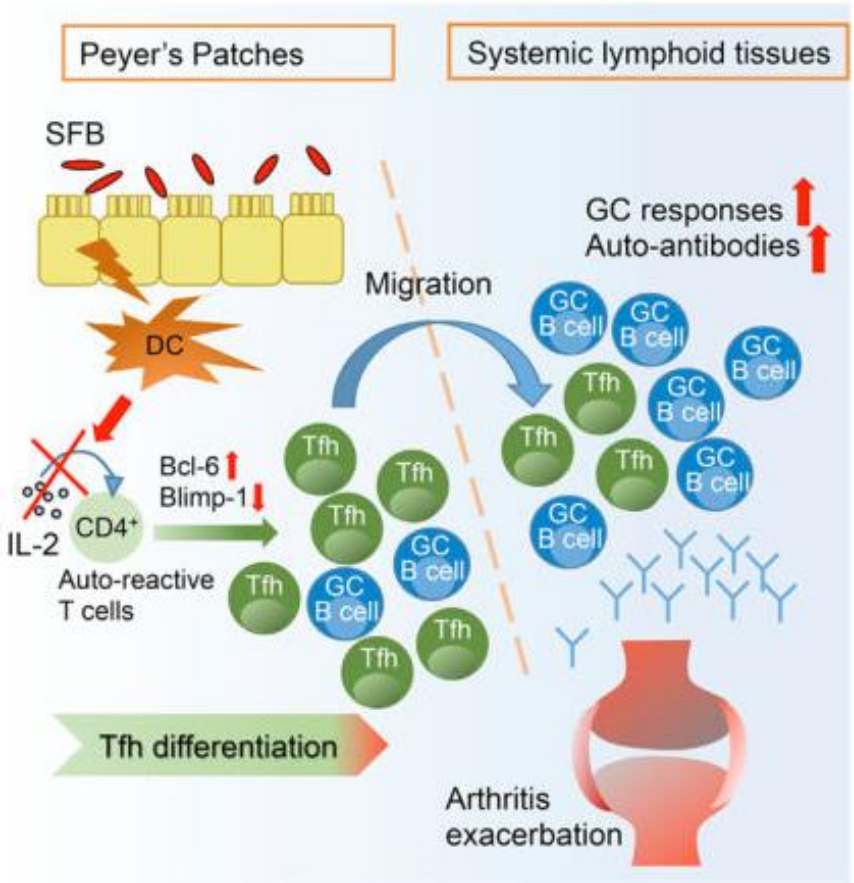


https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5793759/
Induzione delle risposte immunitarie da parte dei membri del microbiota intestinale. L'entità e il carattere dell'induzione della risposta immunitaria della mucosa da parte del microbiota variano a seconda dell'organismo interessato. Mutualisti benigni non infiammatori che risiedono nel lume o confinati agli strati esterni di muco inducono risposte dei linfociti B e T all'interno delle strutture linfoidi dell'intestino e dei suoi linfonodi drenanti. Questi sono in gran parte concentrati sulla mucosa stessa, perché i linfociti indotti tornano principalmente nell'intestino dopo il ricircolo sistemico attraverso i vasi linfatici e il flusso sanguigno. Le risposte delle cellule B possono essere indotte con l'aiuto delle cellule T o in seguito alla stimolazione diretta delle cellule B da parte del fattore di attivazione delle cellule

[82] Teng F, Klinger CN, Felix KM, Bradley CP, Wu E, Tran NL, Umesaki Y, Wu HJ.
Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells.
Immunity. 2016 Apr 19;44(4):875-88. doi: 10.1016/j.immuni.2016.03.013.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5296410/

B della famiglia del fattore di necrosi tumorale (BAFF) e di un ligando che induce la proliferazione (APRIL) secreto dalle cellule mononucleate. All'altra estremità dello spettro, gli organismi con nicchie particolarmente intime inducono una serie di risposte immunitarie idiosincratiche aggiuntive. Un esempio sono i batteri filamentosi segmentati (SFB), che sono responsabili della generazione di una popolazione sostanziale di cellule TH17 specifiche della mucosa, con segnali dalla proteina sierica amiloide (SAA) secreta dalle cellule epiteliali che legano il microbo nell'intestino tenue inferiore. L'SFB induce anche IgA specifiche, che limitano la crescita eccessiva durante la colonizzazione. Lo strato epiteliale a cui è attaccato SFB è sostenuto dall'interleuchina (IL) -22 secreta dalle cellule linfoidi innate di classe 3 (ILC3) attraverso un ciclo di feedback. Sebbene le cellule TH17 indotte da SFB non siano infiammatorie, nelle condizioni favorevoli della predisposizione autoimmune del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), possono potenziare l'artrite autoimmune dipendente dalle cellule B.

Un aspetto centrale di questa ricerca è che le cellule T_{FH} delle PP potrebbero agire come il "segnale di controllo remoto" inviato dal microbiota intestinale per regolare il sistema immunitario nei siti distali e mediare risposte autoimmuni intestinali distali; tali risultati sono stati supportati da un recente studio che rivede l'ipotesi errata di lunga data secondo cui le cellule T_{FH} sono confinate nei *GC* da cui derivano. [83]



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5296410/pdf/nihms776862.pdf

Ci sono probabilmente molteplici meccanismi attraverso i quali la variazione del microbiota intestinale può modificare la differenziazione o la funzione delle T_{FH}, e questa è un'area matura per studi futuri, data l'ampia rilevanza del microbiota nella fisiologia del sistema immunitario.

Le cellule T_{FH} nelle allergie

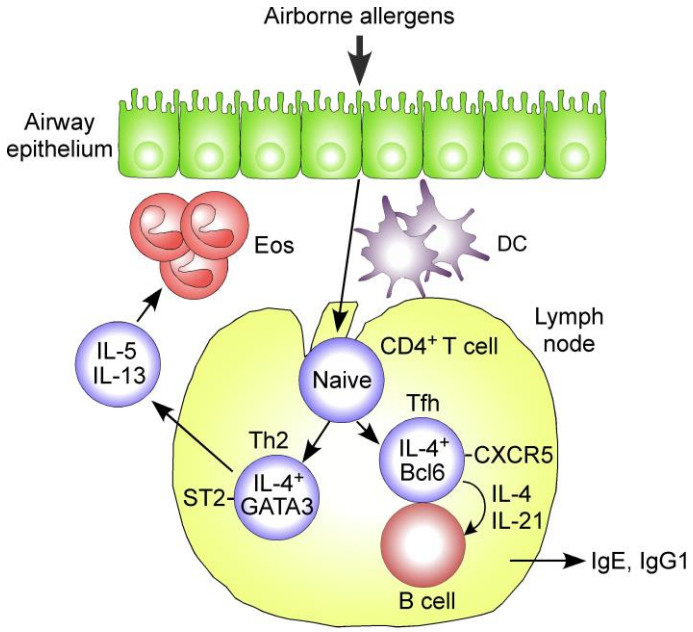
Nelle allergie mediate da anticorpi è necessaria l'azione delle cellule T_{FH}. Si presume ancora comunemente che le risposte IgE siano mediate dalle cellule Th2 [84], ma ciò non è corretto.

[83] Shulman Z, Gitlin AD, Targ S, Jankovic M, Pasqual G, Nussenzweig MC, Victora GD.
T follicular helper cell dynamics in germinal centers.
Science. 2013 Aug 9;341(6146):673-7. doi: 10.1126/science.1241680. Epub 2013 Jul 25.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3941467/

Kobayashi T, Iijima K, Dent AL, Kita H.
Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens.
J Allergy Clin Immunol. 2017;139(1):300-313.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.021
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5115999/

[84] Gould HJ, Ramadani F.

È stato dimostrato per la prima volta nel 2012, utilizzando una combinazione di approcci sperimentali in modelli murini di infezioni da elminti, che l'L-4 derivato da cellule T_{FH}, non l'IL-4 derivato da cellule Th2, era la fonte per l'induzione di IgE [85].
Inoltre, la maggior parte delle cellule T $CD4^+$ che producono IL-4 nei LN e nella milza sono cellule T_{FH}, mentre le cellule Th2 si trovano nei tessuti periferici.[86]



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5115999/

In uno studio recente, Kobayashi et al hanno esposto le vie aeree di topi naïve a citochine e allergeni naturali e hanno esaminato lo sviluppo di risposte immunitarie adattative di tipo 2.
Un nuovo concetto derivato da questa ricerca è che due componenti principali delle risposte immunitarie allergiche, la produzione di anticorpi IgE e le risposte delle citochine di tipo 2, erano regolate separatamente dalle cellule T_{FH} e Th2 *in vivo*.
Il modello convenzionale suggerisce che le cellule T $CD4^+$ di tipo Th2 svolgano un ruolo chiave in varie caratteristiche delle risposte immunitarie allergiche, tra cui la produzione di anticorpi IgE, la produzione di citochine di tipo 2, l'eosinofilia delle vie aeree e l'iperplasia delle mucose. [87]
I risultati di questo studio suggeriscono che non solo le cellule T_{FH} erano necessarie per la produzione di anticorpi IgE, ma che le cellule T_{FH} erano sufficienti anche quando le cellule Th2 canoniche erano assenti o le loro funzioni effettive erano compromesse.

Peanut allergen-specific antibodies go public.
Science. 2018 Dec 14;362(6420):1247-1248. doi: 10.1126/science.aav3709.
https://science.sciencemag.org/content/362/6420/1247.long

[85] Liang HE, Reinhardt RL, Bando JK, Sullivan BM, Ho IC, Locksley RM.
Divergent expression patterns of IL-4 and IL-13 define unique functions in allergic immunity.
Nat Immunol. 2011 Dec 4;13(1):58-66. doi: 10.1038/ni.2182.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3242938/

[86] Reinhardt RL, Liang HE, Locksley RM.
Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire.
Nat Immunol. 2009 Apr;10(4):385-93. doi: 10.1038/ni.1715. Epub 2009 Mar 1.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2714053/

[87] Corry DB, Kheradmand F.
Induction and regulation of the IgE response.
Nature. 1999 Nov 25;402(6760 Suppl):B18-23. doi: 10.1038/35037014.
https://www.nature.com/articles/35037014

Akdis CA.
Therapies for allergic inflammation: refining strategies to induce tolerance.
Nat Med. 2012 May 4;18(5):736-49. doi: 10.1038/nm.2754.
https://www.nature.com/articles/nm.2754

Al contrario, le cellule Th2 avevano svolto un ruolo importante nella produzione di citochine di tipo 2 e nell'infiammazione delle vie aeree eosinofile anche in assenza di cellule T_{FH} o anticorpi IgE, il che ha suggerito che le cellule T_{FH} e le cellule Th2 svolgono un ruolo distinto nelle risposte immunitarie allergiche.

Pertanto, esiste la probabilità che le risposte immunitarie allergiche siano costituite da due sottoinsiemi distinti di cellule T $CD4^+$ produttrici di IL-4, ognuna delle quali mostra funzioni uniche di fenotipo, localizzazione ed organo effettore come riassunto nella Figura sopra.

Con l'estensione di questo concetto, è stato ipotizzato che alcune malattie allergiche umane possano coinvolgere le cellule T_{FH} piuttosto che le cellule Th2, ed esempi potrebbero essere le malattie allergiche che coinvolgono ruoli dimostrati per gli anticorpi IgE e segni minimi di infiammazione della mucosa, come le allergie alimentari e l'anafilassi.[88]

Di seguito si approfondiranno nel dettaglio le strategie utilizzate per lo sviluppo dei costrutti a mRNA

Generazione di un IVT-mRNA efficace

Come già anticipato, gli mRNA utilizzati in vaccinologia sono prodotti *in vitro* utilizzando una RNA polimerasi fagica (T7, T3 o SP6) e uno stampo di DNA.
I tipi di stampi di DNA che possono essere utilizzati per produrre trascritti IVT sono o un prodotto PCR [89] o un plasmide linearizzato [90].
Durante la IVT, le RNA fagiche polimerasi producono dsRNA indesiderato che può attivare l'immunità innata tramite MDA-5, bloccando la traduzione dell'mRNA.
Pertanto, la diminuzione del dsRNA è importante. Le specie di dsRNA possono essere ridotte durante la produzione di IVT abbassando la concentrazione di Mg^{2+},[91] con l'uso di nucleosidi modificati [92] o mediante una RNA polimerasi T7 termostabile che produce mRNA a 50°C, o durante le fasi di purificazione.

I diversi passaggi e strategie che portano alla produzione di un IVT-RNA sono riassunti nella Figura seguente.

https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8
Produzione e formulazione di mRNA trascritto in vitro (IVT)
(A) La sequenza di cDNA dell'antigene che codifica per l'antigene patogeno target viene utilizzata per elaborare un vettore di trascrizione o un frammento PCR che include le informazioni complete dell'mRNA più un promotore di RNA T7 a monte.
(B) il plasmide linearizzato o i prodotti PCR vengono utilizzati per la produzione di IVT-RNA utilizzando l'enzima T7 RNA polimerasi in presenza o assenza di nucleosidi modificati. Il capping di mRNA viene realizzato durante la fase di trascrizione in presenza di analoghi della CAP (ARCA, Clean-Cap) o in due fasi, dopo la produzione di IVT-mRNA, mediante la reazione di capping enzimatico.
(C) Quindi, i prodotti di reazione contenenti lo stampo di DNA, RNA a doppio filamento (dsRNA) e RNA a filamento singolo (ssRNA) con cappuccio e senza cappuccio vengono purificati. Durante la purificazione, lo stampo di DNA viene rimosso con il trattamento con DNasi, i 5'-ppp di RNA senza cappuccio vengono defosforilati

[88] Kobayashi T, Iijima K, Dent AL, Kita H.
Follicular helper T cells mediate IgE antibody response to airborne allergens.
J Allergy Clin Immunol. 2017;139(1):300-313.e7. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.021
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5115999/

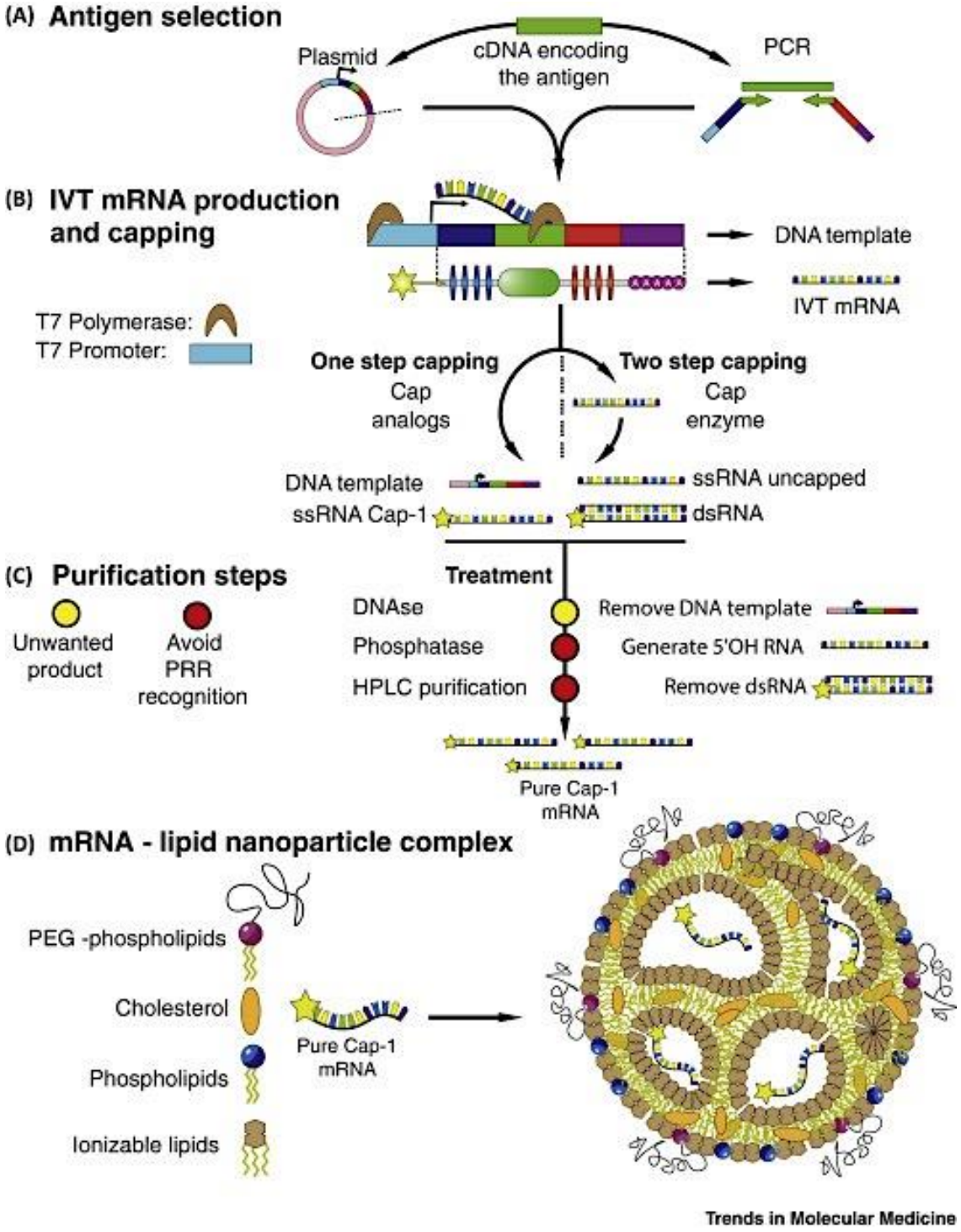
[89] Oh S, Kessler JA.
Design, Assembly, Production, and Transfection of Synthetic Modified mRNA.
Methods. 2018 Jan 15;133:29-43. doi: 10.1016/j.ymeth.2017.10.008. Epub 2017 Nov 7.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5807177/

[90] Grier AE, Burleigh S, Sahni J, Clough CA, Cardot V, Choe DC, Krutein MC, Rawlings DJ, Jensen MC, Scharenberg AM, Jacoby K.
pEVL: A Linear Plasmid for Generating mRNA IVT Templates With Extended Encoded Poly(A) Sequences.
Mol Ther Nucleic Acids. 2016 Apr 19;5(4):e306. doi: 10.1038/mtna.2016.21.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5014522/

[91] Mu X, Greenwald E, Ahmad S, Hur S.
An origin of the immunogenicity of in vitro transcribed RNA.
Nucleic Acids Res. 2018 Jun 1;46(10):5239-5249. doi: 10.1093/nar/gky177.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6007322/

[92] Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, Karikó K. A
Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA.
Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Apr 15;15:26-35. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.018. Epub 2019 Feb 27.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444222/

in 5'OH RNA (se necessario), i dsRNA vengono scartati mediante HPLC o purificazione su cellulosa per ottenere una soluzione pura e omogenea dell'mRNA di interesse.
(D) L'ultimo passaggio è la formazione di un nanocomplesso di mRNA per un efficiente trasporto cellulare e traduzione del trascritto. Ad esempio, abbiamo costruito un ipotetico modello di nanoparticelle lipidiche in cui l'mRNA è intrappolato in goccioline interne nel nucleo di una nanoparticella lipidica, garantendo sia la protezione dalle RNasi che il trasporto efficiente al citosol.
Abbreviazione: PEG, polietilenglicole; PRR, recettore per il riconoscimento dei pattern.



Tipi di nucleosidi modificati

L'utilizzo di un mRNA cellulare che codifica per la proteina di interesse fornisce una traduzione immediata dell'antigene, ma è necessaria una grande dose di mRNA sintetico.
Per superare questo problema, sono stati sviluppati diversi approcci basati su una più profonda comprensione della biologia cellulare.

L'RNA è costituito da quattro nucleotidi - guanina, uracile, adenosina e citosina - ed è progettato per avere una breve emivita in vivo, fungendo da vettore di informazioni tra DNA e proteine. Una sfida nell'impiego dell'RNA come terapia o come vaccino a scopo profilattico è stata quella di controllarne l'emivita per garantire l'efficacia terapeutica o vaccinale.
Per raggiungere questo obiettivo sono stati sviluppati diversi metodi tra cui l'uso dell'saRNA, già discusso [93],
e la modifica dei nucleosidi. [94]

I nucleosidi modificati possono aumentare la potenza del vaccino mRNA [95] in due modi diversi.
In primo luogo, possono diminuire la quantità di specie di dsRNA generate durante la reazione di IVT, oppure compromettere il riconoscimento e/o l'attivazione del PRR. [96]

---

[93] Kim J, Eygeris Y, Gupta M, Sahay G.
Self-assembled mRNA vaccines
[published online ahead of print, 2021 Jan 2]. Adv Drug Deliv Rev. 2021;170:83-112. doi:10.1016/j.addr.2020.12.014
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7837307/

[94] Pardi N, Weissman D.
Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases.
Methods Mol Biol. 2017;1499:109-121. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_6.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987145/

Pardi N, Hogan MJ, Naradikian MS, et al.
Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.
J Exp Med. 2018;215(6):1571-1588. doi:10.1084/jem.20171450
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987916/

Willis E, Pardi N, Parkhouse K, Mui BL, Tam YK, Weissman D, Hensley SE.
Nucleoside-modified mRNA vaccination partially overcomes maternal antibody inhibition of de novo immune responses in mice.
Sci Transl Med. 2020 Jan 8;12(525):eaav5701. doi: 10.1126/scitranslmed.aav5701.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7339908/

[95] Pardi N, et al
Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.
J Exp Med. 2018 Jun 4;215(6):1571-1588. doi: 10.1084/jem.20171450. Epub 2018 May 8.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987916/

Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D.
Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.
Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40. doi: 10.1038/mt.2008.200. Epub 2008 Sep 16.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775451/

Vaidyanathan S, et al
Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification.
Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Sep 7;12:530-542. doi: 10.1016/j.omtn.2018.06.010. Epub 2018 Jun 30.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6076213/

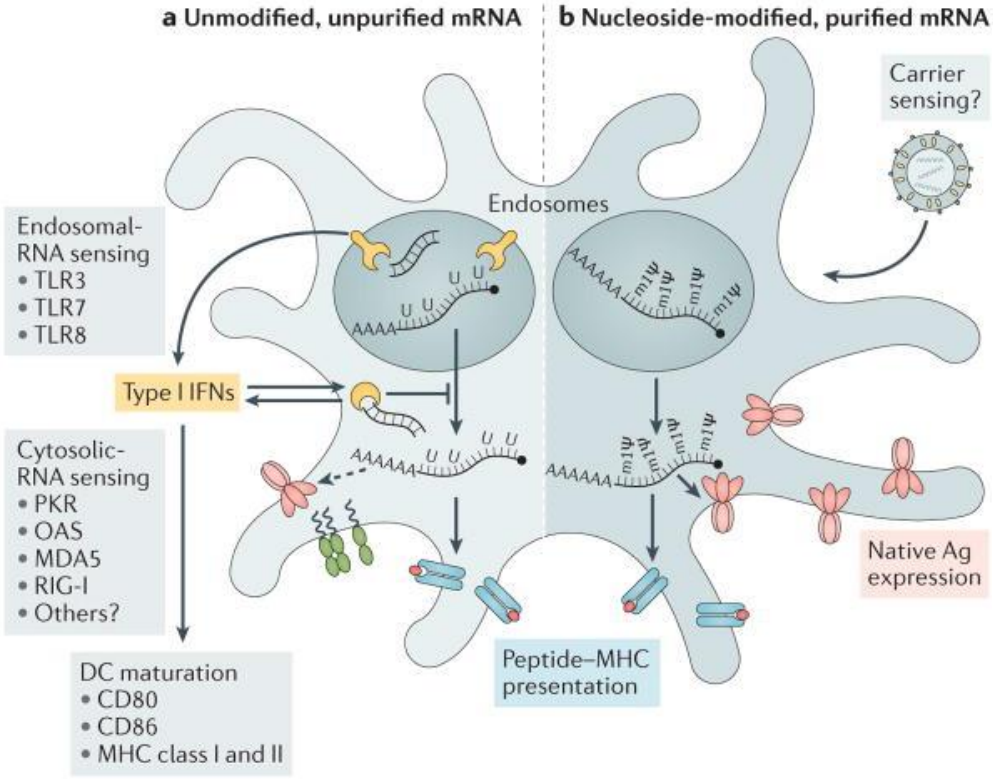
Richner JM, Himansu S, Dowd KA, Butler SL, Salazar V, Fox JM, Julander JG, Tang WW, Shresta S, Pierson TC, Ciaramella G, Diamond MS.
Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection.
Cell. 2017 Mar 9;168(6):1114-1125.e10. doi: 10.1016/j.cell.2017.02.017. Epub 2017 Feb 17. Erratum in: Cell. 2017 Mar 23;169(1):176.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5388441/

[96] Durbin AF, Wang C, Marcotrigiano J, Gehrke L.
RNAs Containing Modified Nucleotides Fail To Trigger RIG-I Conformational Changes for Innate Immune Signaling.
mBio. 2016 Sep 20;7(5):e00833-16. doi: 10.1128/mBio.00833-16.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030355/

Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D.
Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.
Immunity. 2005 Aug;23(2):165-75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(05)00211-6

Charette M, Gray MW.
Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why.
IUBMB Life. 2000 May;49(5):341-51. doi: 10.1080/152165400410182.
https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1080/152165400410182

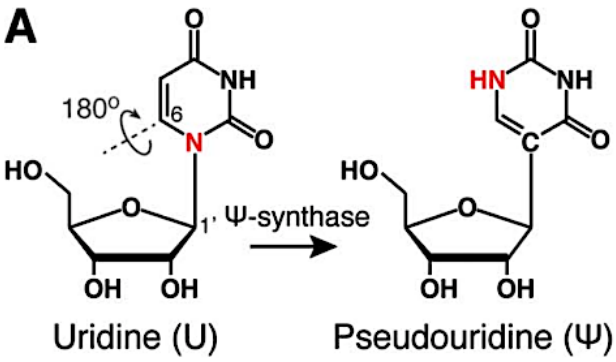
Freund I, Eigenbrod T, Helm M, Dalpke AH.
RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors.
Genes (Basel). 2019 Jan 29;10(2):92. doi: 10.3390/genes10020092.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/

Rilevamento dell'immunitaria innata da parte dei vaccini a mRNA
Rilevamento immunitario innato di due tipi di vaccini a mRNA da parte di una cellula dendritica (DC), con i sensori per l'RNA mostrati in giallo, l'antigene in rosso, i fattori di maturazione DC in verde e i complessi peptidi- MHC in azzurro e rosso; un esempio di vettore di nanoparticelle lipidiche è mostrato in alto a destra. Viene mostrato un elenco non esaustivo dei principali sensori di RNA noti che contribuiscono al riconoscimento di RNA a filamento singolo, a doppio filamento e non modificati. Gli mRNA non modificati, non purificati (parte a) e modificati con nucleosidi, e purificati cromatografia liquida rapida delle proteine (FPLC) (parte b) sono stati selezionati per l'illustrazione di due formati di vaccini a mRNA in cui rispettivamente sono presenti e assenti forme note di rilevamento dell'mRNA. La freccia tratteggiata rappresenta l'espressione ridotta dell'antigene. Ag, antigene; PKR, proteina chinasi attivata da RNA a doppio filamento indotta da interferone; MDA5, proteina 1 contenente il dominio dell'elicasi C indotta da interferone (nota anche come IFIH1); IFN, interferone; m1Ψ, 1-metilpseudouridina; OAS, 2-5'-oligoadenilato sintetasi; TLR, recettore Toll-like.

Una modificazione che ha dimostrato di aumentare la stabilità biologica dell'mRNA è la sostituzione dell'uridina con la pseudo-uridina (Ψ).[97]



[97] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, Ludwig J, Kato H, Akira S, Weissman D.
Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.
Mol Ther. 2008 Nov;16(11):1833-40. doi: 10.1038/mt.2008.200. Epub 2008 Sep 16.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775451/

Charette M, Gray MW.
Pseudouridine in RNA: what, where, how, and why.
IUBMB Life. 2000 May;49(5):341-51. doi: 10.1080/152165400410182.
https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1080/152165400410182

Spenkuch F, Motorin Y, Helm M.
Pseudouridine: still mysterious, but never a fake (uridine)!.
RNA Biol. 2014;11(12):1540-1554. doi:10.4161/15476286.2014.992278
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615568/

Yu YT, Meier UT.
RNA-guided isomerization of uridine to pseudouridine--pseudouridylation.
RNA Biol. 2014;11(12):1483-1494. doi:10.4161/15476286.2014.972855
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615163/

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4615163/

Questa è una modifica che può verificarsi naturalmente *in vivo,* in cui la Ψ è derivata dall'uridina (U) tramite l'isomerizzazione base-specifica catalizzata dalla Ψ-sintasi, e ha la funzione di aumentare l'emivita dell'mRNA (modificazione epigenetica dell'RNA o epi-trascrittomica [98]).

I mammiferi non metabolizzano la Ψ, in quanto non producono l'enzima che degrada il legame C-C glicosidico, ma eliminano il nucleoside intatto per via urinaria.[99]
Recentemente, è stata descritta una pseudouridina-5'-fosfatasi che defosforila la Ψ nell'uomo.[100] Poiché le analisi eseguite su estratti cellulari dimostrano la conversione della pseudouridina-5'-fosfato in trifosfato, la defosforilazione [101] potrebbe impedire l'incorporazione accidentale della pseudouridina nei trascritti di RNA.
Negli eubatteri esiste invece una specifica via di degradazione per la Ψ, in cui prima viene fosforilata da una chinasi dedicata e successivamente convertita in uracile e ribosio-5'-fosfato. [102]

La trascrizione *in vitro* utilizzata per generare l'mRNA permette di ottenere facilmente questa sostituzione in quanto viene aggiunta alla reazione di trascrizione la pseudo-uridina piuttosto che l'uridina. Questa tecnologia è impiegata per la costruzione dei vaccini a mRNA per il COVID-19 sviluppati da Moderna e Pfizer.

Approfondimento Nucleosidi modificati in natura ed evoluzione dell'RNA

La modificazione dei nucleosidi è il fondamento del più antico meccanismo "immunitario".
I batteri metilano naturalmente nucleosidi selezionati nel proprio genoma per distinguere e distruggere il DNA non modificato di un invasore con enzimi di restrizione.
Durante l'evoluzione, la discriminazione tra ospite e patogeno in base alle caratteristiche della metilazione del DNA rimane una componente importante del sistema immunitario. [103]

[98] Li X, Ma S, Yi C.
Pseudouridine: the fifth RNA nucleotide with renewed interests.
Curr Opin Chem Biol. 2016 Aug;33:108-16. doi: 10.1016/j.cbpa.2016.06.014. Epub 2016 Jun 24.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27348156/

Carlile TM, Rojas-Duran MF, Zinshteyn B, Shin H, Bartoli KM, Gilbert WV.
Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells.
Nature. 2014 Nov 6;515(7525):143-6. doi: 10.1038/nature13802. Epub 2014 Sep 5.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4224642/

[99] Drahovský, D., Winkler, A. & Škoda, J.
Increased Urinary Pseudouridine Excretion in Rats following Irradiation.
Nature 201, 411–412 (1964). https://doi.org/10.1038/201411a0
https://www.nature.com/articles/201411a0

[100] Preumont A, Rzem R, Vertommen D, Van Schaftingen E.
HDHD1, which is often deleted in X-linked ichthyosis, encodes a pseudouridine-5'-phosphatase.
Biochem J. 2010 Oct 15;431(2):237-44. doi: 10.1042/BJ20100174.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20722631/

[101] Goldberg IH, Rabinowitz M.
The incorporation of 5-ribosyluracil triphosphate into RNA in nuclear extracts of mammalian cells.
Biochem Biophys Res Commun. 1961 Dec 20;6:394-8. doi: 10.1016/0006-291x(61)90152-8.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13899698/

[102] Preumont A, Snoussi K, Stroobant V, Collet JF, Van Schaftingen E.
Molecular identification of pseudouridine-metabolizing enzymes.
J Biol Chem. 2008 Sep 12;283(37):25238-46. doi: 10.1074/jbc.M804122200. Epub 2008 Jun 30.
https://jbc.org/retrieve/pii/S0021925820525623

[103] Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D.
Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.
Immunity. 2005 Aug;23(2):165-75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(05)00211-6

Ishii KJ, Akira S.
TLR ignores methylated RNA?
Immunity. 2005 Aug;23(2):111-3. doi: 10.1016/j.immuni.2005.08.003.

La rilevazione di agenti patogeni da parte del sistema immunitario innato si basa su un piccolo sottoinsieme di recettori di riconoscimento del pattern codificati dalla linea germinale, che riconoscono molecole microbiche strutturalmente conservate.
Oltre ai componenti della parete cellulare di batteri e funghi, gli acidi nucleici (NA) sono stati identificati come potenti stimoli che avviano una robusta risposta immunitaria.
Poiché sia gli acidi nucleici "self" che quelli "non self" sono composti dagli stessi elementi costitutivi di base, la capacità di identificare l'origine del DNA e dell'RNA è una necessità cruciale per il sistema immunitario innato.
Oltre ai recettori citosolici, tra cui il gene I inducibile dell'acido retinoico (RIG-I), l'antigene di differenziazione del melanoma 5 (MDA-5), e la GMP-AMP sintasi ciclica (cGAS), gli NA sono riconosciuti dai recettori Toll -like (TLR) 3, TLR7, TLR8, TLR9 e TLR13 che risiedono nell'endosoma.

Sono stati descritti tre meccanismi principali che consentono al sistema immunitario innato di evitare il riconoscimento degli NA ospitanti ("self"), ma consentono la stimolazione da parte di NA microbici ("estranei").
In primo luogo, la discriminazione può essere basata sulla restrizione spaziale dei recettori sensibili agli NA in compartimenti subcellulari specifici. Infatti, i TLR risiedono nell'endolisosoma a cui l'RNA/DNA-self non ha accesso o ha accesso limitato. Al contrario, l'RNA/DNA microbico può avere accesso dopo l'assorbimento endosomiale e la degradazione dei microbi nei fagociti.

In secondo luogo, la composizione dei nucleotidi, le modificazioni chimiche presenti in natura e i motivi di sequenza distinti, influenzano le strutture primarie, secondarie e terziarie di RNA e DNA e determinano il riconoscimento degli NA.
Come tale, l'RNA citosolico 5'-trifosforilato che si produce durante la replicazione dell'RNA del virus attiva il RIG-I citosolico mentre l'RNA "self" eucariotico evita il riconoscimento attraverso il capping. [104]
La frequenza GC non metilata è aumentata nei procarioti rispetto al DNA dei mammiferi e quindi induce la stimolazione del TLR9.

Sono state identificate più di 150 diverse modificazioni post-trascrizionali dell'RNA presenti in natura [105].

---

https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(05)00241-4

Freund I, Eigenbrod T, Helm M, Dalpke AH.
RNA Modifications Modulate Activation of Innate Toll-Like Receptors.
Genes (Basel). 2019;10(2):92. Published 2019 Jan 29. doi:10.3390/genes10020092
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410116/

[104] Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, et al.
A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA.
Immunity. 2015;43(1):41-51. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.015
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128463/

Schoggins JW. A
Sense of Self: RIG-I's Tolerance to Host RNA.
Immunity. 2015 Jul 21;43(1):1-2. doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.022.
https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(15)00266-6

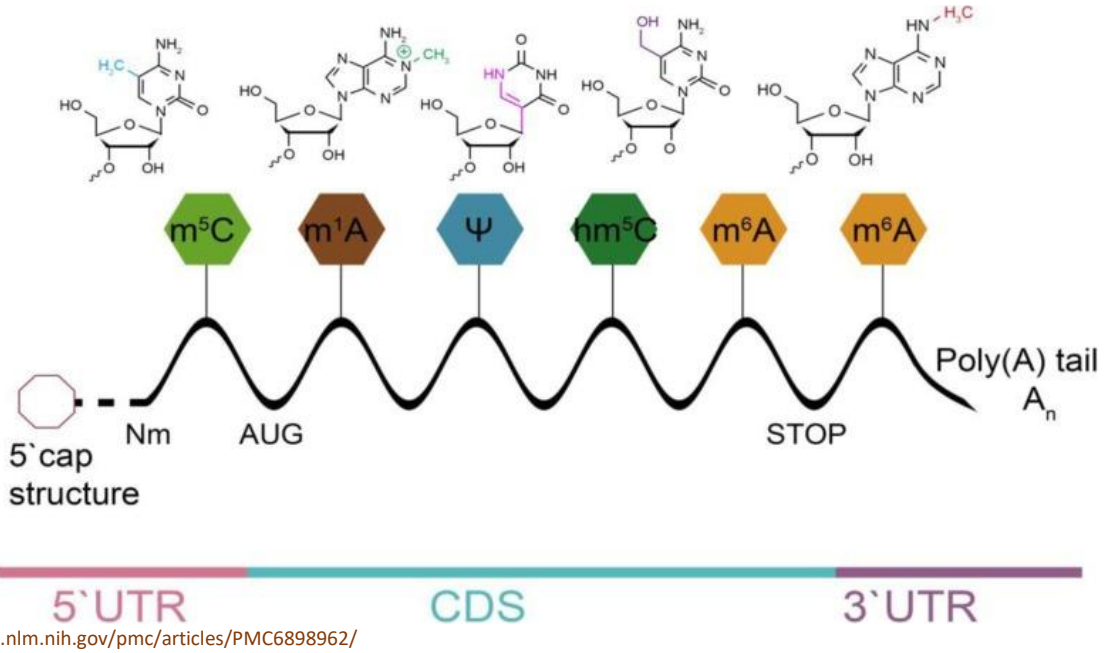
[105] Song J, Yi C.
Chemical Modifications to RNA: A New Layer of Gene Expression Regulation.
ACS Chem Biol. 2017 Feb 17;12(2):316-325. doi: 10.1021/acschembio.6b00960. Epub 2017 Jan 12.
https://www.semanticscholar.org/paper/Chemical-Modifications-to-RNA%3A-A-New-Layer-of-Gene-Song-Yi/207fabf5326e80115a6c52094a5861e50535b44a

Boccaletto P, et al
MODOMICS: a database of RNA modification pathways. 2017 update.
Nucleic Acids Res. 2018 Jan 4;46(D1):D303-D307. doi: 10.1093/nar/gkx1030.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5753262/

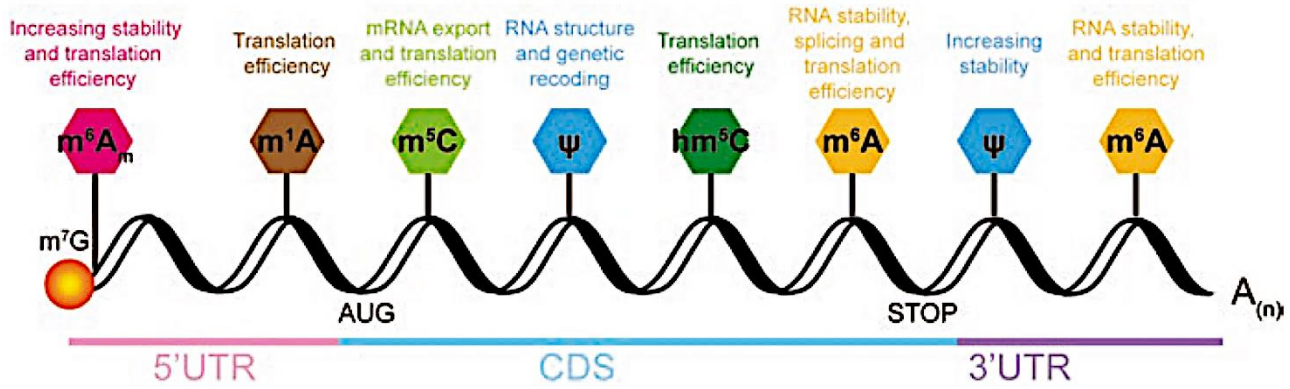
Motorin, Y.
RNA Modification.
In eLS, John Wiley & Sons, Ltd (Ed.). (2015). https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000528.pub3
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/9780470015902.a0000528.pub3

Flamme M, McKenzie LK, Sarac I, Hollenstein M.
Chemical methods for the modification of RNA.
Methods. 2019 May 15;161:64-82. doi: 10.1016/j.ymeth.2019.03.018. Epub 2019 Mar 21.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30905751/

L'RNA eucariotico in generale è più pesantemente modificato rispetto all'RNA procariotico, e le modifiche dell'RNA possono essere notevolmente più complesse consentendo così una potenziale discriminazione dell'origine evolutiva da parte del sistema immunitario innato.[106]



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6898962/



https://www.researchgate.net/publication/334631681_RNA_N_6-Methyladenosine_Modification_in_Normal_and_Malignant_Hematopoiesis

---

Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C.
Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation.
Cell. 2017 Jun 15;169(7):1187-1200. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.045.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657247/

Wang X, He C.
Dynamic RNA modifications in posttranscriptional regulation.
Mol Cell. 2014;56(1):5-12. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.001
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7129666/

Hu BB, Wang XY, Gu XY, et al.
N6-methyladenosine (m6A) RNA modification in gastrointestinal tract cancers: roles, mechanisms, and applications.
Mol Cancer. 2019;18(1):178. Published 2019 Dec 7. doi:10.1186/s12943-019-1099-7
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6898962/

Weng H, Huang H, Chen J.
RNA N 6-Methyladenosine Modification in Normal and Malignant Hematopoiesis.
Adv Exp Med Biol. 2019;1143:75-93. doi: 10.1007/978-981-13-7342-8_4.
https://www.researchgate.net/publication/334631681_RNA_N_6-Methyladenosine_Modification_in_Normal_and_Malignant_Hematopoiesis

[106] Roundtree IA, Evans ME, Pan T, He C.
Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation.
Cell. 2017;169(7):1187-1200. doi:10.1016/j.cell.2017.05.045
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657247/

Karikó et al. hanno chiarito per primi le differenze nella stimolazione immunitaria da parte dell'RNA dipendenti dalla sua origine evolutiva [107], riportando una correlazione negativa del potenziale immunostimolatorio dell'RNA e l'entità delle modificazioni incorporate.
Sulla base dell'osservazione che la secrezione di citochine innate era inefficiente con l'RNA citosolico dei mammiferi, ma efficiente con l'RNA batterico e con l'RNA mitocondriale, gli autori hanno analizzato in particolare l'attivazione dei TLR3, 7 e 8 da parte dell'RNA modificato.
L'RNA trascritto in vitro contenente s2U o m6A incorporato in modo casuale non era in grado di stimolare i TLR3, mentre le modifiche m6A, m5C, m5U, s2U e Ψ impedivano la stimolazione dei TLR7 e 8 (vedere la Figura seguente per le strutture).

Queste ultime modifiche hanno anche inibito la secrezione di TNF e IL-12 dalle cellule dendritiche derivate dai monociti. Tuttavia, nelle popolazioni DC primarie l'RNA modificato da m6A e m5C [108] stimolava la secrezione di TNF, indicando differenze di tipo cellulare.
Recentemente, l'incorporazione di N(1)-metilpseudouridina (m1 Ψ) nell'mRNA, da sola o in combinazione con m5C, ha dimostrato di ridurre ulteriormente la stimolazione dell'immunità innata, specialmente attraverso i TLR3 rispetto alla pseudo-uridina [109].

Poiché parallelamente la stabilità dell'mRNA è stata migliorata, questa modifica è stata suggerita per aumentare le prestazioni per le terapie basate sull'mRNA. Infatti è stato dimostrato che *in vivo* i vaccini con mRNA modificato con N(1)-metilpseudouridina inducono risposte migliori delle cellule helper follicolari T e l'attivazione delle cellule B germinali, ma in realtà ciò può essere dovuto sia agli effetti sulla stabilità dell'mRNA che alla ridotta stimolazione immunitaria innata.[110]

---

[107] Karikó K, Buckstein M, Ni H, Weissman D.
Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.
Immunity. 2005 Aug;23(2):165-75. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008.
https://www.cell.com/immunity/fulltext/S1074-7613(05)00211-6

[108] Trixl L, Lusser A.
The dynamic RNA modification 5-methylcytosine and its emerging role as an epitranscriptomic mark.
Wiley Interdiscip Rev RNA. 2019 Jan;10(1):e1510. doi: 10.1002/wrna.1510. Epub 2018 Oct 11.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6492194/

Coker H, Wei G, Brockdorff N.
m6A modification of non-coding RNA and the control of mammalian gene expression.
Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019 Mar;1862(3):310-318. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.12.002. Epub 2018 Dec 11.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30550772/

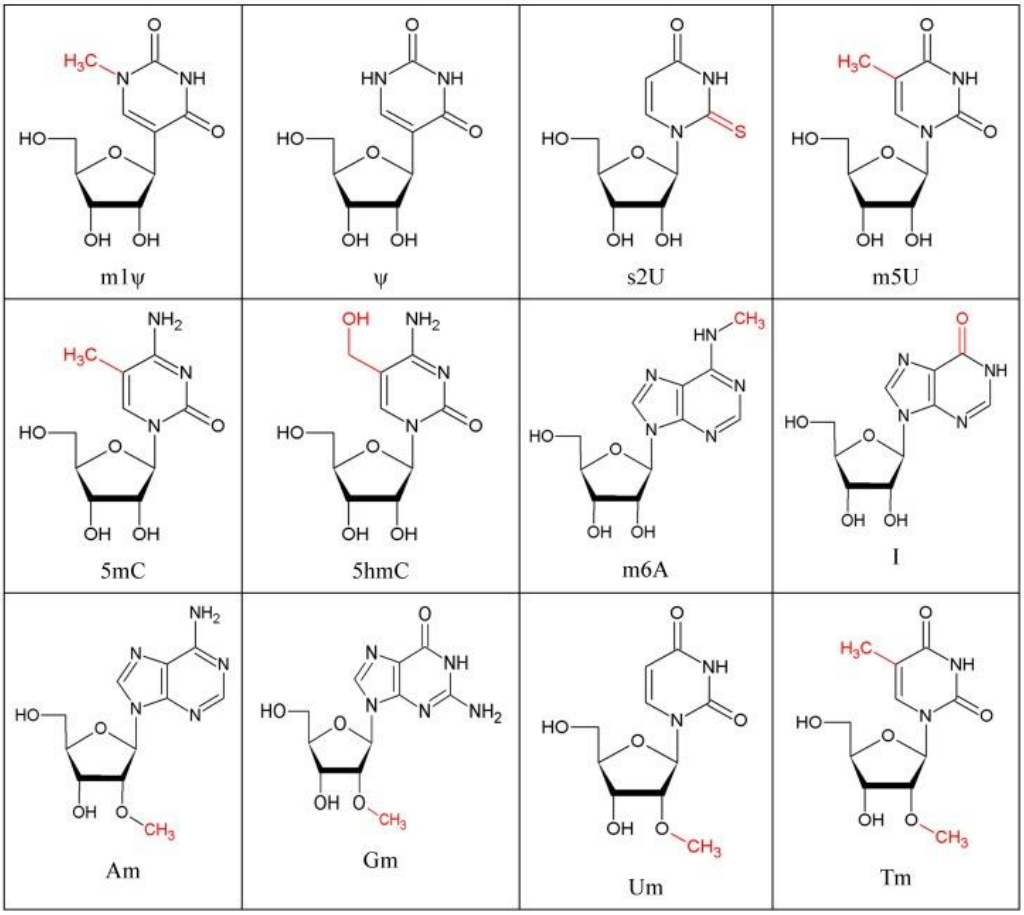
Shi H, Wei J, He C.
Where, When, and How: Context-Dependent Functions of RNA Methylation Writers, Readers, and Erasers.
Mol Cell. 2019 May 16;74(4):640-650. doi: 10.1016/j.molcel.2019.04.025.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6527355/

[109] Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T.
N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice.
J Control Release. 2015 Nov 10;217:337-44. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051. Epub 2015 Sep 3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26342664/

Adachi H, De Zoysa MD, Yu YT.
Post-transcriptional pseudouridylation in mRNA as well as in some major types of noncoding RNAs.
Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech. 2019;1862(3):230-239. doi:10.1016/j.bbagrm.2018.11.002
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6401265/

De Zoysa MD, Yu YT.
Posttranscriptional RNA Pseudouridylation.
Enzymes. 2017;41:151-167. doi: 10.1016/bs.enz.2017.02.001. Epub 2017 Mar 11.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5694665/

[110] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.
mRNA vaccines - a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov. 2018;17(4):261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6410116/
Modifiche selezionate dell'RNA con proprietà immunomodulatorie

Di estrema importanza, il rilevamento citosolico dell'RNA-self da parte di RIG-I o MDA-5 è bloccato da modifiche specifiche che impediscono il riconoscimento dell'RNA.

La conversione da A a I da parte dell'enzima adenosina-deaminasi che agisce sull'RNA (ADAR) è una strategia importante per rendere l'RNA ospite invisibile per il sistema immunitario innato.[111]
Infatti, la deaminazione dell'adenosina è la modifica più comune che influenza il controllo innato [112]. In breve, gli ADAR deaminano idroliticamente le adenosine nelle regioni di RNA duplex, per cui l'inosina imita la guanosina nel legame idrogeno e la funzione dell'RNA può essere modificata in modo significativo.
Inoltre, come già visto, l'RNA trascritto nel nucleo viene modificato con il cappuccio 5'.
Questo è caratterizzato da una 7-metilguanosina invertita legata al primo nucleotide trascritto (5'-cap) e dalla metilazione del 2'-O-ribosio del primo (cap 1) e spesso del secondo (cap 2) nucleotide che abolisce l'interazione con

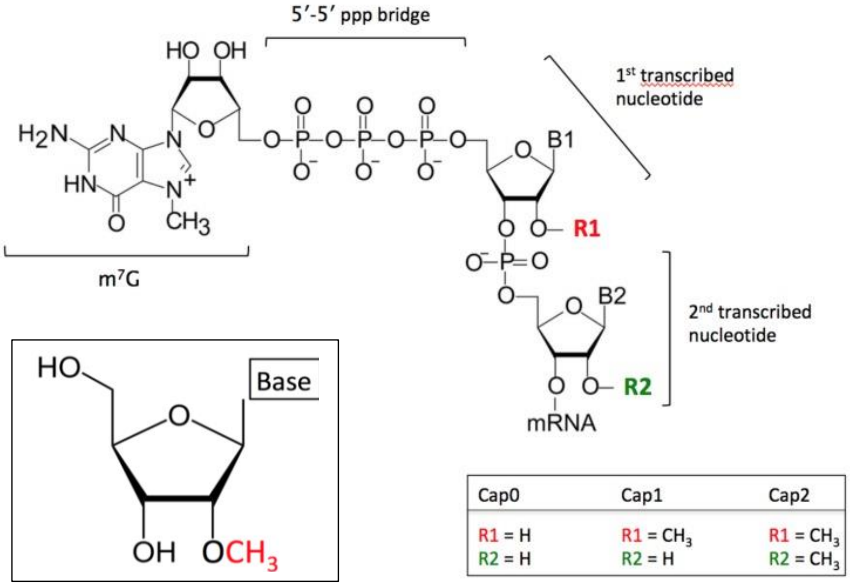
[111] Liddicoat BJ, Piskol R, Chalk AM, et al.
RNA editing by ADAR1 prevents MDA5 sensing of endogenous dsRNA as nonself.
Science. 2015;349(6252):1115-1120. doi:10.1126/science.aac7049
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5444807/

Mannion NM, Greenwood SM, Young R, et al.
The RNA-editing enzyme ADAR1 controls innate immune responses to RNA.
Cell Rep. 2014;9(4):1482-1494. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.041
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4542304/

[112] O'Connell MA, Mannion NM, Keegan LP.
The Epitranscriptome and Innate Immunity.
PLoS Genet. 2015;11(12):e1005687. Published 2015 Dec 10. doi:10.1371/journal.pgen.1005687

Eisenberg E, Levanon EY.
A-to-I RNA editing - immune protector and transcriptome diversifier.
Nat Rev Genet. 2018 Aug;19(8):473-490. doi: 10.1038/s41576-018-0006-1.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29692414/

RIG-I e MDA5 [113]. Al contrario, l'RNA formato all'esterno del nucleo dalla replicazione virale mostra un 5'-trifosfato che è riconosciuto da RIG-I.



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409641/
Struttura del cappuccio dell'RNA: la struttura del cap0 è costituita da un residuo di guanosina, metilato in posizione N-7, che è legato al nucleotide terminale 5'-estremità dell'mRNA con un ponte trifosfato 5'-5 '. La successiva 2'-O-metilazione nel ribosio del primo, o sia del primo che del secondo, nucleotidi di mRNA trascritti porta alla formazione di cap1 o cap2, rispettivamente.

Quindi, attraverso i processi evolutivi, virus come i flavivirus, i coronavirus e i poxvirus hanno sviluppato elementi 5'-alternativi tra cui la 2'-O-metilazione che evitano il riconoscimento da parte del sistema immunitario innato.[114]
Anche la 2'-O-metilazione, è presente in natura con un'abbondanza significativamente maggiore nell'RNA eucariotico rispetto all'RNA procariotico (e mitocondriale) [115], e ciò suggerisce che il riconoscimento dell'RNA "ipometilato" sia utilizzato per discriminare l'RNA-self da quello estraneo.
La metilazione del 2'-O ribosio è nota per agire come un inibitore dominante su TLR7 e TLR8, il che significa che la metilazione del 2'-O di solo una proporzione di RNA è sufficiente per abrogare la stimolazione immunitaria dell'intera preparazione di RNA.

Oltre alla pseudouridina, la 2'-O-metilazione è una delle modificazioni post-trascrizionali più abbondanti all'interno dell'RNA ribosomiale eucariotico, tuttavia l'importanza delle modifiche per regolare l'attivazione immunitaria è un'arma a doppio taglio che necessita di bilanciare un'adeguata attivazione immunitaria sull'infezione e la tolleranza del self.

[113] Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G.
5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.
Science. 2006 Nov 10;314(5801):994-7. doi: 10.1126/science.1132505. Epub 2006 Oct 12.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038590/

Schuberth-Wagner C, Ludwig J, Bruder AK, et al.
A Conserved Histidine in the RNA Sensor RIG-I Controls Immune Tolerance to N1-2'O-Methylated Self RNA.
Immunity. 2015;43(1):41-51. doi:10.1016/j.immuni.2015.06.015
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7128463/

[114] Hyde J.L., Diamond M.S.
Innate immune restriction and antagonism of viral RNA lacking 2-*O*-methylation.
Virology. 2015;479–480:66–74. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.019.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4424151/

[115] Motorin Y, Helm M.
RNA nucleotide methylation.
Wiley Interdiscip Rev RNA. 2011 Sep-Oct;2(5):611-31. doi: 10.1002/wrna.79. Epub 2011 Mar 23.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21823225/

Modifiche dell'RNA utilizzate in modo improprio da parte di alcuni agenti patogeni possono causare evasione immunitaria [116], mentre l'elaborazione inappropriata di self-NA può causare malattie autoimmuni.[117]

E' importante tenere presente che oltre al loro ruolo nella regolazione dei normali processi cellulari, le modifiche dell'RNA svolgono anche un ruolo nella carcinogenesi e conferiscono proprietà staminali a sottopopolazioni di cellule cancerose.
Da un lato, le modificazioni dell'RNA possono contribuire alla progressione del cancro diminuendo la stabilità dei soppressori degli oncogeni eliminando così i loro effetti inibitori, dall'altro possono aumentare la stabilità e l'espressione dei trascritti protooncogeni. [118]

Il terzo meccanismo che protegge dall'auto-riconoscimento il DNA dell'ospite è la degradazione degli acidi nucleici da parte delle nucleasi. Un esempio è la DNasi III citosolica che impedisce l'accumulo di DNA endogeno e quindi l'attivazione di sensori di DNA citosolico.

Mentre in condizioni fisiologiche il riconoscimento dei self-AN è efficacemente inibito, la non discriminazione del self può fallire in malattie specifiche. Infatti è stato ora riportato che il riconoscimento immunitario innato degli NA ospiti può facilitare l'insorgenza e lo sviluppo di reazioni autoimmuni, ad esempio nel lupus eritematoso sistemico e nella psoriasi. [119]

---

[116] Tsai K, Cullen BR.
Epigenetic and epitranscriptomic regulation of viral replication.
Nat Rev Microbiol. 2020;18(10):559-570. doi:10.1038/s41579-020-0382-3
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7291935/

Netzband R, Pager CT.
Epitranscriptomic marks: Emerging modulators of RNA virus gene expression.
Wiley Interdiscip Rev RNA. 2020;11(3):e1576. doi:10.1002/wrna.1576
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7169815/

Dimitrova DG, Teysset L, Carré C.
RNA 2'-O-Methylation (Nm) Modification in Human Diseases.
Genes (Basel). 2019 Feb 5;10(2):117. doi: 10.3390/genes10020117.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6409641/

[117] Jonkhout N, Tran J, Smith MA, Schonrock N, Mattick JS, Novoa EM.
The RNA modification landscape in human disease.
RNA. 2017;23(12):1754-1769. doi:10.1261/rna.063503.117
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5688997/

[118] Uddin MB, Wang Z, Yang C.
Dysregulations of Functional RNA Modifications in Cancer, Cancer Stemness and Cancer Therapeutics.
Theranostics. 2020 Feb 10;10(7):3164-3189. doi: 10.7150/thno.41687.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7053189/

Destefanis E, Avşar G, Groza P, Romitelli A, Torrini S, Pir P, Conticello SG, Aguilo F, Dassi E.
A mark of disease: how mRNA modifications shape genetic and acquired pathologies.
RNA. 2020 Dec 29:rna.077271.120. doi: 10.1261/rna.077271.120.
https://rnajournal.cshlp.org/content/early/2020/12/29/rna.077271.120.long

[119] von Landenberg P, Bauer S.
Nucleic acid recognizing Toll-like receptors and autoimmunity.
Curr Opin Immunol. 2007 Dec;19(6):606-10. doi: 10.1016/j.coi.2007.10.004. Epub 2007 Dec 3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18060756/

Saito K, et al
Heat shock protein 90 associates with Toll-like receptors 7/9 and mediates self-nucleic acid recognition in SLE.
Eur J Immunol. 2015 Jul;45(7):2028-41. doi: 10.1002/eji.201445293. Epub 2015 Apr 28.
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201445293

Lai CY, Yeh DW, Lu CH, Liu YL, Huang LR, Kao CY, Chen HY, Huang CY, Chang CH, Luo Y, Xiang R, Chuang TH.
Identification of Thiostrepton as a Novel Inhibitor for Psoriasis-like Inflammation Induced by TLR7-9.
J Immunol. 2015 Oct 15;195(8):3912-21. doi: 10.4049/jimmunol.1500194. Epub 2015 Sep 14.
https://www.jimmunol.org/content/195/8/3912.long

Gilliet M, Conrad C, Geiges M, Cozzio A, Thürlimann W, Burg G, Nestle FO, Dummer R.
Psoriasis triggered by toll-like receptor 7 agonist imiquimod in the presence of dermal plasmacytoid dendritic cell precursors.
Arch Dermatol. 2004 Dec;140(12):1490-5. doi: 10.1001/archderm.140.12.1490.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15611427/

Studi recenti suggeriscono che le modificazioni epigenomiche post-trascrizionali dell'RNA potrebbero essere un potente strumento per eludere le risposte immunitarie innate. Ad esempio, la modificazione epigenomica mediante l'acetilazione naturale delle citidine aumenta l'efficienza traduzionale dell'mRNA. [120]

Complessivamente, gli studi svolti per ottimizzare la trascrizione in vitro suggeriscono che una diminuzione dell'attivazione immunitaria innata intrinseca dell'mRNA (come la diminuzione dei contaminanti del dsRNA o l'uso di nucleosidi modificati) durante la produzione dell'mRNA migliora la risposta immunitaria adattativa e la traduzione dell'mRNA.

Modifica post-trascrizionale, Capping e Defosforilazione del 5'-mRNA

Per produrre l'mRNA con il cappuccio con l'IVT vengono utilizzate due strategie principali.
La prima consiste nell'utilizzare gli analoghi del cappuccio come l'anti-reverse-cap (ARCA) o Clean Cap [121] in un'unica reazione. Le efficienze di capping sono per l'ARCA il 60–80% (struttura CAP-0) e per il Clean Cap il 90–99% (struttura CAP-1).

La seconda strategia utilizza una reazione enzimatica dopo la reazione di IVT dell'mRNA, raggiungendo una maggiore efficienza di capping (100%, struttura CAP-1).
Il vantaggio principale nell'uso di analoghi del cappuccio come ARCA o Clean CAP è un processo più veloce, più semplice e facile da controllare rispetto alle reazioni enzimatiche che richiedono un passaggio aggiuntivo per il capping.
Inoltre, per ottimizzare la traduzione dell'mRNA, gli IVT-mRNA che rimangono scoperti dovrebbero essere trattati con fosfatasi per evitare il riconoscimento da parte del sistema immunitario innato, poiché come già visto RIG-I potrebbe riconoscere il 5' trifosfato di mRNA senza cappuccio [122] e bloccare la traduzione dell'mRNA.

[120] Arango D, et al
Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency.
Cell. 2018 Dec 13;175(7):1872-1886.e24. doi: 10.1016/j.cell.2018.10.030. Epub 2018 Nov 15.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6295233/

[121] Vaidyanathan S, et al
Uridine Depletion and Chemical Modification Increase Cas9 mRNA Activity and Reduce Immunogenicity without HPLC Purification.
Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Sep 7;12:530-542. doi: 10.1016/j.omtn.2018.06.010. Epub 2018 Jun 30.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6076213/

[122] Hornung V, Ellegast J, Kim S, Brzózka K, Jung A, Kato H, Poeck H, Akira S, Conzelmann KK, Schlee M, Endres S, Hartmann G.
5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I.
Science. 2006 Nov 10;314(5801):994-7. doi: 10.1126/science.1132505. Epub 2006 Oct 12.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17038590/

RIASSUNTO

Strategie per ottimizzare la farmacologia dell'mRNA[123]

Attualmente vengono utilizzate numerose tecnologie per migliorare gli aspetti farmacologici dell'mRNA.
Le varie modifiche dell'mRNA utilizzate e il loro impatto sono riassunte di seguito.

- Gli analoghi del cappuccio sintetico e gli enzimi del capping stabilizzano l'mRNA e aumentano la traduzione delle proteine legandosi al fattore di inizio della traduzione eucariotica 4E (EIF4E)
- Gli elementi regolatori nella regione 5'-non tradotta (UTR) e 3'-UTR stabilizzano l'mRNA e aumentano la traduzione delle proteine
- la coda di Poli (A) stabilizza l'mRNA e aumenta la traduzione delle proteine
- I nucleosidi modificati riducono l'attivazione immunitaria innata e aumentano la traduzione
- Tecniche di separazione e / o purificazione: il trattamento con RNasi III e la purificazione mediante cromatografia liquida rapida a proteine (FPLC) riducono l'attivazione immunitaria e aumentano la traduzione
- L'ottimizzazione della sequenza e / o del codone aumenta la traduzione
- Modulazione delle cellule bersaglio: il co-trasferimento dei fattori di inizio della traduzione e altri metodi alterano la traduzione e l'immunogenicità

[123] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.
mRNA vaccines - a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov. 2018 Apr;17(4):261-279. doi: 10.1038/nrd.2017.243. Epub 2018 Jan 12.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/

MODIFICAZIONI DELL'mRNA DEL VACCINO PFIZER [124]

WHO
International Nonproprietary Names Programme

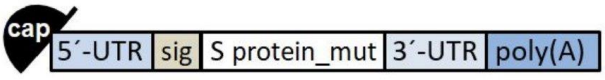
9/2020

11889

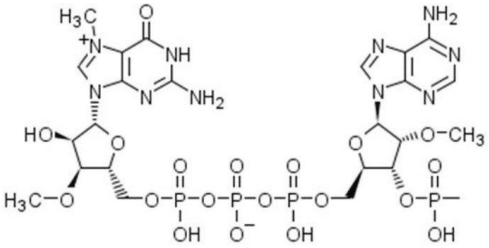
Description

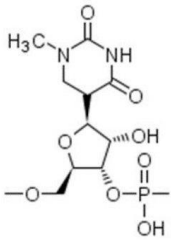
Messenger RNA encoding the full-length SARS-CoV-2 spike glycoprotein.

Schematic



UTR = Untranslated region; sig = extended signal sequence of the S glycoprotein; S protein_mut = S glycoprotein sequence containing mutations K986P and V987P; poly(A) = polyadenylate signal tail.





5'- capping structure
cap G^1A^2 = $m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-$Am^{2'}$-3'-p-
[m^7 = 7-CH_3; $m^{3'}$ = 3'-*O*-CH_3; $m^{2'}$ = 2'-*O*-CH_3;
-ppp- = -PO_2H-O-PO_2H-O-PO_2H)-; -p- = -PO_2H-]

$m^1\Psi$ = 1-methyl-3'-pseudouridylyl

Table of features

Element	Description	Position
cap	A modified 5'-cap1 structure ($m^7G^+m^{3'}$-5'-ppp-5'-Am)	1-2
5'-UTR	5´-untranslated region derived from human alpha-globin RNA with an optimized Kozak sequence	3-54

[124] https://berthub.eu/articles/posts/reverse-engineering-source-code-of-the-biontech-pfizer-vaccine/
https://berthub.eu/articles/posts/italian-reverse-engineering-source-code-of-the-biontech-pfizer-vaccine/

Annette B. Vogel, et al
A prefusion SARS-CoV-2 spike RNA vaccine is highly immunogenic and prevents lung infection in non-human primates
bioRxiv 2020.09.08.280818; doi: https://doi.org/10.1101/2020.09.08.280818
https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.09.08.280818v1.full.pdf

Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al.
Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening.
Mol Ther. 2019;27(4):824-836. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453560/

WHO
International Nonproprietary Names Programme

9/2020

sig	S glycoprotein signal peptide (extended leader sequence), which guides translocation of the nascent polypeptide chain into the endoplasmic reticulum.	55-102
S protein_mut	Codon-optimized sequence encoding full-length SARS-CoV-2 spike (S) glycoprotein containing mutations K986P and V987P to ensure the S glycoprotein remains in an antigenically optimal pre-fusion conformation; stop codons: 3874-3879 (underlined)	103-3879
3'-UTR	The 3´ untranslated region comprises two sequence elements derived from the amino-terminal enhancer of split (AES) mRNA and the mitochondrial encoded 12S ribosomal RNA to confer RNA stability and high total protein expression.	3880-4174
poly(A)	A 110-nucleotide poly(A)-tail consisting of a stretch of 30 adenosine residues, followed by a 10-nucleotide linker sequence and another 70 adenosine residues.	4175-4284

Sequence / Séquence / Secuencia

GAGAAΨAAAC ΨAGΨAΨΨCΨΨ CΨGGΨCCCCA CAGACΨCAGA GAGAACCCGC 50
CACCAΨGΨΨC GΨGΨΨCCΨGG ΨGCΨGCΨGCC ΨCΨGGΨGΨCC AGCCAGΨGΨG 100
ΨGAACCΨGAC CACCAGAACA CAGCΨGCCΨC CAGCCΨACAC CAACAGCΨΨΨ 150
ACCAGAGGCG ΨGΨACΨACCC CGACAAGGΨG ΨΨCAGAΨCCA GCGΨGCΨGCA 200
CΨCΨACCCAG GACCΨGΨΨCC ΨGCCΨΨΨCΨΨ CAGCAACGΨG ACCΨGGΨΨCC 250
ACGCCAΨCCA CGΨGΨCCGGC ACCAAΨGGCA CCAAGAGAΨΨ CGACAACCCC 300
GΨGCΨGCCCΨ ΨCAACGACGG GGΨGΨACΨΨΨ GCCAGCACCG AGAAGΨCCAA 350
CAΨCAΨCAGA GGCΨGGAΨCΨ ΨCGGCACCAC ACΨGGACAGC AAGACCCAGA 400
GCCΨGCΨGAΨ CGΨGAACAAC GCCACCAACG ΨGGΨCAΨCAA AGΨGΨGCGAG 450
ΨΨCCAGΨΨCΨ GCAACGACCC CΨΨCCΨGGGC GΨCΨACΨACC ACAAGAACAA 500
CAAGAGCΨGG AΨGGAAAGCG AGΨΨCCGGGΨ GΨACAGCAGC GCCAACAACΨ 550
GCACCΨΨCGA GΨACGΨGΨCC CAGCCΨΨΨCC ΨGAΨGGACCΨ GGAAGGCAAG 600
CAGGGCAACΨ ΨCAAGAACCΨ GCGCGAGΨΨC GΨGΨΨΨAAGA ACAΨCGACGG 650
CΨACΨΨCAAG AΨCΨACAGCA AGCACACCCC ΨAΨCAACCΨC GΨGCGGGAΨC 700
ΨGCCΨCAGGG CΨΨCΨCΨGCΨ CΨGGAACCCC ΨGGΨGGAΨCΨ GCCCAΨCGGC 750
AΨCAACAΨCA CCCGGΨΨΨCA GACACΨGCΨG GCCCΨGCACA GAAGCΨACCΨ 800
GACACCΨGGC GAΨAGCAGCA GCGGAΨGGAC AGCΨGGΨGCC GCCGCΨΨACΨ 850
AΨGΨGGGCΨA CCΨGCAGCCΨ AGAACCΨΨCC ΨGCΨGAAGΨA CAACGAGAAC 900
GGCACCAΨCA CCGACGCCGΨ GGAΨΨGΨGCΨ CΨGGAΨCCΨC ΨGAGCGAGAC 950
AAAGΨGCACC CΨGAAGΨCCΨ ΨCACCGΨGGA AAAGGGCAΨC ΨACCAGACCA 1000
GCAACΨΨCCG GGΨGCAGCCC ACCGAAΨCCA ΨCGΨGCGGΨΨ CCCCAAΨAΨC 1050
ACCAAΨCΨGΨ GCCCCΨΨCGG CGAGGΨGΨΨC AAΨGCCACCA GAΨΨCGCCΨC 1100
ΨGΨGΨACGCC ΨGGAACCGGA AGCGGAΨCAG CAAΨΨGCGΨG GCCGACΨACΨ 1150
CCGΨGCΨGΨA CAACΨCCGCC AGCΨΨCAGCA CCΨΨCAAGΨG CΨACGGCGΨG 1200
ΨCCCCΨACCA AGCΨGAACGA CCΨGΨGCΨΨC ACAAACGΨGΨ ACGCCGACAG 1250
CΨΨCGΨGAΨC CGGGGAGAΨG AAGΨGCGGCA GAΨΨGCCCCΨ GGACAGACAG 1300
GCAAGAΨCGC CGACΨACAAC ΨACAAGCΨGC CCGACGACΨΨ CACCGGCΨGΨ 1350
GΨGAΨΨGCCΨ GGAACAGCAA CAACCΨGGAC ΨCCAAAGΨCG GCGGCAACΨA 1400

WHO 9/2020
International Nonproprietary Names Programme

```
CAAΨΨACCΨG ΨACCGGCΨGΨ ΨCCGGAAGΨC CAAΨCΨGAAG CCCΨΨCGAGC 1450
GGGACAΨCΨC CACCGAGAΨC ΨAΨCAGGCCG GCAGCACCCC ΨΨGΨAACGGC 1500
GΨGGAAGGCΨ ΨCAACΨGCΨA CΨΨCCCACΨG CAGΨCCΨACG GCΨΨΨCAGCC 1550
CACAAAΨGGC GΨGGGCΨAΨC AGCCCΨACAG AGΨGGΨGGΨG CΨGAGCΨΨCG 1600
AACΨGCΨGCA ΨGCCCCΨGCC ACAGΨGΨGCG GCCCΨAAGAA AAGCACCAAΨ 1650
CΨCGΨGAAGA ACAAAΨGCGΨ GAACΨΨCAAC ΨΨCAACGGCC ΨGACCGGCAC 1700
CGGCGΨGCΨG ACAGAGAGCA ACAAGAAGΨΨ CCΨGCCAΨΨC CAGCAGΨΨΨG 1750
GCCGGGAΨAΨ CGCCGAΨACC ACAGACGCCG ΨΨAGAGAΨCC CCAGACACΨG 1800
GAAAΨCCΨGG ACAΨCACCCC ΨΨGCAGCΨΨC GGCGGAGΨGΨ CΨGΨGAΨCAC 1850
CCCΨGGCACC AACACCAGCA AΨCAGGΨGGC AGΨGCΨGΨAC CAGGACGΨGA 1900
ACΨGΨACCGA AGΨGCCCGΨG GCCAΨΨCACG CCGAΨCAGCΨ GACACCΨACA 1950
ΨGGCGGGΨGΨ ACΨCCACCGG CAGCAAΨGΨG ΨΨΨCAGACCA GAGCCGGCΨG 2000
ΨCΨGAΨCGGA GCCGAGCACG ΨGAACAAΨAG CΨACGAGΨGC GACAΨCCCCA 2050
ΨCGGCGCΨGG AAΨCΨGCGCC AGCΨACCAGA CACAGACAAA CAGCCCΨCGG 2100
AGAGCCAGAA GCGΨGGCCAG CCAGAGCAΨC AΨΨGCCΨACA CAAΨGΨCΨCΨ 2150
GGGCGCCGAG AACAGCGΨGG CCΨACΨCCAA CAACΨCΨAΨC GCΨAΨCCCCA 2200
CCAACΨΨCAC CAΨCAGCGΨG ACCACAGAGA ΨCCΨGCCΨGΨ GΨCCAΨGACC 2250
AAGACCAGCG ΨGGACΨGCAC CAΨGΨACAΨC ΨGCGGCGAΨΨ CCACCGAGΨG 2300
CΨCCAACCΨG CΨGCΨGCAGΨ ACGGCAGCΨΨ CΨGCACCCAG CΨGAAΨAGAG 2350
CCCΨGACAGG GAΨCGCCGΨG GAACAGGACA AGAACACCCA AGAGGΨGΨΨC 2400
GCCCAAGΨGA AGCAGAΨCΨA CAAGACCCCΨ CCΨAΨCAAGG ACΨΨCGGCGG 2450
CΨΨCAAΨΨΨC AGCCAGAΨΨC ΨGCCCGAΨCC ΨAGCAAGCCC AGCAAGCGGA 2500
GCΨΨCAΨCGA GGACCΨGCΨG ΨΨCAACAAAG ΨGACACΨGGC CGACGCCGGC 2550
ΨΨCAΨCAAGC AGΨAΨGGCGA ΨΨGΨCΨGGGC GACAΨΨGCCG CCAGGGAΨCΨ 2600
GAΨΨΨGCGCC CAGAAGΨΨΨA ACGGACΨGAC AGΨGCΨGCCΨ CCΨCΨGCΨGA 2650
CCGAΨGAGAΨ GAΨCGCCCAG ΨACACAΨCΨG CCCΨGCΨGGC CGGCACAAΨC 2700
ACAAGCGGCΨ GGACAΨΨΨGG AGCAGGCGCC GCΨCΨGCAGA ΨCCCCΨΨΨGC 2750
ΨAΨGCAGAΨG GCCΨACCGGΨ ΨCAACGGCAΨ CGGAGΨGACC CAGAAΨGΨGC 2800
ΨGΨACGAGAA CCAGAAGCΨG AΨCGCCAACC AGΨΨCAACAG CGCCAΨCGGC 2850
AAGAΨCCAGG ACAGCCΨGAG CAGCACAGCA AGCGCCCΨGG GAAAGCΨGCA 2900
GGACGΨGGΨC AACCAGAAΨG CCCAGGCACΨ GAACACCCΨG GΨCAAGCAGC 2950
ΨGΨCCΨCCAA CΨΨCGGCGCC AΨCAGCΨCΨG ΨGCΨGAACGA ΨAΨCCΨGAGC 3000
AGACΨGGACC CΨCCΨGAGGC CGAGGΨGCAG AΨCGACAGAC ΨGAΨCACAGG 3050
CAGACΨGCAG AGCCΨCCAGA CAΨACGΨGAC CCAGCAGCΨG AΨCAGAGCCG 3100
CCGAGAΨΨAG AGCCΨCΨGCC AAΨCΨGGCCG CCACCAAGAΨ GΨCΨGAGΨGΨ 3150
GΨGCΨGGGCC AGAGCAAGAG AGΨGGACΨΨΨ ΨGCGGCAAGG GCΨACCACCΨ 3200
GAΨGAGCΨΨC CCΨCAGΨCΨG CCCCΨCACGG CGΨGGΨGΨΨΨ CΨGCACGΨGA 3250
CAΨAΨGΨGCC CGCΨCAAGAG AAGAAΨΨΨCA CCACCGCΨCC AGCCAΨCΨGC 3300
CACGACGGCA AAGCCCACΨΨ ΨCCΨAGAGAA GGCGΨGΨΨCG ΨGΨCCAACGG 3350
CACCCAΨΨGG ΨΨCGΨGACAC AGCGGAACΨΨ CΨACGAGCCC CAGAΨCAΨCA 3400
CCACCGACAA CACCΨΨCGΨG ΨCΨGGCAACΨ GCGACGΨCGΨ GAΨCGGCAΨΨ 3450
GΨGAACAAΨA CCGΨGΨACGA CCCΨCΨGCAG CCCGAGCΨGG ACAGCΨΨCAA 3500
AGAGGAACΨG GACAAGΨACΨ ΨΨAAGAACCA CACAAGCCCC GACGΨGGACC 3550
ΨGGGCGAΨAΨ CAGCGGAAΨC AAΨGCCAGCG ΨCGΨGAACAΨ CCAGAAAGAG 3600
AΨCGACCGGC ΨGAACGAGGΨ GGCCAAGAAΨ CΨGAACGAGA GCCΨGAΨCGA 3650
CCΨGCAAGAA CΨGGGGAAGΨ ACGAGCAGΨA CAΨCAAGΨGG CCCΨGGΨACA 3700
ΨCΨGGCΨGGG CΨΨΨAΨCGCC GGACΨGAΨΨG CCAΨCGΨGAΨ GGΨCACAAΨC 3750
AΨGCΨGΨGΨΨ GCAΨGACCAG CΨGCΨGΨAGC ΨGCCΨGAAGG GCΨGΨΨGΨAG 3800
CΨGΨGGCAGC ΨGCΨGCAAGΨ ΨCGACGAGGA CGAΨΨCΨGAG CCCGΨGCΨGA 3850
AGGGCGΨGAA ACΨGCACΨAC ACAΨGAΨGAC ΨCGAGCΨGGΨ ACΨGCAΨGCA 3900
CGCAAΨGCΨA GCΨGCCCCΨΨ ΨCCCGΨCCΨG GGΨACCCCGA GΨCΨCCCCCG 395
```

WHO 9/2020
International Nonproprietary Names Programme

```
ACCΨCGGGΨC CCAGGΨAΨGC ΨCCCACCΨCC ACCΨGCCCCA CΨCACCACCΨ 4000
CΨGCΨAGΨΨC CAGACACCΨC CCAAGCACGC AGCAAΨGCAG CΨCAAAACGC 4050
ΨΨAGCCΨAGC CACACCCCCA CGGGAAACAG CAGΨGAΨΨAA CCΨΨΨAGCAA 4100
ΨAAACGAAAG ΨΨΨAACΨAAG CΨAΨACΨAAC CCCAGGGΨΨG GΨCAAΨΨΨCG 4150
ΨGCCAGCCAC ACCCΨGGAGC ΨAGCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4200
AAAAGCAΨAΨ GACΨAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 4250
AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA                   4284

Ψ = 1-methyl-3'-pseudouridylyl
```

La sequenza di RNA modificata del vaccino è lunga 4.284 nucleotidi. [125] Consiste in un 5'-cap; una regione 5' non tradotta derivata dalla sequenza dell'alfa globina umana [126]; un peptide segnale (basi 55-102) e due sostituzioni con prolina (K986P e V987P, designate "2P". Le sostituzioni di prolina 2P nelle proteine spike sono state originariamente sviluppate per un vaccino MERS) che fanno sì che la spike adotti una conformazione stabilizzata alla pre-fusione che ne aumenta l'espressione e stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti [127]; un gene ottimizzato per il codone della proteina spike a lunghezza intera di SARS-CoV-2 (basi 103-3879) seguito da una regione 3' non tradotta (basi 3880–4174) combinata di AES e mtRNR1 selezionata per una maggiore espressione proteica e stabilità dell'mRNA [128] e una coda poli (A) comprendente 30 residui di adenosina, una sequenza linker di 10 nucleotidi e 70 altri residui di adenosina (basi 4175–4284).
La sequenza non contiene residui di uridina, che sono sostituiti dall'1-metil-3'-pseudouridina.

Approfondimento
A Mechanist's Guide to the Coronavirus Genome

Sequenza del genoma intero dell'isolato di SARS-Cov-2 Wuhan-Hu-1 [129]
https://benchling.com/s/seq-28k9llmwnY475iv7ogwF/edit
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MN908947.3

[125] World Health Organization. "Messenger RNA encoding the full-length SARS-CoV-2 spike glycoprotein

[126] Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, Brown JM. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. RNA Biol. 2018;15(6):756-762. doi: 10.1080/15476286.2018.1450054. Epub 2018 Mar 26.
https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2018.1450054

[127] Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, et al.
Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates.
N Engl J Med. 2020;383(25):2439-2450. doi:10.1056/NEJMoa2027906
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7583697/

Pallesen J, Wang N, Corbett KS, et al.
Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(35):E7348-E7357. doi:10.1073/pnas.1707304114
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584442/

[128] Orlandini von Niessen AG, Poleganov MA, Rechner C, et al.
Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening.
Mol Ther. 2019;27(4):824-836. doi:10.1016/j.ymthe.2018.12.011
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453560/

mRNA modification and delivery strategies towards the establishment of a platform for safe and effective gene therapy
Oliwia Andries
https://biblio.ugent.be/publication/5914818/file/5914827.pdf

[129] Wu F, et al
A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.
Nature. 2020 Mar;579(7798):265-269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3. Epub 2020 Feb 3. Erratum in: Nature. 2020 Apr;580(7803):E7.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7094943/

Lu R, Zhao X, Li J, et al.
Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.
Lancet. 2020;395(10224):565-574. doi:10.1016/S0140-6736(20)30251-8
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159086/

Chen L, Liu W, Zhang Q, et al.
RNA based mNGS approach identifies a novel human coronavirus from two individual pneumonia cases in 2019 Wuhan outbreak.
Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):313-319. Published 2020 Feb 5. doi:10.1080/22221751.2020.1725399
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7033720/

Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al.
Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan
[published correction appears in Emerg Microbes Infect. 2020 Dec;9(1):540]. Emerg Microbes Infect. 2020;9(1):221-236. Published 2020 Jan 28.
doi:10.1080/22221751.2020.1719902
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7067204/

Coltura, isolamento e identificazione del SARS-Cov-2 [130]

SARS-CoV-2 Viral Culturing at CDC
Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 from Patient with Coronavirus Disease, United States

Approfondimento **La Sintesi Proteica**

Il dogma centrale della biologia molecolare
Sintesi proteica
Prof. Giorgio Sartor Sintesi proteica
Translation: DNA to mRNA to Protein
Video Life Science - Protein synthesis (Translation)

Il codice genetico ha alcune importanti caratteristiche:

- è **ridondante**: molti codoni sono sinonimi, cioè indicano lo stesso amminoacido.
- è **non ambiguo**: un amminoacido può essere codificato da più di una tripletta, ma ogni tripletta codifica sempre un solo amminoacido.
- è **universale**: ogni tripletta codifica sempre per un solo amminoacido in tutti gli organismi.

Con quattro possibili «lettere» (le basi AGCT per il DNA e AGCU per l'RNA) si possono scrivere 64 (4^3) parole di tre lettere (i codoni), ma gli amminoacidi specificati da questi codoni sono soltanto 20.
AUG, che codifica la metionina, è anche il *codone di inizio*, il segnale che avvia la traduzione.
Tre codoni (UAA, UAG, UGA) funzionano da segnali di terminazione della traduzione, o *codoni di stop*; quando il dispositivo per la traduzione raggiunge uno di questi codoni, la traduzione si interrompe e il polipeptide si distacca dal complesso di traduzione.
Tolti i codoni di inizio e di stop, restano 60 codoni, molti di più di quelli strettamente necessari per codificare gli altri 19 amminoacidi: infatti a quasi tutti gli amminoacidi corrispondono più codoni.

---

[130] Nyayanit DA, Sarkale P, Baradkar S, et al.
Transcriptome & viral growth analysis of SARS-CoV-2-infected Vero CCL-81 cells
[published online ahead of print, 2020 Jul 30]. Indian J Med Res. 2020;10.4103/ijmr.IJMR_2257_20. doi:10.4103/ijmr.IJMR_2257_20
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32773420/

Banerjee A, Nasir JA, Budylowski P, et al.
Isolation, Sequence, Infectivity, and Replication Kinetics of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.
Emerg Infect Dis. 2020;26(9):2054-2063. doi:10.3201/eid2609.201495
https://www.researchgate.net/publication/340603961_Isolation_sequence_infectivity_and_replication_kinetics_of_SARS-CoV-2

Liu Z, Zheng H, Lin H, et al.
Identification of Common Deletions in the Spike Protein of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2.
J Virol. 2020;94(17):e00790-20. Published 2020 Aug 17. doi:10.1128/JVI.00790-20
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7431800/pdf/JVI.00790-20.pdf

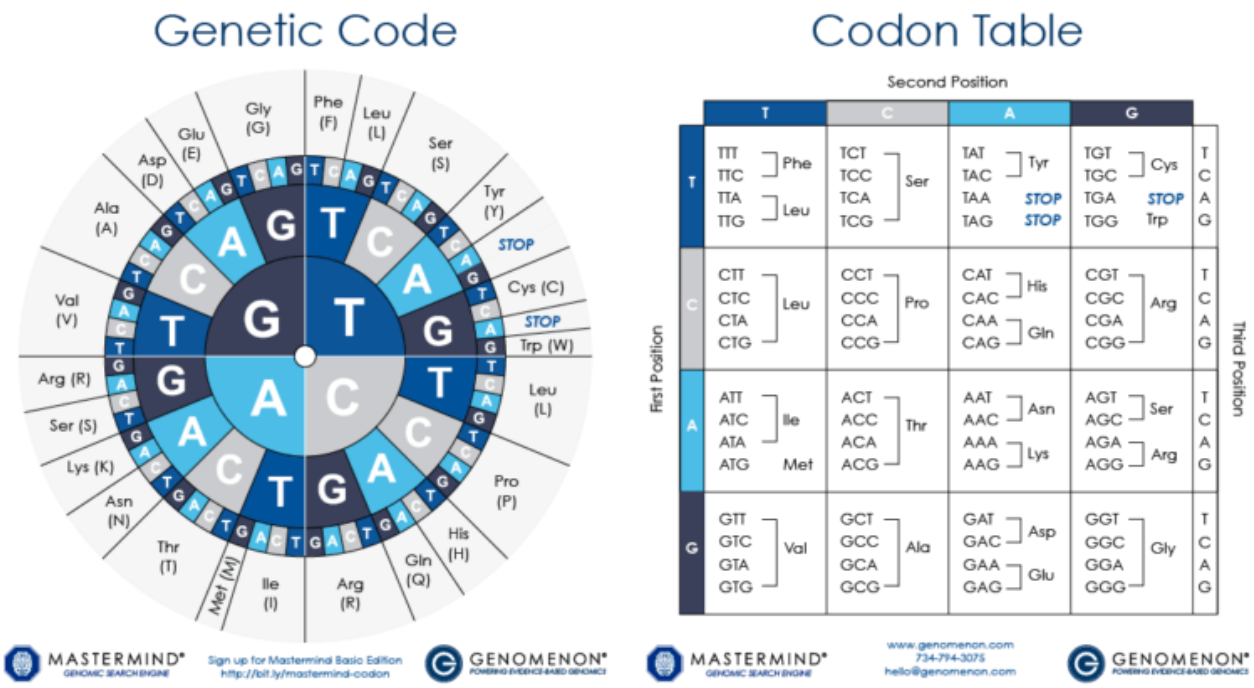
Ogando NS, Dalebout TJ, Zevenhoven-Dobbe JC, et al.
SARS-coronavirus-2 replication in Vero E6 cells: replication kinetics, rapid adaptation and cytopathology
[published online ahead of print, 2020 Jun 22]. J Gen Virol. 2020;10.1099/jgv.0.001453. doi:10.1099/jgv.0.001453
https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.001453/sidebyside

Milewska A, Kula-Pacurar A, Wadas J, et al.
Replication of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Human Respiratory Epithelium.
J Virol. 2020;94(15):e00957-20. Published 2020 Jul 16. doi:10.1128/JVI.00957-20
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7375387/

Per questo si dice che il codice è degenerato (cioè si intende che è ridondante). Per esempio, la leucina è rappresentata da sei codoni diversi. Soltanto la metionina e il triptofano sono rappresentati da un unico codone ciascuno. Inoltre, la degenerazione non è uniforme, ma vi è la preferenza per l'uso di certi codoni (codone usage bias, es. leucina e serina hanno 6 codoni, la glicina e l'alanina ne hanno 4, il glutammato, l'istidina e a tirosina ne hanno 2). [131]

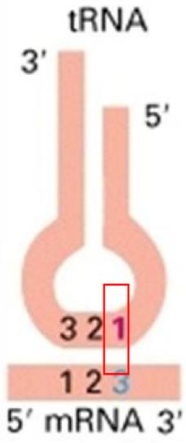
I codoni sono *sinonimi* quando codificano per lo stesso aminoacido pur avendo una sequenza nucleotidica della tripletta diversa, mentre sono *non sinonimi* quando la mutazione di un nucleotide nella sequenza della tripletta porta all'inserimento di un aminoacido diverso nella proteina finale.

Quando un aminoacido possiede codoni multipli, la differenza tra i vari codoni generalmente riguarda la 3ª base:



https://www.genomenon.com/codon-chart/

IPOTESI DELL'OSCILLAZIONE FORMULATA DA CRICK

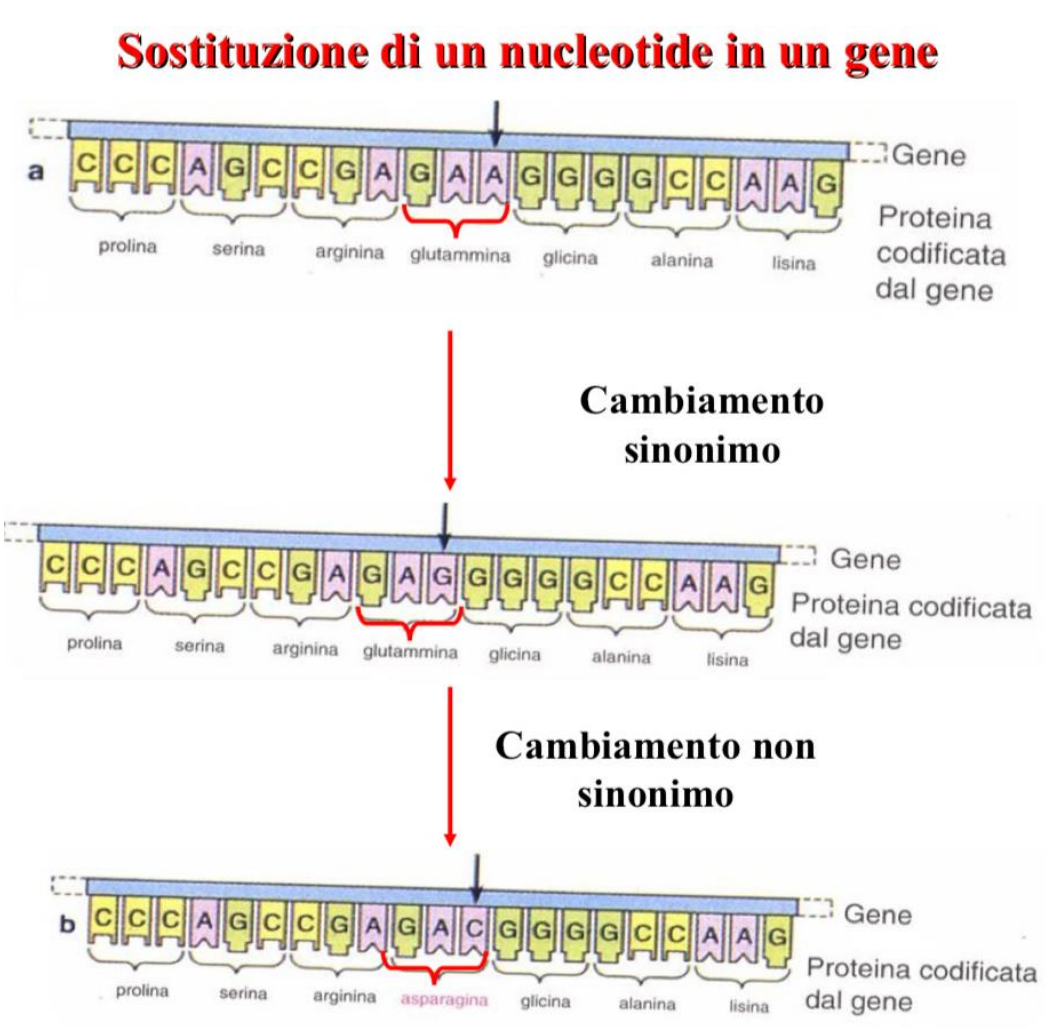


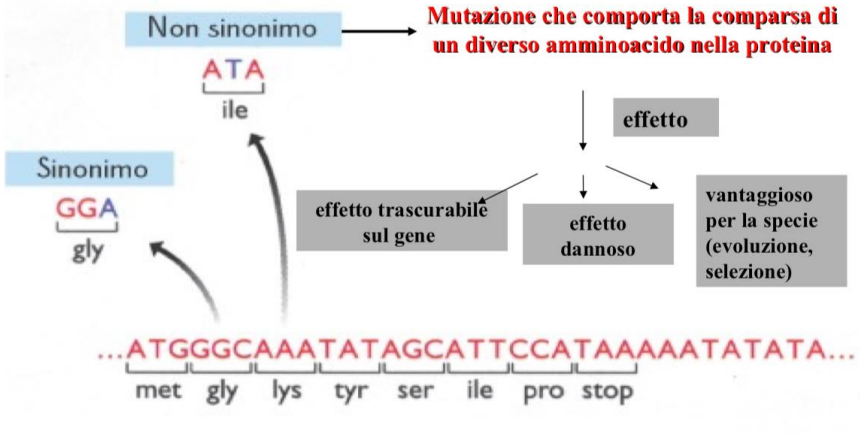
l'anticodone è situato in una porzione della molecola "incurvata" e di conseguenza non può effettuare un allineamento uniforme con l'anticodone, pertanto…

...la 3° base della maggior parte dei codoni, si appaia in modo piuttosto "libero" con la base corrispondente del proprio anticodone (le terze basi di tali codoni "oscillano"). Il fenomeno viene chiamato "vacillamento"

La traduzione 2

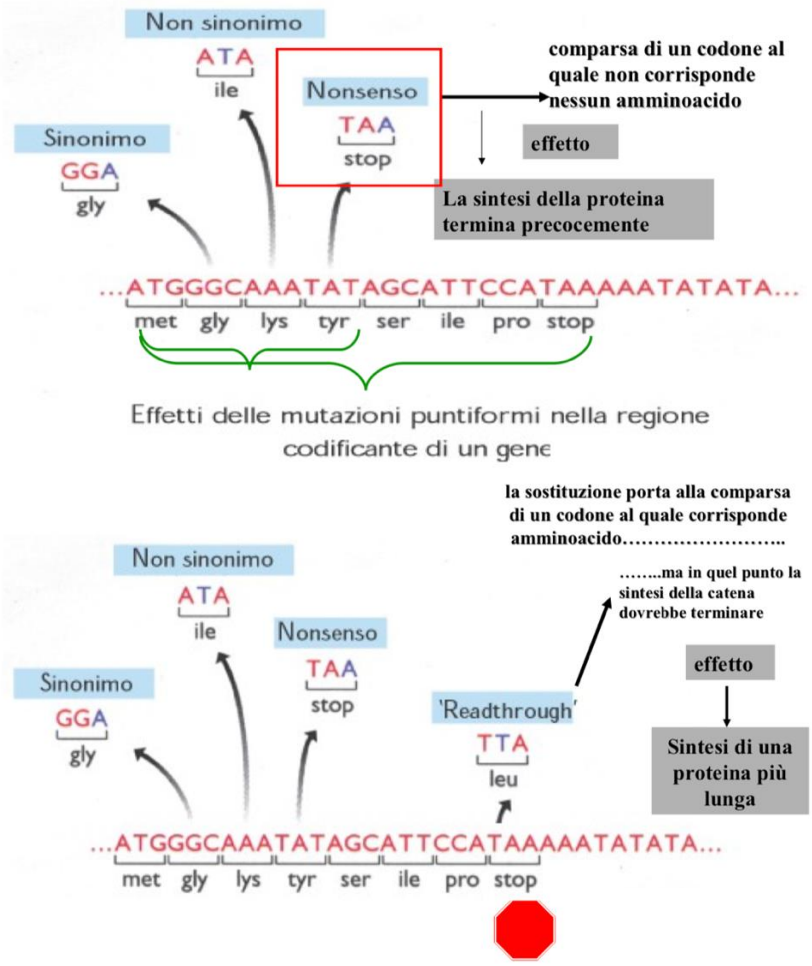
[131] La traduzione 2
http://unica2.unica.it/biotecnologie/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=377&Itemid=218





Effetti delle mutazioni puntiformi nella regione codificante di un gene

La traduzione 2



La traduzione 2

Le mutazioni geniche [132]

Le mutazioni geniche sono variazioni della sequenza nucleotidica e di dividono in mutazioni *per sostituzione di base* o per inserzione/duplicazione/delezione dette anche *mutazioni frameshift*.

https://sites.google.com/site/mutazionigenetiche/mutazioni-geniche

[132] https://sites.google.com/site/mutazionigenetiche/mutazioni-geniche

https://www.docenti.unina.it/webdocenti-be/allegati/materiale-didattico/664022

Mutazione puntiforme

Una mutazione puntiforme è una variazione della sequenza del DNA che interessa uno o pochi nucleotidi ma è possibile considerare "puntiformi" anche mutazioni fino a 50 nucleotidi.
Molte mutazioni puntiformi sono probabilmente senza effetto, in tal caso si dice che sono *neutre*, infatti gran parte del DNA in un genoma eucariotico non codifica prodotti proteici e non è ancora noto se, ed eventualmente come, il cambiamento di una singola base nucleotidica in questa parte silente del DNA possa influire sulla salute di un organismo (si sa però che le regioni non codificanti svolgono un ruolo molto importante per la regolazione epigenetica del DNA).
Una singola mutazione puntiforme in una regione codificante può però avere un notevole impatto sul fenotipo come accade ad esempio nell'anemia falciforme.

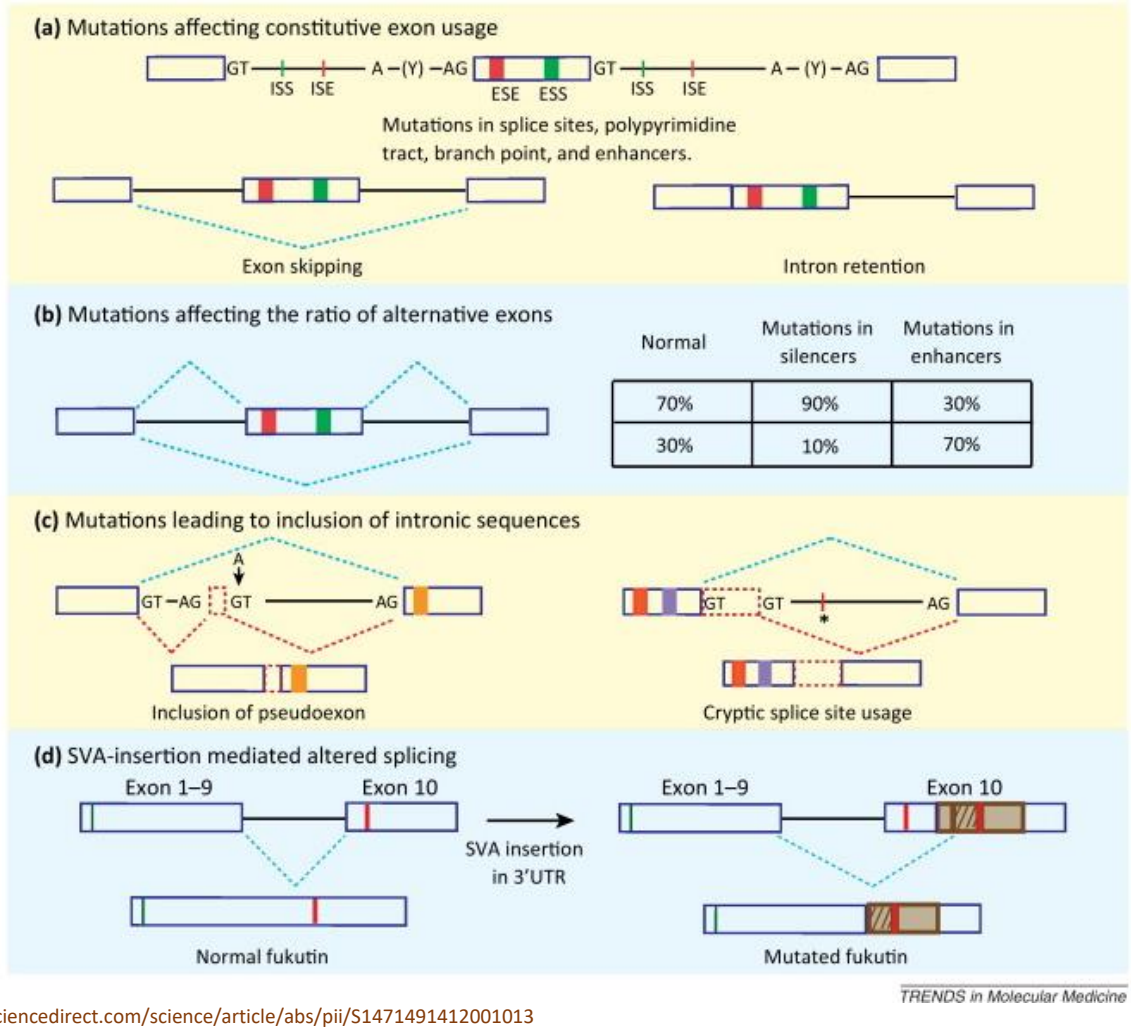
Sostituzione di basi

Le mutazioni per sostituzione di basi determinano lo scambio di un nucleotide con un altro.
Sono definite *transizioni* qualora vi sia uno scambio di una purina con altra purina (A > G) o di una pirimidina con un'altra pirimidina (C > T); si dicono invece *transversioni* quando lo scambio è di una purina con una pirimidina o viceversa (C/T > A/G). In genere le transizioni sono più frequenti delle transversioni.
Le mutazioni puntiformi possono essere di sei tipologie: silenti, missenso, delezioni o inserzioni in frame, inserzioni nonsenso, mutazioni frame-shift o mutazioni di splicing.

- Le ***mutazioni silenti*** o ***sinonime*** si verificano quando la sostituzione di una base azotata in una sequenza di DNA non determina la variazione della sequenza amminoacidica della proteina interessata.
  Se per esempio la tripletta TTT muta in TTC, si avrà una transizione (T > C) in terza posizione della tripletta, ma l'amminoacido codificato a partire dalla tripletta di mRNA corrispondente (UUC) sarà sempre la fenilalanina a causa della ridondanza del nostro codice genetico.
  Le mutazioni silenti sono in prevalenza *neutre* poiché l'amminoacido non cambia e di conseguenza non cambia neppure la funzionalità della proteina codificata all'interno della quale si trova la tripletta mutata.
  Molte delle mutazioni responsabili di un alterato processo di splicing si verificano nelle brevi sequenze ESE (Exon Splicing Enhancer – potenziatore dello splicing degli esoni) di alcuni esoni, che sono fondamentali per uno splicing corretto, dal momento che vi si legano alcune proteine coinvolte nella regolazione di questo processo.
  Quando si verificano mutazioni in queste sequenze può verificarsi l'inclusione di introni nell'mRNA maturo, il quale, se venisse codificato, porterebbe a proteine anomale.
  Mutazioni silenti nelle sequenze ESS (Exonic Splicing Silencer – silenziatore dello splicing degli esoni) coinvolte anch'esse nel meccanismo di splicing del trascritto primario, possono invece portare all'esclusione di un esone dall'mRNA maturo e di conseguenza alla codifica di proteine tronche da parte dei ribosomi.[133]

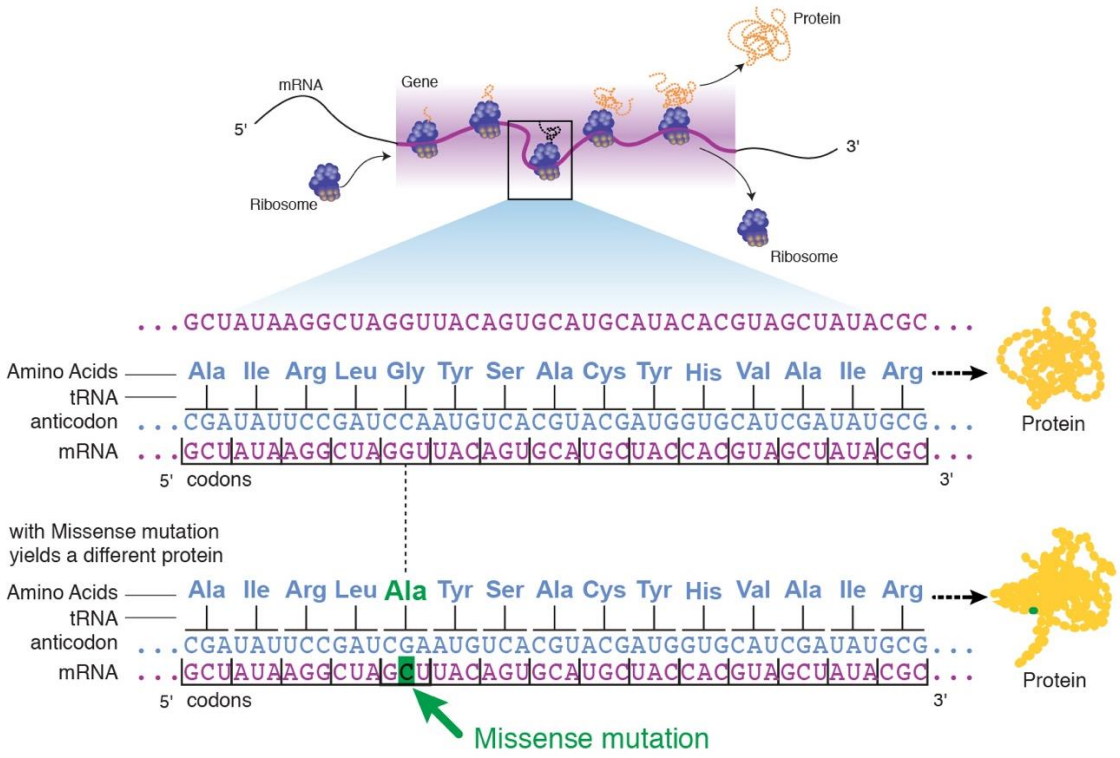
Quattro categorie meccanicistiche di funzione genica alterata da mutazioni di splicing**. (a)** Gli elementi cis di base del codice di giunzione sono indicati: siti di giunzione 5' e 3' (rappresentati da GT e AG), tratto di polipirimidina (Y), punto di diramazione (A) ed enhancer esonici e intronici (ESE e ISE) e silenziatori (ESS e ISS). Le mutazioni che interessano i siti di giunzione, il tratto di polipirimidina, il punto di diramazione o gli enhancer di giunzione portano al salto dell'esone o alla ritenzione di introni. **(b)** Mutazioni negli elementi enhancer o silencer possono modificare il rapporto delle isoforme contenenti esoni alternativi. **(c)** Le mutazioni all'interno degli introni possono portare all'inclusione di sequenze introniche (indicate da rettangoli tratteggiati rossi) creando un sito di giunzione / pseudoesone (indicato da una freccia) e / o creando un elemento potenziatore (indicato da asterisco), consentendo il riconoscimento di un sito di giunzione criptico. Le linee tratteggiate blu indicano il modello di giunzione normale, mentre le linee tratteggiate rosse indicano lo schema di giunzione causato dalla mutazione. **(d)** L'inserimento di elementi trasponibili (SVA, rappresentati da un rettangolo marrone) nell'UTR 3' del gene fukutin porta all'uso alternativo di siti di giunzione che producono una proteina con una sequenza carbossi-terminale diversa (rettangolo marrone modellato). Le linee verdi indicano il codone di inizio sia della fukutina normale che di quella mutata, mentre le linee rosse indicano i codoni di stop.

[133] Singh RK, Cooper TA.
Pre-mRNA splicing in disease and therapeutics.
Trends Mol Med. 2012;18(8):472-482. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.006
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3411911/pdf/nihms388502.pdf



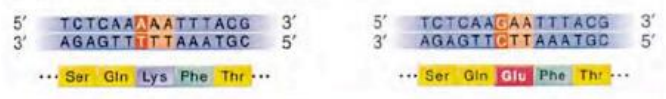
https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1471491412001013

- Le ***mutazioni missenso*** si verificano quando all'interno di una sequenza di DNA viene sostituita una base azotata in modo tale che la sequenza amminoacidica sia modificata.
  Se per esempio la tripletta TTT muta in TCT, con una transizione della base in seconda posizione (T > C), l'amminoacido codificato non sarà più la fenilalanina ma la serina.
  Questo tipo di mutazioni può essere neutra e non determinare nessun fenotipo specifico rappresentando semplicemente un polimorfismo a singolo nucleotide (SNP) o una variante privata, ma può anche dare origine a patologie gravi come l'anemia falciforme e molteplici malattie rare genetiche.
  Generalmente si può ritenere neutra una mutazione missenso qualora l'amminoacido sostituito sia presente senza mostrare un fenotipo patologico in un determinato numero di individui sotto forma di polimorfismo a singolo nucleotide o di variante privata, oppure qualora l'amminoacido codificato abbia proprietà simili a quello originario (per esempio una sostituzione di acido glutammico con acido aspartico).
  La mutazione può però dare origine a condizioni patologiche quando l'amminoacido codificato dalla nuova tripletta presenta proprietà molto diverse dal precedente (per esempio la sostituzione di una valina con l'acido aspartico), qualora non sia stata riscontrata in casi precedenti o in ambito parentale, oppure quando si verifica in una regione altamente conservata di una proteina. Spesso infatti anche una singola mutazione in una regione altamente conservata di una proteina le fa perdere la funzionalità.

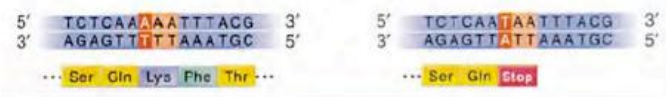


https://www.genome.gov/genetics-glossary/Missense-Mutation

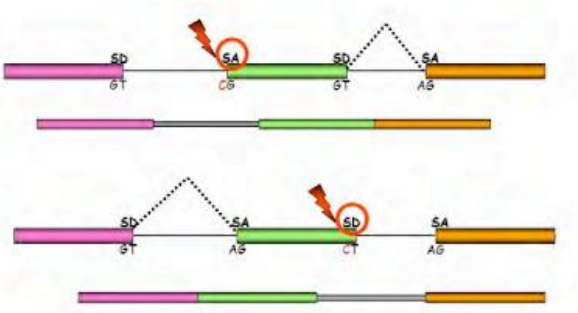
- Le ***mutazioni nonsenso*** si verificano quando una mutazione ad un nucleotide di una tripletta determina la trasformazione di un codone codificante un amminoacido in un codone di stop.
  Per esempio la tripletta TGC codificante per la cisteina è sostituita da TGA, che verrà trascritto nell'mRNA come UGA, uno dei tre codoni di stop.
  La conseguenza è che la proteina codificata non viene esportata oppure, se codificata, è tronca, poiché la traduzione si conclude al codone di stop ignorandone le triplette a valle, portando ad una proteina tronca non funzionale o nociva.
  Se però il codone di stop si trova ad almeno 50 nucleotidi dalla sequenza di splicing più vicina nell'mRNA, la cellula attiva un meccanismo di protezione noto come NMD (Nonsense Mediated Decay) che degrada l'mRNA mutato.
  In alternativa, è possibile che si attivi un altro meccanismo noto come NAS (Nonsense-associated Alterated Splicing) che esclude l'esone contenente la tripletta mutata in codone di stop, permettendo l'associazione degli altri esoni in una proteina più corta.



- **Mutazioni missenso**: la sostituzione nucleotidica cambia il codone per un amminoacido (aa) in un codone per un altro aa (sostituzione aacidica). Possono essere **sinonime** o **non-sinonime**



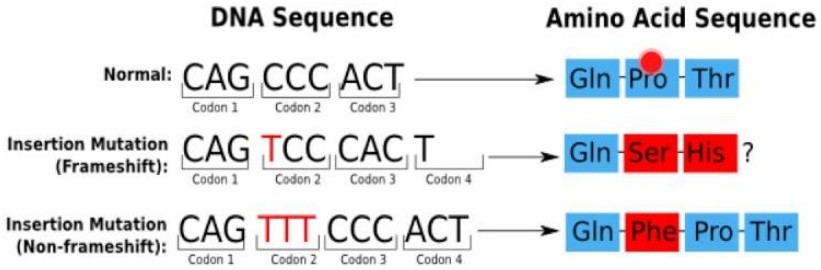
- **Mutazioni non senso**: la sostituzione nucleotidica cambia il codone per un aa in un codone di stop (proteina tronca)



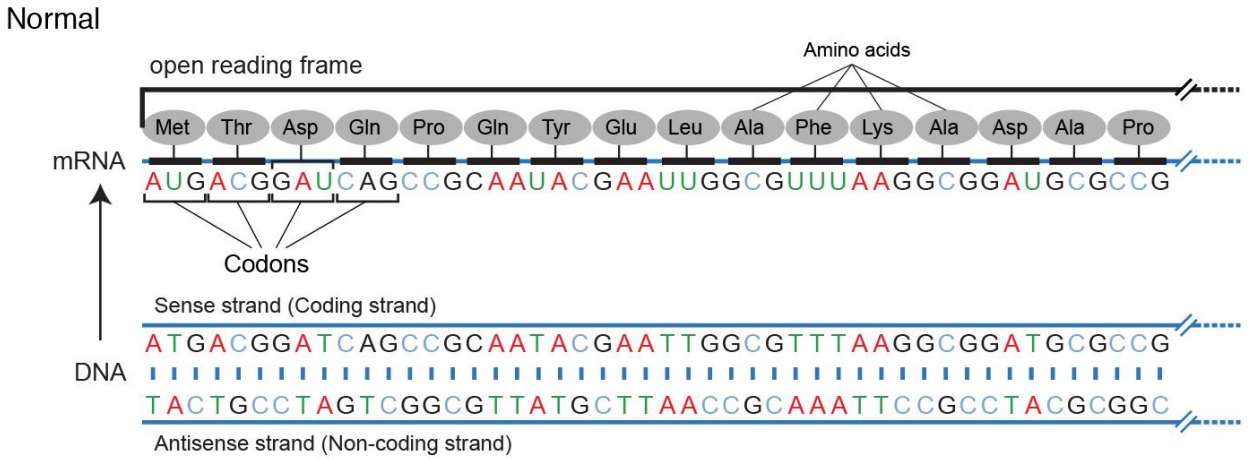
- Mutazioni che alterano trascrizione e processamento dell'RNA: alterano i siti di splicing, la stabilita' dell'mRNA (nelle regioni trascritte e non tradotte al 5' o 3') oppure la trascrizione (nel promotore)

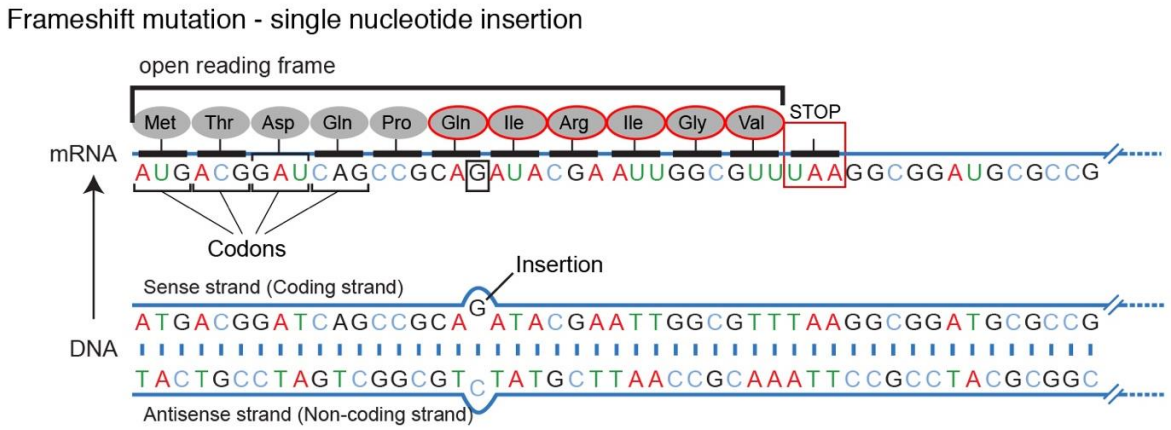
https://sites.google.com/site/mutazionigenetiche/mutazioni-geniche

- Le ***delezioni in frame*** e le ***inserzioni in frame*** determinano rispettivamente l'eliminazione di una tripletta o di un numero di nucleotidi divisibili per 3 oppure l'inserzione di una tripletta o di un numero di nucleotidi divisibili per 3. Sono "in frame" poiché non spostano la cornice di lettura (reading frame) a livello ribosomiale, che invece comporterebbe il pressoché totale cambiamento della sequenza amminoacidica di una proteina.
  Questo tipo di mutazioni determinano l'eliminazione o l'aggiunta di amminoacidi nella proteina codificata a partire dall'mRNA maturo che le contiene. Le conseguenze di queste mutazioni sono molto varie.



- Le ***mutazioni frame-shift*** sono dovute a delezione o inserzioni di un numero di nucleotidi non divisibile per 3, questo comporta lo spostamento della cornice di lettura a valle della mutazione e quindi la codificazione di una sequenza amminoacidica non corrispondente a quella del trascritto originario.
  La conseguenza è la produzione di proteine anomale che hanno solo porzioni di sequenza corrispondenti all'originaria o la mancata esportazione o traduzione dell'mRNA mutato.





https://www.genome.gov/genetics-glossary/Frameshift-Mutation

- Le ***mutazioni di splicing*** sono un insieme di quattro tipi di mutazioni che coinvolgono sequenze importanti per lo splicing del pre-mRNA.
  Una prima tipologia coinvolge il sito donatore di splicing (GT) o il sito accettore (di norma AG).
  Mutazioni in questi due marcatori iniziale e finale di una sequenza intronica possono portare all'inclusione dell'introne nel trascritto maturo oppure ad uno splicing non corretto.
  Una seconda tipologia coinvolge brevi sequenze consenso a monte e a valle del sito donatore e del sito accettore, oppure una sequenza consenso del sito di biforcazione (*branch-site*).
  Una terza tipologia coinvolge mutazioni in una sequenza ESE o ESS e può essere ascritta anche alle mutazioni silenti.
  Infine un'ultima tipologia coinvolge mutazioni che creano nuove sequenze consenso all'interno di un introne, e in tal caso questo o sue parti possono venire incluse nel trascritto, oppure in un esone, in tal caso si verifica l'*exon skipping*.[134]

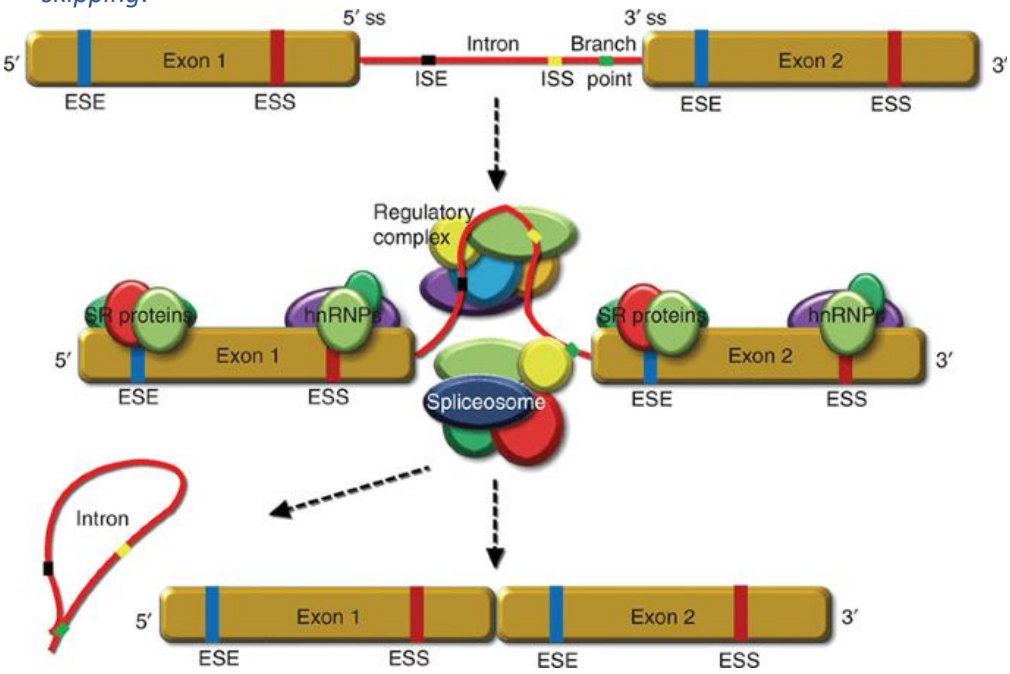


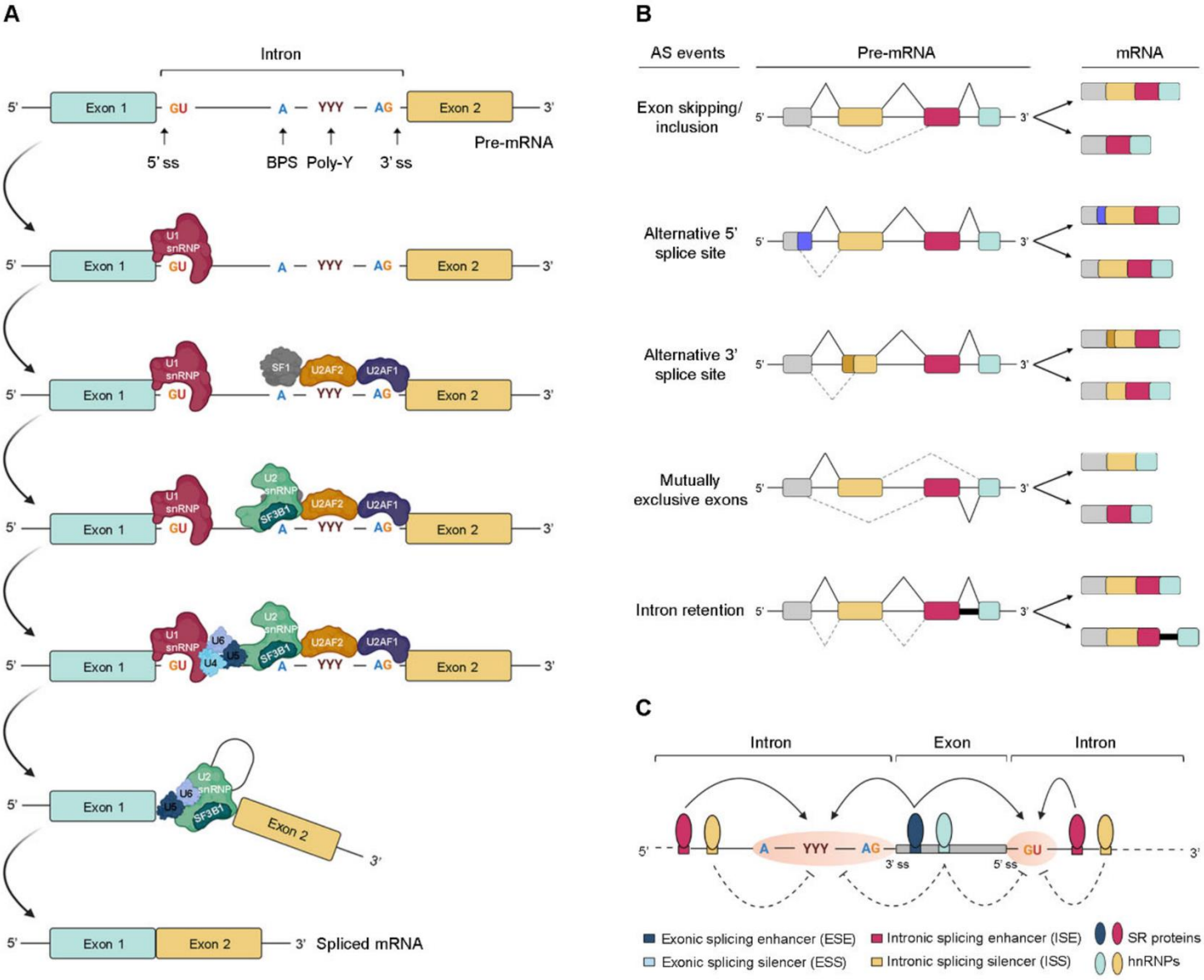
Illustrazione schematica dello splicing pre-mRNA. Il sito di giunzione 5 ′ e il sito di giunzione 3 ′ vengono riconosciuti dallo spliceosoma, l'introne viene asportato e gli esoni vengono saldati. L'intero processo è regolato da elementi trans-attivi come le proteine SR, le ribonucleoproteine nucleari eterogenee e il complesso regolatorio. ESE, enhancer (potenziatore) di giunzione esonica; ESS, silenziatore esonico di giunzione; ISE, potenziatore dello splicing intronico; ISS, silenziatore per giunzioni introniche; ss, sito di giunzione

[134] Bessa C, Matos P, Jordan P, Gonçalves V.
Alternative Splicing: Expanding the Landscape of Cancer Biomarkers and Therapeutics.
Int J Mol Sci. 2020 Nov 27;21(23):9032. doi: 10.3390/ijms21239032.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7729450/

Ule J, Blencowe BJ.
Alternative Splicing Regulatory Networks: Functions, Mechanisms, and Evolution.
Mol Cell. 2019 Oct 17;76(2):329-345. doi: 10.1016/j.molcel.2019.09.017.
https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S1097-2765%2819%2930702-6

Jian, X., Boerwinkle, E. & Liu, X.
In silico tools for splicing defect prediction: a survey from the viewpoint of end users.
Genet Med 16, 497–503 (2014). https://doi.org/10.1038/gim.2013.176
https://www.nature.com/articles/gim2013176

https://www.nature.com/articles/gim2013176



https://www.mdpi.com/1422-0067/21/23/9032/htm

Regolazione dello splicing pre-mRNA. (A) Assemblaggio graduale dello spliceosoma sul pre-mRNA e catalisi della reazione di splicing per generare mRNA spliced maturo. (B) Rappresentazione schematica degli eventi AS di splicing alternativi più comuni. Le caselle grigie, gialle, rosse e blu rappresentano diversi esoni. Le linee nere e grigie punteggiate indicano eventi di giunzione distinti. (C) Interazione complessa tra fattori cis e trans-agenti nella regolazione dell'AS. Le proteine RNA-binding motif (RBM), le proteine ricche di serina / arginina (SR) e le ribonucleoproteine eterogenee (hn) (hnRNPs) si legano agli elementi regolatori esonici o intronici per promuovere o prevenire il riconoscimento dei siti di giunzione 3 'o 5' (ss) dai piccoli (sn) RNP (snRNP) e dai fattori di splicing. Le frecce nere solide e tratteggiate rappresentano rispettivamente la stimolazione e l'inibizione di legame; (ss - siti di splicing; BPS - sito del punto di diramazione; tratto poli-Y - polipirimidina; pre-mRNA - RNA messaggero precursore; snRNPs - piccola particella nucleare ribonucleoproteica; SF1 - fattore di splicing 1; U2AF - fattore ausiliario snRNP U2).

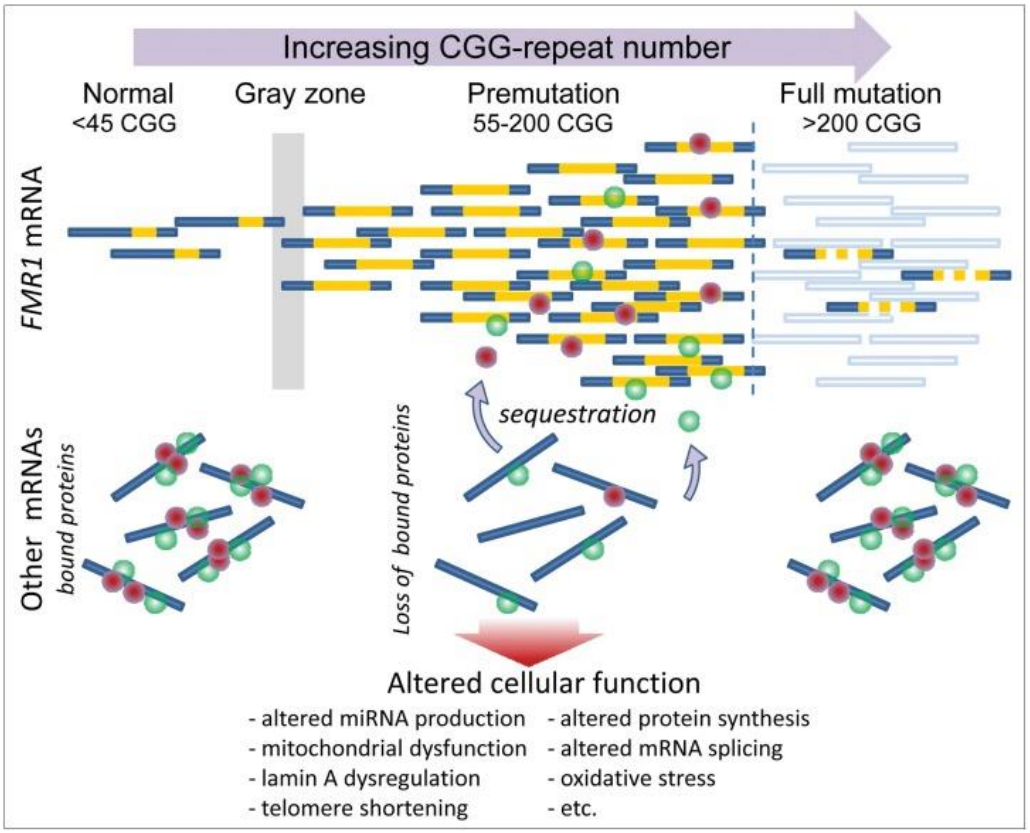
Mutazioni in regioni regolatrici della trascrizione

Mutazioni puntiformi possono anche verificarsi all'interno della regione regolatrice di un gene. Ciò può determinare conseguenze molto variabili che vanno da nessun effetto fenotipico a cambiamenti dell'espressione genica che danno origine a gravi patologie.

Mutazioni Dinamiche

Le mutazioni dinamiche sono dovute alla ripetizione di brevi triplette nucleotidiche all'interno di una regione codificante (in questo caso la tripletta più frequente è CAG che codifica la glutammina) o non-codificante di un gene. La mutazione che si origina nel corso della replicazione del DNA, provoca una variazione nel numero di queste sequenze ripetute; il nuovo filamento di DNA potrà presentarne in eccesso o in difetto. Il fenomeno che causa la mutazione è detto slittamento della replicazione (*replication slippage*) ed è dovuto al cattivo appaiamento dei due filamenti

complementari. Malattie genetiche associate a questo tipo di mutazione sono la Corea di Huntington e la sindrome dell'X fragile.[135]



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379894/
Panoramica dell'espressione del gene FMR1. (sindrome dell'X fragile)
I livelli di mRNA di FMR1 aumentano con l'aumentare della lunghezza delle ripetizioni CGG (segmenti d'oro) in tutto l'intervallo di pre-mutazione e subiscono una transizione a livelli notevolmente ridotti nell'intero intervallo di mutazione a causa dell'ipermetilazione della regione del promotore FMR1. In alcuni casi, il mosaicismo della metilazione si traduce in una produzione continua di livelli di mRNA da bassi a moderati nell'intero intervallo di mutazione. Si ritiene che la tossicità dell'RNA nell'intervallo di pre-mutazione derivi dal sequestro, dal legame diretto all'elemento ripetuto CGG espanso all'interno dell'mRNA FMR1, di una o più proteine leganti l'RNA che normalmente sarebbero associate ad altri mRNA. Il sequestro a sua volta porta alla perdita delle normali funzioni di quelle proteine, che possono includere la modulazione dello splicing e la regolazione della produzione di miRNA, tra le altre funzioni. Si ritiene che la disregolazione dell'elaborazione dell'RNA porti a molteplici forme di disregolazione cellulare a valle

Video Le mutazioni geniche step by step

[135] Hagerman PJ.
Current Gaps in Understanding the Molecular Basis of FXTAS.
Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y). 2012;2:tre-02-63-375-2. doi: 10.7916/D80C4TH0. Epub 2012 May 18.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3379894/

Potenziale disregolazione della sintesi proteica con il vaccino Pfizer

La dr.ssa Kira Smith nel suo articolo **"***BNT162b2 Vaccine: Possible Codons Misreading, Errors in Protein Synthesis and Alternative Splicing's Anomalies"* discute le possibili conseguenze dell'ingegnerizzazione della sequenza dell'mRNA della spike sulla traduzione in proteina di cui si riporta un elaborato del testo: [136]

Come funziona il vaccino

Il vaccino contro il SARS CoV-2 (virus della Covid-19) di BioNTec / Pfizer chiamato BNT162b2, ma anche Tozinameran, o Comirnaty, contiene circa 30 µg di RNA, che viene iniettato in una sfera lipidica all'interno del corpo umano, in particolare all'interno del citoplasma delle cellule, ma fuori dal nucleo (dove si trova il DNA); questo RNA ha l'informazione genetica modificata (quindi è un modRNA), cioè un mRNA (RNA messaggero) contenente istruzioni per mettere in atto una fabbrica di proteine, cloni della proteina S Spike, cioè la proteina (e solo la proteina, non l'intero virus) utilizzato dal virus del Covid-19 per entrare nell'ospite e infettarlo.
Una volta prodotte in serie dai ribosomi, vengono trasportate all'esterno della cellula, oltre il rivestimento lipidico; in questo modo il sistema immunitario identifica queste proteine come invasori cellulari e le attacca, attraverso la produzione di anticorpi.
Questo è il motivo per cui non è concepibile che il vaccino induca la Covid-19 o che modifichi il DNA umano. [137]

Sintesi proteica

La traduzione è generalmente suddivisa in tre fasi: inizio, allungamento e fine. Il ribosoma si lega all'mRNA nel codone iniziale; la catena polipeptidica si allunga nella direzione del movimento ribosomiale, per successiva aggiunta di amminoacidi; quando viene trovato un codone di Stop, il polipeptide viene rilasciato e il ribosoma si dissocia.

Errori nell'assemblaggio e nella traduzione della sequenza

La conversione della sequenza dell'mRNA in un polipeptide dipende dall'RNA transfer (tRNA) per il trasporto degli amminoacidi al ribosoma. Nei ribosomi, il tRNA si accoppia con l'mRNA mediante l'appaiamento di basi complementari tra nucleotidi del codone di mRNA e nucleotidi dell'anticodone del tRNA. Una volta che il tRNA corretto è legato ad un codone, trasferisce il suo amminoacido all'estremità di una catena polipeptidica in crescita.
La decifrazione dei codoni di mRNA mediante l'RNA transfer (tRNA) nel ribosoma implica l'accoppiamento di basi secondo Watson-Crick.

Si stima che i tassi di errore generale della replicazione genomica (circa 10^{-8}) siano circa 10.000 volte inferiori a quelli della sintesi proteica (circa 10^{-4}), e quindi nella maggior parte dei casi la traduzione dell'mRNA è il processo chiave che contribuisce all'imprecisione del proteoma cellulare.
La discrepanza tra i tassi di errore nella replicazione del DNA e nella traduzione dell'mRNA può essere in parte correlata al fatto che la replicazione del DNA avviene a livello dei singoli nucleotidi (coinvolgendo $4^1 = 4$ possibili permutazioni), mentre il meccanismo di traduzione interpreta i codoni dell'mRNA in triplette (coinvolgendo $4^3 = 64$ possibili permutazioni).
L'efficienza del macchinario di decodifica dell'mRNA è anche essenzialmente regolata dal bias di utilizzo del codone che si distingue per codoni sinonimi sovra o sottorappresentati. Di conseguenza, l'ottimizzazione dell'oscillazione del tRNA e dell'utilizzo del codone nell'mRNA può migliorare sostanzialmente l'efficienza e l'accuratezza della traduzione.

Durante la trascrizione e l'elaborazione post-traduzionale dell'mRNA possono essere introdotti indirettamente errori nella sequenza proteica. Tuttavia, il meccanismo di traduzione può contribuire direttamente alla traduzione errata

[136] Smith K
BNT162b2 Vaccine: Possible Codons Misreading, Errors in Protein Synthesis and Alternative Splicing's Anomalies.
J Antivir Antiretrovir. (2021) 13:210.
https://www.longdom.org/open-access/bnt162b2-vaccine-possible-codons-misreading-errors-in-protein-synthesis-and-alternative-splicings-anomalies.pdf
https://www.sanambiens.it/vaccino-covid-19-the-worst-case-scenario/

https://berthub.eu/articles/posts/italian-reverse-engineering-source-code-of-the-biontech-pfizer-vaccine/
https://berthub.eu/articles/posts/reverse-engineering-source-code-of-the-biontech-pfizer-vaccine/

[137] https://www.deplatformdisease.com/blog/no-really-mrna-vaccines-are-not-going-to-affect-your-dna
https://www.deplatformdisease.com/blog/mrna-vaccines-and-covid-19

mediante errata decodifica del tRNA (che porta a incorporazione errata o lettura del codone di stop), mis-acilazione del tRNA (che porta a un accoppiamento amminoacidico errato del tRNA), riassegnazione del codone o spostamenti di frame provocati dalla traslocazione ribosomiale.[138]

METODO DI INDAGINE

Analisi della sequenza genetica

Il vaccino è composto da un pre-mRNA di 4284 nucleotidi contenente l'intera sequenza della Spike del SARs-Cov-2, suddivisa in 6 sezioni:
Il **Cap** è l'inizio della sequenza, che si apre con i due nucleotidi **GA**, indicando falsamente che l'mRNA proviene dalla cellula umana affinchè venga accettato;
Il **5'** indica la direzione da seguire per la traduzione, mentre l'**UTR** indica l'area in cui il ribosoma deve risiedere per produrre le proteine (in questo caso una sequenza ottimizzata proveniente dal gene dell'alfa globulina che incrementa la quantità di proteina prodotta [139]).

GA**GAAΨAAACΨAGΨAΨΨCΨΨCΨGGΨCCCCACAGACΨCAGAGAGAACCCGCCACC**

5' UTR (posizione 1-54)

In questo segmento l'U dell'uracile è stata sostituita con una molecola di 1-metil-3'-pseudouridina, indicata con il carattere **Ψ**, per bypassare il sistema immunitario e prevenire la degradazione dell'mRNA appena entrato; tuttavia, questo è un fattore che può portare a errori nella produzione di proteine.
Sono coinvolte molteplici Ψ-sintasi nella modifica di posizioni specifiche delle proteine e in molte di esse i difetti sono legati a malattie umane.[140]

Poi c'è la sezione **sig**, detta *sequenza di avvio estesa* del peptide di segnalazione della glicoproteina S, le cui informazioni sono necessarie per guidare la proteina appena formata fuori dalla cellula attraverso il reticolo endoplasmatico.

Virus: AUG UUU GUU UUU CUU GUU UUA UUG CCA CUA GUC UCU AGU CAG UGU GUU
Vaccino: AUG UUC GUG UUC CUG GUG CUG CUG CCU CUG GUG UCC AGC CAG UGU GUG

La Ψ è sostituita con U per agevolare il confronto tra le sequenze – sequenza sig (posizione 55-102)

Anche qui vengono messe in atto modifiche alle triplette di nucleotidi per far accettare l'RNA al sistema immunitario, cambiando alcune lettere, che compongono l'informazione, con altre (solitamente in 3ª posizione, secondo il meccanismo dell' "oscillazione"), apparentemente "sinonimi innocui" (principalmente aumentando il numero di lettere C e G, che codificano la velocità di sintesi proteica).
Le modifiche nel vaccino (UUU -> UUC) sono tutte sinonime, ma l'RNA con una maggiore quantità di G e C viene convertito in modo più efficiente in proteine, probabilmente prevenendo la formazione di forcine nell'RNA [141]

[138] Ou X, Cao J, Cheng A, Peppelenbosch MP, Pan Q.
Errors in translational decoding: tRNA wobbling or misincorporation?
PLoS Genet. 2019 Mar 28;15(3):e1008017. doi: 10.1371/journal.pgen.1008017.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6438450/

[139] Asrani KH, Farelli JD, Stahley MR, Miller RL, Cheng CJ, Subramanian RR, Brown JM. Optimization of mRNA untranslated regions for improved expression of therapeutic mRNA. RNA Biol. 2018;15(6):756-762. doi: 10.1080/15476286.2018.1450054. Epub 2018 Mar 26.
https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2018.1450054

[140] Khonsari B, Klassen R.
Impact of Pus1 Pseudouridine Synthase on Specific Decoding Events in Saccharomyces cerevisiae.
Biomolecules. 2020 May 7;10(5):729. doi: 10.3390/biom10050729.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7277083/

[141] Pardi, N., Hogan, M., Porter, F. et al.
mRNA vaccines — a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov 17, 261–279 (2018). https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243
https://www.nature.com/articles/nrd.2017.243

https://moodle2.units.it/pluginfile.php/104451/mod_forum/attachment/5811/4-Struttura%20RNA%20e%20topologia%20del%20DNA%20BS.pdf

Tuttavia, mentre specificano amminoacidi identici, i due sinonimi non sono esattamente gli stessi, almeno quando si tratta dell'atto di traduzione.
Studi meccanicistici mostrano che ci sono differenze sottili ma significative nel modo in cui ciascuno interagisce con il suo corrispondente RNA di trasferimento (tRNA), differenze che influenzano sia la velocità che l'accuratezza della traduzione. [142]
Mentre è vero che 3 lettere formano un codone e più di un codone codifica per lo stesso amminoacido, è anche vero che aumentando in modo sproporzionato il tasso di produzione di proteine, potrebbero esserci rischi di gravi errori di traduzione.

Anche i caratteri che compongono la sequenza relativa alla costruzione della vera proteina Spike **S protein_mut** sono stati alterati con più C e G che è stato possibile aggiungere, rispettando i sinonimi nella tabella dei codici genetici standard, con sostituzione degli aminoacidi Lisina (AAA) e Valina (GUU) con la Prolina (CUU) [143], un aminoacido che tende a rendere particolarmente rigida la struttura della proteina, per evitare che la proteina costruita collassi su sé stessa annullando la capacità del vaccino di produrre anticorpi anti-spike [144].
Alla fine di questa sequenza ci sono 2 codoni di stop. Non è completamente dimostrato che gli stessi elementi si formeranno con questa sostituzione e non ci saranno errori di lettura errata.

	L	D	K	V	E	A	E	V	Q	I	D	R	L	I	T	G
Virus:	CUU	GAC	AAA	GUU	GAG	GCU	GAA	GUG	CAA	AUU	GAU	AGG	UUG	AUC	ACA	GGC
Vaccine:	CUG	GAC	CCU	CCU	GAG	GCC	GAG	GUG	CAG	AUC	GAC	AGA	CUG	AUC	ACA	GGC
	L	D	P	P	E	A	E	V	Q	I	D	R	L	I	T	G

Sequenza contenente la sostituzione 2P (La Ψ è sostituita con U per agevolare il confronto tra le sequenze) sequenza S protein_mut (posizione 103-3879 dettaglio 3004-3051)

	V	L	K	G	V	K	L	H	Y	T	s	
Virus:	GUG	CUC	AAA	GGA	GUC	AAA	UUA	CAU	UAC	ACA	UAA	
Vaccine:	GUG	CUG	AAG	GGC	GUG	AAA	CUG	CAC	UAC	ACA	UGA	UGA
	V	L	K	G	V	K	L	H	Y	T	s	s

Sequenza terminale della S protein_mut (La Ψ è sostituita con U per agevolare il confronto tra le sequenze)
Il virus originale utilizza il codone di arresto UAA, il vaccino utilizza due codoni di arresto UGA (posizione 3844-3879)

3'-UTR (Untranslated Region 3 First): dovrebbe indicare la direzione della traduzione della sequenza e migliorare la sintesi proteica, tuttavia molte delle sue funzioni rimangono sconosciute; pertanto è impossibile accertarne la sicurezza.
L'unica cosa che è nota, come dichiarato dall'OMS, è la seguente frase: L'UTR 3' per il vaccino BioNTech / Pfizer è stato preso da "l'mRNA Amino-terminale Enhancer of Split (AES) e l'RNA ribosomiale 12S codificato mitocondriale".

Kudla G, Lipinski L, Caffin F, Helwak A, Zylicz M.
High guanine and cytosine content increases mRNA levels in mammalian cells.
PLoS Biol. 2006 Jun;4(6):e180. doi: 10.1371/journal.pbio.0040180. Epub 2006 May 23.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1463026/

[142] Robinson R.
Which codon synonym is best? It may depend on what's on the menu.
PLoS Biol. 2014 Dec 9;12(12):e1002014. doi: 10.1371/journal.pbio.1002014.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260823/

[143] Pallesen J, Wang N, Corbett KS, et al.
Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2017;114(35):E7348-E7357. doi:10.1073/pnas.1707304114
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5584442/

[144] https://cen.acs.org/pharmaceuticals/vaccines/tiny-tweak-behind-COVID-19/98/i38

Poly (A): Raggiungiamo quindi la fine della sequenza e incontriamo 30 A, quindi un collegamento GCAUAUGACU a 10 nucleotidi, seguito da altri 70 A.

Ogni mRNA può essere riutilizzato dall'organismo più volte, ma quando ciò accade perde anche alcuni degli A alla fine. Una volta che l'A è esaurito, l'mRNA non è più funzionale e viene scartato. [145] In questo modo, la coda "poli-A" è una protezione dalla degradazione.

UAGCAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAGCAUAU GACUAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAA

(La Ψ è sostituita con U per agevolare il confronto tra le sequenze)
In giallo il linker di 10 nucleotidi

Il linker a 10 nucleotidi all'interno della coda di poli (A) sembra sia in grado di facilitare l'unione dei frammenti di DNA sintetico che diventano lo stampo per la trascrizione dell'mRNA e di ridurre lo slittamento da parte della RNA polimerasi T7, in modo che l'mRNA trascritto sia più uniforme in lunghezza migliorandone l'efficacia. [146]

Tutte queste modifiche per aumentare l'espressione delle proteine sono brevettate e non si sa nulla sulla traduzione effettiva che avviene nell'organismo.

Splicing alternativo e altri errori

Un altro problema correlato è che lo stesso pre-mRNA può dare origine a diversi mRNA maturi, e quindi a proteine leggermente diverse (anomalie dello **splicing alternativo**).
È stato scoperto che un'alterazione nel processo di sintesi proteica è la causa dello sviluppo e della crescita di alcuni tumori e altre malattie, senza alterare in alcun modo il DNA.
Ad esempio, tutti gli eventi di splicing identificati nei tre geni della serie PHT (Phosphorus Transporter Genes) comportano la perdita del frame di lettura della sequenza del messaggero e l'introduzione di un codone di terminazione prematura (PTC) situato sempre a più di 50-55 nucleotidi a monte dell'ultima giunzione esone-esone, il che rende i trascritti alternativi target del sistema di sorveglianza NMD (Nonsense-mediated mRNA Decay).
Per slc15a4 / PHT1 umano e di ratto, ciò è stato dimostrato da esperimenti di inibizione dell'NMD in diverse linee cellulari, in cui l'espressione di varianti alternative ai trascritti canonici è stata sempre stabilizzata dopo l'inibizione. [147]

CONCLUSIONI

Possibili rischi a lungo termine per la salute umana

L'autrice afferma che, oltre a non essere ottimizzata, la sequenza presenta forti dubbi sulla presenza di errori di utilizzo del codone. È possibile ipotizzare che un'eccessiva alterazione finalizzata ad un aumento estremo dell'espressione proteica possa essere fonte di errori nell'assemblaggio della sequenza genica dell'mRNA.[148]

---

[145] Jacobson A, Peltz SW.
Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells.
Annu Rev Biochem. 1996;65:693-739. doi: 10.1146/annurev.bi.65.070196.003401.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8811193/

Eisen TJ, Eichhorn SW, Subtelny AO, et al.
The Dynamics of Cytoplasmic mRNA Metabolism.
Mol Cell. 2020;77(4):786-799.e10. doi:10.1016/j.molcel.2019.12.005
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7265681/

[146] Trepotec Z, Geiger J, Plank C, Aneja MK, Rudolph C.
Segmented poly(A) tails significantly reduce recombination of plasmid DNA without affecting mRNA translation efficiency or half-life.
RNA. 2019;25(4):507-518. doi:10.1261/rna.069286.118
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6426288/

[147] Andries, O.
mRNA Modification and delivery strategies towards the establishment of a platform for safe and effective gene therapy.
Ghent University. Faculty of Veterinary Medicine, Merelbeke, Belgium. (2015).
https://biblio.ugent.be/publication/5914818/file/5914827.pdf

[148] Wu Q, Medina SG, Kushawah G, DeVore ML, Castellano LA, Hand JM, Wright M, Bazzini AA.

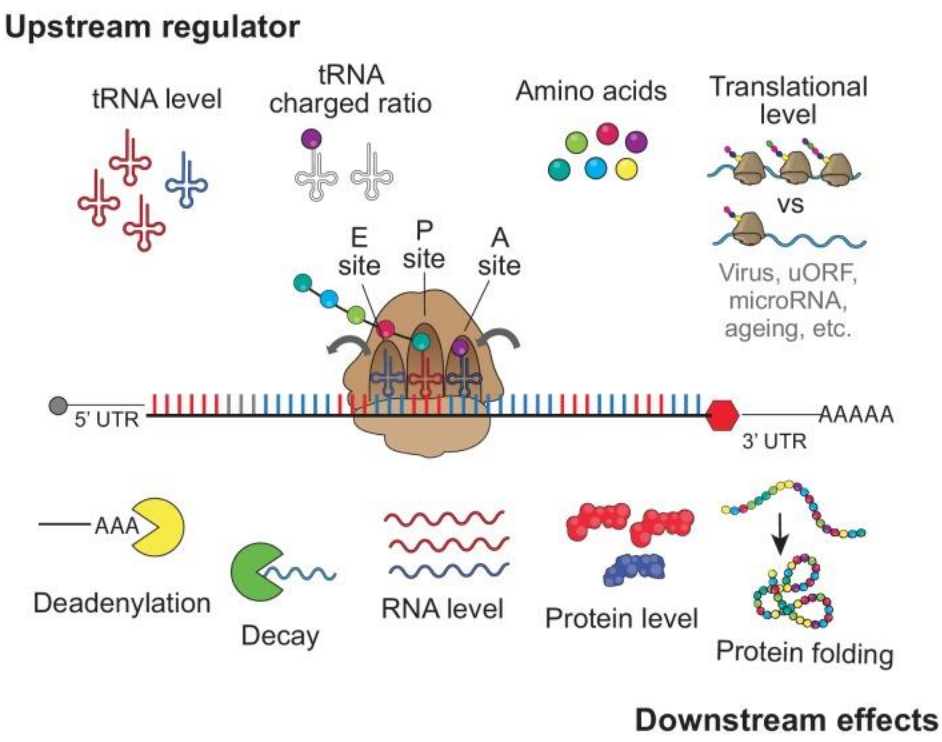


Fig. 2 il regolatore a monte e l'effetto a valle per l'ottimalità del codone Il livello di tRNA, il rapporto caricato con tRNA, l'amminoacido e il livello di traduzione potrebbero contribuire a regolare l'identità normativa e / o la forza di ciascun codone per influenzare l'espressione genica, influenzando la velocità di allungamento della traduzione. Gli effetti a valle del meccanismo meditato dal codone sono la deadenilazione dell'RNA, il decadimento dell'mRNA, il livello di mRNA, il livello di proteine e il ripiegamento delle proteine.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6529216/

L'alterazione della disponibilità di tRNA [e quindi del loro profilo, che dipende dal tipo e dallo stato di differenziazione cellulare], può portare a malattie neurodegenerative [149], mentre la sovraregolazione di specifici tRNA guida le metastasi aumentando la stabilità dei trascritti arricchiti nei loro codoni affini. [150]

La cattiva traduzione ha conseguenze molto gravi sulla fisiopatologia di una varietà di malattie, tra cui sclerosi multipla, neurodegenerazione, miopatia mitocondriale, encefalopatia, acidosi lattica, episodi simili a ictus, morbo di Parkinson e cancro (genesi, accelerazione della crescita e metastasi).[151]

Translation affects mRNA stability in a codon-dependent manner in human cells.
Elife. 2019 Apr 23;8:e45396. doi: 10.7554/eLife.45396.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6529216/

[149] Ishimura R, Nagy G, Dotu I, Zhou H, Yang XL, Schimmel P, Senju S, Nishimura Y, Chuang JH, Ackerman SL.
RNA function. Ribosome stalling induced by mutation of a CNS-specific tRNA causes neurodegeneration.
Science. 2014 Jul 25;345(6195):455-9. doi: 10.1126/science.1249749.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4281038/

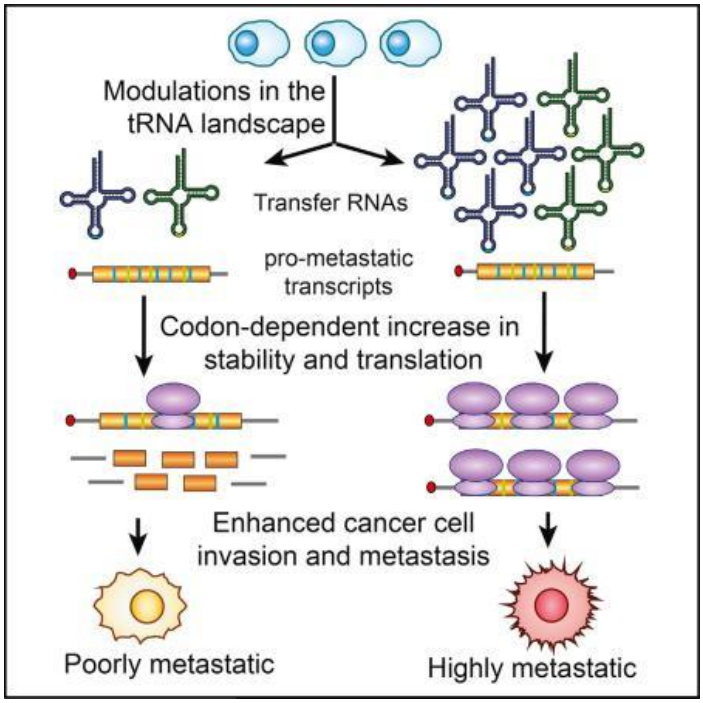
Gao FB, Richter JD, Cleveland DW.
Rethinking Unconventional Translation in Neurodegeneration.
Cell. 2017;171(5):994-1000. doi:10.1016/j.cell.2017.10.042
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5728172/

[150] Goodarzi H, Nguyen HCB, Zhang S, Dill BD, Molina H, Tavazoie SF.
Modulated Expression of Specific tRNAs Drives Gene Expression and Cancer Progression.
Cell. 2016;165(6):1416-1427. doi:10.1016/j.cell.2016.05.046
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915377/

Santos M, et al
Codon misreading tRNAs promote tumor growth in mice.
RNA Biol. 2018;15(6):773-786. doi: 10.1080/15476286.2018.1454244. Epub 2018 Jun 7.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6152441/

[151] Walsh MJ, Cooper-Knock J, Dodd JE, et al.
Invited review: decoding the pathophysiological mechanisms that underlie RNA dysregulation in neurodegenerative disorders: a review of the current state of the art.
Neuropathol Appl Neurobiol. 2015;41(2):109-134. doi:10.1111/nan.12187
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329338/

Vaklavas C, Blume SW, Grizzle WE.
Translational Dysregulation in Cancer: Molecular Insights and Potential Clinical Applications in Biomarker Development.
Front Oncol. 2017;7:158. Published 2017 Jul 26. doi:10.3389/fonc.2017.00158



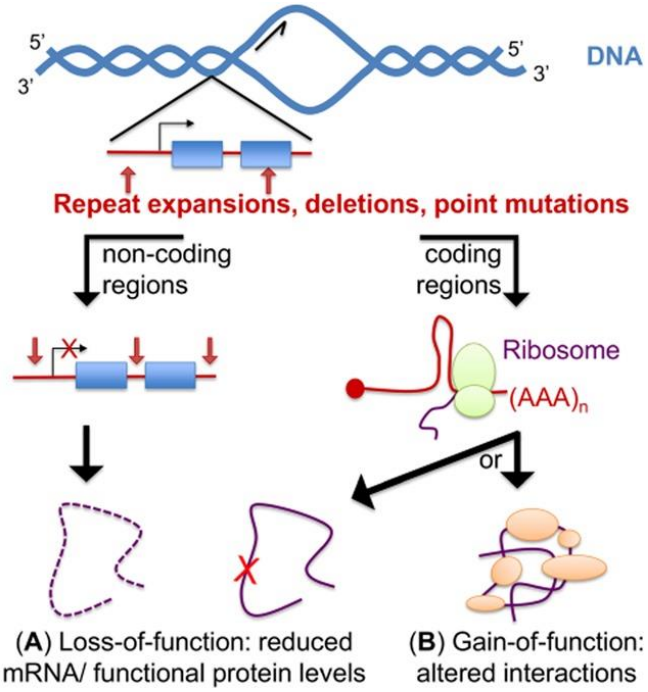


Fig1 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915377/ Fig.2 https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4329338/

Fig. 2 Meccanismi che conferiscono perdita di proteine e effetti tossici di guadagno di funzione. Il diagramma illustra le mutazioni patogene (espansioni ripetute, delezioni, mutazioni puntiformi) che possono verificarsi nelle regioni non codificanti o codificanti del genoma (rispettivamente lato sinistro e destro). (A) Perdita di funzione delle proteine. L'aploinsufficienza può verificarsi quando il livello di un particolare mRNA è sotto-regolato a causa di mutazioni in regioni non codificanti di geni come promotori / introni, o se il promotore è soggetto a modificazioni istone / DNA (repressione trascrizionale), ma anche se mutazioni in regioni 5 ′ o 3 ′ non tradotte (UTR) riducono la stabilità dell'mRNA. La perdita di funzione delle proteine può verificarsi anche quando mutazioni nelle regioni codificanti alterano direttamente l'attività della proteina mutata (ripiegamento errato, alterazione del sito attivo). (B) Il guadagno di funzioni tossiche per le proteine è causato da mutazioni nelle regioni codificanti che promuovono interazioni anormali, aumentano l'interazione della proteina mutata con i suoi leganti naturali e / o promuovono il ripiegamento / aggregazione errata.

La correlazione tra la velocità di sintesi proteica, aumentata del 100%, con gli errori di traduzione della sequenza, nonché il meccanismo che influisce sulla produzione di amminoacidi rimangono in questo caso per ora oscuri, in quanto molte prove non sono ancora state eseguite.
L'autrice conclude sostenendo che il codice della sequenza totale è intrinsecamente alterato in modo sbilanciato, troppo rispetto alla controparte virale naturale, e troppo per poter dire che l'organismo umano sia in grado di riprodurre esattamente le proteine S Spike del virus naturale, rischiando così di recare gravi danni alla salute umana a lungo termine, oltre alla mancata efficacia nell'immunizzazione.

Quello che verrà prodotto da quella sequenza è tutt'altro che ben definito, ma è scritto nei geni di ogni individuo, nel profilo ribosomiale, come verrà tradotto e cosa si produrrà, e di conseguenza i benefici o i danni che ne deriveranno.

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5526920/

PRODUZIONE DELL'mRNA DEL VACCINO "MODERNA" [152]

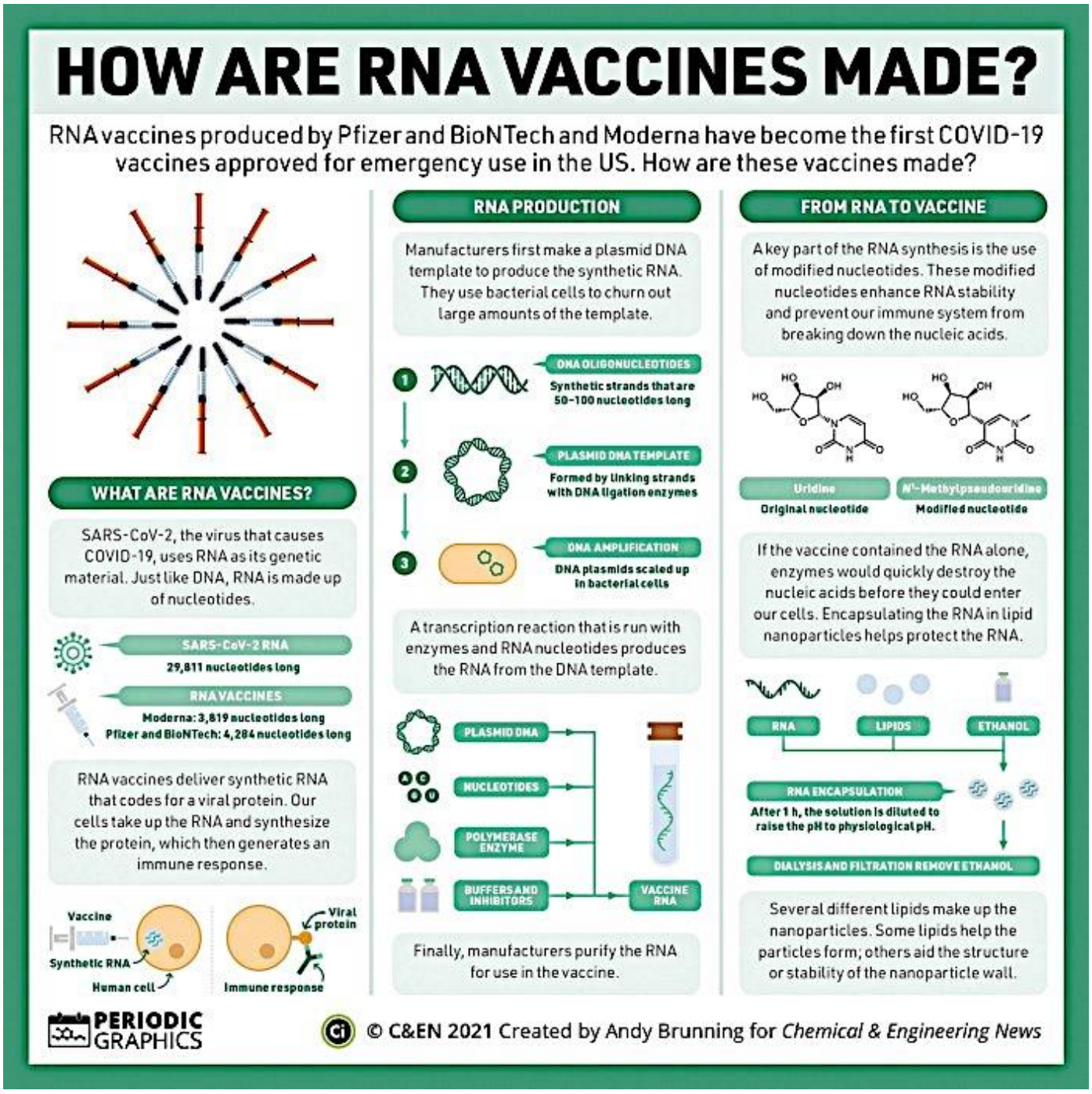
Principio attivo

Il principio attivo (CX-024414) è l'mRNA che codifica per la proteina Spike (S) del SARS-Cov-2 stabilizzata in pre-fusione.
La proteina S è composta da due subunità (S1 e S2) ed è stabilizzata nella cosiddetta conformazione di pre-fusione da due mutazioni amminoacidiche, K986P e V987P.
La sequenza di mRNA include un 5'-cap, la regione non tradotta 5'-UTR, l'Open Reading Frame (ORF), il 3'-UTR e la coda di 3'-polyA.
L'RNA contiene N1-metilpseudouridina modificata invece dell'uridina per ridurre al minimo il riconoscimento indiscriminato dell'mRNA da parte dei recettori del pattern molecolare associati ai patogeni (ad esempio TLR).
La Figura sottostante illustra la struttura generale dell'RNA che codifica per l'antigene.

Il processo di produzione dell'mRNA CX-024414 prevede diversi passaggi principali.
L'mRNA senza cappuccio viene trascritto dal DNA lineare utilizzando una reazione di trascrizione in vitro (IVT) seguita da fasi di purificazione e filtrazione.
Successivamente, l'mRNA viene bloccato per via enzimatica seguito da ulteriori fasi di purificazione e filtrazione.
Infine, l'mRNA di CX-214414 viene filtrato, confezionato e conservato.

L'assessment report non fornisce altre informazioni riguardanti la sequenza del costrutto e la sua produzione industriale, come non fornisce dati sufficienti sugli studi di sicurezza sui nuovi eccipienti dell'LNP.

[152] https://www.modernatx.com/mrna-technology/research-engine
https://www.modernatx.com/mrna-technology/early-development-engine
https://www.modernatx.com/patents
https://www.fda.gov/media/144673/download
https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/covid-19-vaccine-moderna-epar-risk-management-plan_en.pdf
https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf


HOW ARE RNA VACCINES MADE?
RNA vaccines produced by Pfizer and BioNTech and Moderna have become the first COVID-19 vaccines approved for emergency use in the US. How are these vaccines made?
WHAT ARE RNA VACCINES?
SARS-CoV-2, the virus that causes COVID-19, uses RNA as its genetic material. Just like DNA, RNA is made up of nucleotides.
SARS-CoV-2 RNA
29,811 nucleotides long
RNA VACCINES
Moderna: 3,819 nucleotides long
Pfizer and BioNTech: 4,284 nucleotides long
RNA vaccines deliver synthetic RNA that codes for a viral protein. Our cells take up the RNA and synthesize the protein, which then generates an immune response.
Vaccine
Synthetic RNA
Human cell
Viral protein
Immune response
RNA PRODUCTION
Manufacturers first make a plasmid DNA template to produce the synthetic RNA. They use bacterial cells to churn out large amounts of the template.
1
DNA OLIGONUCLEOTIDES
Synthetic strands that are 50–100 nucleotides long
2
PLASMID DNA TEMPLATE
Formed by linking strands with DNA ligation enzymes
3
DNA AMPLIFICATION
DNA plasmids scaled up in bacterial cells
A transcription reaction that is run with enzymes and RNA nucleotides produces the RNA from the DNA template.
PLASMID DNA
NUCLEOTIDES
POLYMERASE ENZYME
BUFFERS AND INHIBITORS
VACCINE RNA
Finally, manufacturers purify the RNA for use in the vaccine.
FROM RNA TO VACCINE
A key part of the RNA synthesis is the use of modified nucleotides. These modified nucleotides enhance RNA stability and prevent our immune system from breaking down the nucleic acids.
Uridine
Original nucleotide
N1-Methylpseudouridine
Modified nucleotide
If the vaccine contained the RNA alone, enzymes would quickly destroy the nucleic acids before they could enter our cells. Encapsulating the RNA in lipid nanoparticles helps protect the RNA.
RNA
LIPIDS
ETHANOL
RNA ENCAPSULATION
After 1 h, the solution is diluted to raise the pH to physiological pH.
DIALYSIS AND FILTRATION REMOVE ETHANOL
Several different lipids make up the nanoparticles. Some lipids help the particles form; others aid the structure or stability of the nanoparticle wall.
PERIODIC GRAPHICS
© C&EN 2021 Created by Andy Brunning for Chemical & Engineering News

Produzione secondo le Buone Pratiche di Produzione (GMP)

Tutti gli enzimi e i componenti di reazione richiesti per la produzione in GMP dell'mRNA possono essere ottenuti da fornitori commerciali, come le sostanze chimiche di sintesi o reagenti espressi da batteri privi di componenti animali, evitando così i problemi di sicurezza relativi agli agenti avventizi che affliggono la produzione di vaccini basati su colture cellulari.
Tutti i componenti, come il DNA plasmidico, le polimerasi fagiche, gli enzimi per il capping e gli NTP, sono prontamente disponibili come componenti tracciabili di grado GMP; tuttavia, alcuni di questi sono attualmente disponibili solo su scala limitata o ad alto costo.

La produzione GMP dell'mRNA inizia con la produzione dello stampo di DNA e l'IVT enzimatica e segue lo stesso protocollo multistep utilizzato per la sintesi su scala di ricerca, con controlli aggiunti per garantire la sicurezza e la potenza del prodotto [153].
Per avviare il processo di produzione, il DNA plasmidico stampo prodotto in Escherichia coli viene linearizzato utilizzando un enzima di restrizione che consente la sintesi dei trascritti con un tratto poli (A) all'estremità 3'. Successivamente, l'mRNA viene sintetizzato mediante una RNA polimerasi DNA dipendente del batteriofago (come T7, SP6 o T3).
Il DNA stampo viene quindi degradato mediante incubazione con DNasi e infine, l'mRNA viene bloccato con enzimi o chimicamente per consentire una traduzione efficiente in vivo. La sintesi dell'mRNA è altamente produttiva, portando ad oltre 2 g/L di mRNA a lunghezza intera in condizioni ottimizzate.[154]
I vaccini a mRNA in quanto prodotti farmaceutici devono soddisfare gli standard di purezza previsti dalla normativa.
La purificazione dei trascritti di mRNA è un passaggio cruciale e quindi è necessaria una procedura standard nella produzione dei vaccini a mRNA per ottenere un'espressione proteica efficiente e un'adeguata immunogenicità.
Alcuni risultati hanno dimostrato che la purificazione dell'mRNA può portare a un aumento di 1000 volte nella produzione di proteine nelle DC primarie umane. [155]

Quindi, una volta sintetizzato, l'mRNA passa attraverso diversi step di purificazione per rimuovere i componenti della reazione, inclusi enzimi, nucleotidi liberi, DNA residuo e frammenti di RNA troncati.

---

[153] Pardi N, Muramatsu H, Weissman D, Karikó K.
In vitro transcription of long RNA containing modified nucleosides.
Methods Mol Biol. 2013;969:29-42. doi: 10.1007/978-1-62703-260-5_2.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23296925/

[154] Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, Weissman D.
mRNA vaccines - a new era in vaccinology.
Nat Rev Drug Discov. 2018;17(4):261-279. doi:10.1038/nrd.2017.243
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/

Jackson, N.A.C., Kester, K.E., Casimiro, D. et al.
The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective.
npj Vaccines 5, 11 (2020). https://doi.org/10.1038/s41541-020-0159-8
https://www.nature.com/articles/s41541-020-0159-8

Akama S, Yamamura M, Kigawa T.
A multiphysics model of in vitro transcription coupling enzymatic reaction and precipitation formation.
Biophys J. 2012 Jan 18;102(2):221-30. doi: 10.1016/j.bpj.2011.12.014.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3260666/

Kis, Z., Kontoravdi, C., Dey, A.K., Shattock, R. and Shah, N.,
Rapid development and deployment of high-volume vaccines for pandemic response.
J Adv Manuf Process, (2020) 2: e10060. https://doi.org/10.1002/amp2.10060
https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/amp2.10060

[155] Karikó K, Muramatsu H, Ludwig J, Weissman D.
Generating the optimal mRNA for therapy: HPLC purification eliminates immune activation and improves translation of nucleoside-modified, protein-encoding mRNA.
Nucleic Acids Res. 2011 Nov;39(21):e142. doi: 10.1093/nar/gkr695. Epub 2011 Sep 2.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3241667/

Mentre la precipitazione con LiCl viene abitualmente utilizzata per la preparazione su scala di laboratorio, la purificazione su scala clinica utilizza microsfere derivatizzate in batch o colonna, che sono più facili da utilizzare su larga scala [156].
Per alcune piattaforme di mRNA, la rimozione del dsRNA e di altri contaminanti è fondamentale per la potenza del prodotto finale, poiché come già visto è un potente induttore dell'inibizione della traduzione dipendente dall'interferone.
La purificazione mediante HPLC elimina il dsRNA derivante dall'IVT e quindi aumenta l'espressione proteica.
Tuttavia, la purificazione HPLC a fase inversa accoppiata allo scambio ionico presenta alcuni svantaggi come il costo elevato delle apparecchiature e dei materiali di consumo, difficoltà nel potenziare il processo in modo conveniente, il trattamento dei rifiuti pericolosi di acetonitrile, la perdita di resa di mRNA durante la purificazione (recupero del 50%) e il tempo di purificazione lungo.[157]

Recentemente, è stato descritto un nuovo metodo di purificazione [158] che potrebbe superare i principali svantaggi dell'HPLC fornendo una purificazione dal dsRNA comparabile.
Questo metodo utilizza il legame selettivo del dsRNA a una polvere di cellulosa con un tampone contenente etanolo e permette l'eliminazione fino al 90% del dsRNA. La cellulosa può essere utilizzata in una colonna rotante senza la necessità di apparecchiature costose.
Il metodo è economico, veloce e scalabile, essendo adatto per purificare l'IVT-mRNA su larga scala utilizzando la cromatografia liquida proteica rapida (FPLC), senza rifiuti tossici o pericolosi generati nel processo.
Infine, dopo l'iniezione endovenosa nei topi, si osserva un'espressione di antigene comparabile tra l'mRNA purificato con la cellulosa e da HPLC, mentre l'espressione più bassa è mostrata per l'mRNA non purificato.
Dopo che l'mRNA è stato purificato, viene aggiunto ad un tampone di conservazione finale e filtrato in condizioni sterili per il successivo riempimento in fiale per uso clinico.

L'RNA è suscettibile alla degradazione sia per via enzimatica che chimica, e quindi i tamponi di formulazione devono essere testati per garantire che siano privi di RNasi contaminanti e possano contenere componenti tampone, come antiossidanti e chelanti, che riducono al minimo gli effetti delle specie reattive dell'ossigeno e degli ioni metallici bivalenti che portano all'instabilità dell'mRNA [159].
La formulazione farmaceutica degli mRNA è un'area attiva di sviluppo. Sebbene la maggior parte dei prodotti per gli studi di fase iniziale siano conservati congelati (-70°C), continuano gli sforzi per sviluppare formulazioni stabili a temperature più elevate più adatte alla distribuzione del vaccino.
I report pubblicati suggeriscono che è possibile realizzare formulazioni stabili a temperatura ambiente o refrigerata.
È stato segnalato che la piattaforma RNActive è attiva dopo liofilizzazione e conservazione a 5–25°C per 3 anni e a 40°C per 6 mesi [160].

---

[156] Pascolo S.
Messenger RNA-based vaccines.
Expert Opin Biol Ther. 2004 Aug;4(8):1285-94. doi: 10.1517/14712598.4.8.1285.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15268662/

Geall AJ, Mandl CW, Ulmer JB.
RNA: the new revolution in nucleic acid vaccines.
Semin Immunol. 2013 Apr;25(2):152-9. doi: 10.1016/j.smim.2013.05.001. Epub 2013 Jun 2.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23735226/

[157] Weissman D, Pardi N, Muramatsu H, Karikó K.
HPLC purification of in vitro transcribed long RNA.
Methods Mol Biol. 2013;969:43-54. doi: 10.1007/978-1-62703-260-5_3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23296926/

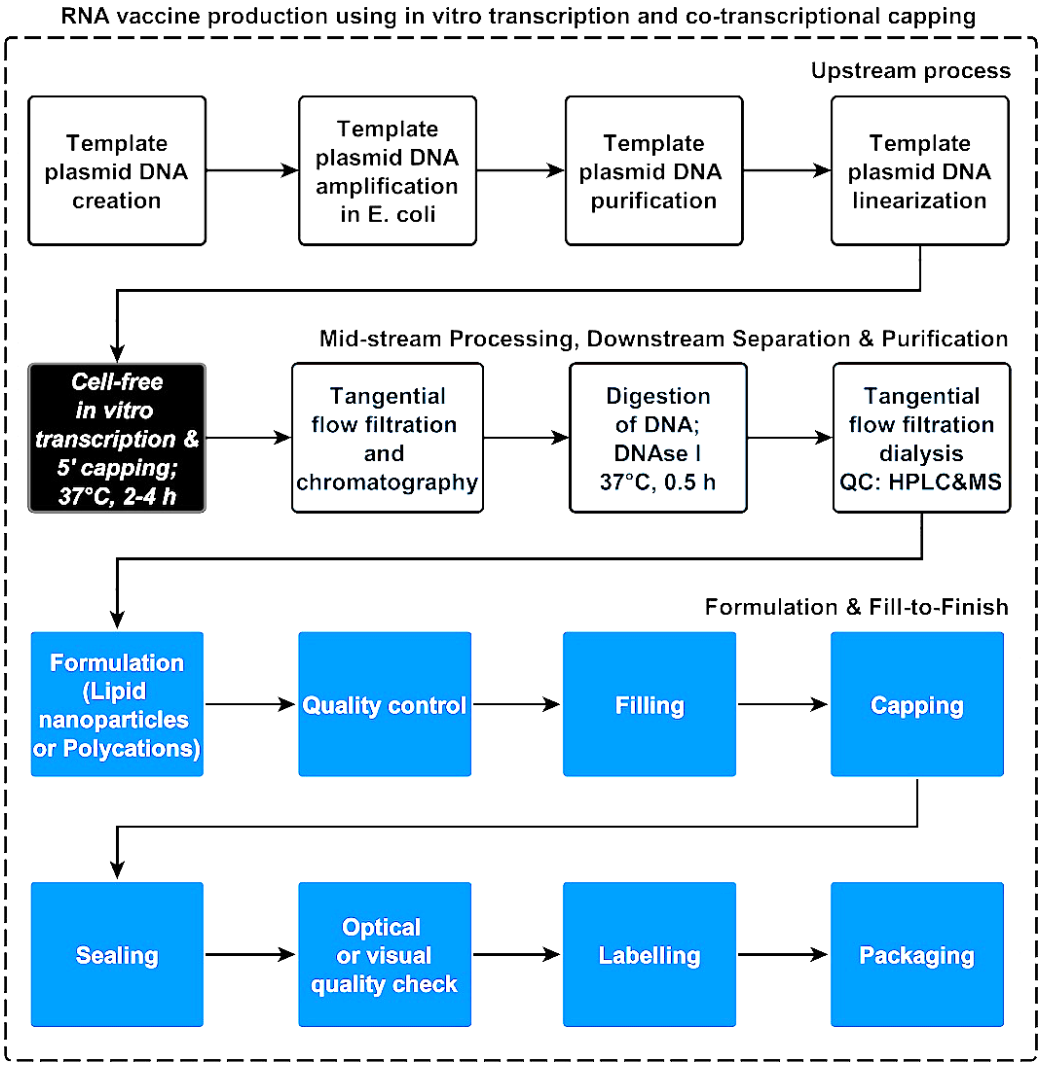
[158] Baiersdörfer M, Boros G, Muramatsu H, Mahiny A, Vlatkovic I, Sahin U, Karikó K.
A Facile Method for the Removal of dsRNA Contaminant from In Vitro-Transcribed mRNA.
Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Apr 15;15:26-35. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.018. Epub 2019 Feb 27.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6444222/

[159] Muralidhara BK, Baid R, Bishop SM, Huang M, Wang W, Nema S.
Critical considerations for developing nucleic acid macromolecule-based drug products.
Drug Discov Today. 2016 Mar;21(3):430-44. doi: 10.1016/j.drudis.2015.11.012. Epub 2015 Dec 7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26674130/

[160] Alberer M, et al
Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial.

Un altro report ha dimostrato che l'mRNA nudo liofilizzato è stabile per almeno 10 mesi in condizioni di refrigerazione [161].

La stabilità dei prodotti di mRNA potrebbe anche essere migliorata incapsulandolo all'interno di nanoparticelle o mediante co-formulazione con inibitori della RNasi [162].



https://aiche.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/amp2.10060

Diagramma di flusso del processo per la produzione del vaccino mRNA basato sulla reazione enzimatica di trascrizione in vitro. Nel processo a monte il DNA stampo viene generato, amplificato, purificato e linearizzato. Nel processo mid - stream, l'RNA viene sintetizzato in seguito alla reazione di trascrizione in vitro utilizzando l'enzima T7 RNA polimerasi e il 5 ' capping dell'RNA viene ottenuto co-trascrizionalmente utilizzando analoghi 5'-cap (necessari per garantire l'espressione dell'antigene). Per la purificazione a valle, il TFF può essere utilizzato anche in combinazione con metodi cromatografici, come la cromatografia con idrossiapatite e la cromatografia a flusso passante a sfere. Nella prima fase TFF, l'mRNA e lo stampo di DNA linearizzato vengono trattenuti dal filtro e componenti di dimensioni molecolari più piccole, compreso l'enzima T7 RNA polimerasi, fluiscono attraverso il filtro. Successivamente, il modello di DNA linearizzato viene digerito utilizzando nucleasi e quindi i nucleotidi di DNA possono essere separati dall'RNA utilizzando un altro passaggio TFF. La sostanza farmacologica ottenuta viene quindi formulata prevalentemente in nanoparticelle lipidiche, tuttavia vengono sviluppate e valutate anche formulazioni policationiche. Successivamente, l'mRNA formulato viene sottoposto a controllo di qualità e viene inserito in fiale o contenitori per la vaccinazione di massa su scala pandemica. Le fiale vengono quindi tappate, sigillate, ispezionate utilizzando l'elaborazione automatica delle immagini, etichettate e confezionate in imballaggi secondari e terziari. L'intero processo di produzione è

Lancet. 2017 Sep 23;390(10101):1511-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. Epub 2017 Jul 25.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754494/

[161] Jones KL, Drane D, Gowans EJ.
Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies.
Biotechniques. 2007;43(5):675-681. doi:10.2144/000112593
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4526277/

[162] Probst J, Brechtel S, Scheel B, et al.
Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface.
Genet Vaccines Ther. 2006;4:4. Published 2006 May 29. doi:10.1186/1479-0556-4-4
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1524753/

indipendente dalla sequenza dell'RNA, quindi in linea di principio i vaccini contro praticamente qualsiasi malattia possono essere prodotti utilizzando lo stesso processo di produzione [163]

Veicolazione dell'mRNA

Il sistema di veicolazione è un elemento chiave nei vaccini a mRNA, in quanto dovrebbe proteggere l'mRNA dalle RNasi e migliorare il rilascio nel citosol.
Per una stimolazione efficiente del sistema immunitario innato, dovrebbe essere in grado di favorire il rilascio dell'mRNA nelle cellule immunitarie comprese le APC [164], le cellule B [165] o le cellule T [166].
Il rilascio di molecole di mRNA nelle cellule è impegnativo, in quanto una molecola di mRNA è 3-4 volte più grande di qualsiasi molecola in grado di diffondersi spontaneamente attraverso la membrana citoplasmatica, ed inoltre le molecole di mRNA sono cariche negativamente e quindi vengono respinte dalla membrana citoplasmatica.

Esistono due approcci di base per il rilascio dell'mRNA vaccinale (terapeutico e ad uso profilattico) descritti fino ad oggi. Il primo utilizzato è l'introduzione dell'mRNA nelle DC (cellule dendritiche) *ex vivo*, seguito dalla reinfusione delle cellule trasfettate [167]; e il secondo è l'iniezione parenterale diretta di mRNA con o senza un veicolo. [168]
L'uso delle DC trasfettate *ex vivo* consente un controllo preciso del bersaglio cellulare, dell'efficienza della trasfezione e di altre condizioni cellulari, ma come forma di terapia cellulare, è un approccio alla vaccinazione costoso e laborioso. L'iniezione diretta di mRNA è relativamente rapida ed economica, ma non consente ancora un rilascio specifico ed efficiente nel tipo di cellula bersaglio, sebbene ci siano stati progressi recenti in questo senso.[169]

---

[163] Kis Z, Shattock R, Shah N, Kontoravdi C.
Emerging Technologies for Low-Cost, Rapid Vaccine Manufacture.
Biotechnol J. 2019 Jan;14(1):e1800376. doi: 10.1002/biot.201800376. Epub 2018 Dec 10. Erratum in: Biotechnol J. 2019 Jul;14(7):1-2.
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.201800376

S. Bancel, W. J. Issa, J. G. Aunins, T. Chakraborty,
Manufacturing methods for production of RNA transcripts.
USA: United States Patent and Trademark Office; WO/2014/152027; PCT/US2014/026835; US20160024547A1, 2014.
https://patentimages.storage.googleapis.com/7a/bb/8f/5ce58cdaa18a0d/US20160024547A1.pdf.

S. F. Berlanda, Y. Wen, A. Geall, F. Porter,
RNA purification methods. 20160024139, EP2970948A1; WO2014140211A1, 2016.
https://patents.google.com/patent/EP2970948A1/no.

A. Funkner, S. Dorner, S. Sewing, J. Kamm, N. Broghammer, T. Ketterer, et al., A
Method for Producing and Purifying RNA, Comprising At Least One Step of Tangential Flow Filtration, World Intellectual Property Organization; PCT/EP2016/062152; WO/2016/193206, Germany 2016.
https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2016193206.

M. Heartlein, F. Derosa, A. Dias, S. Karve,
Methods for Purification of Messenger RNA, USA; DK14714150.1T; PCT/US2014/028441 2014.
https://patents.google.com/patent/DK2970955T3/en.

[164] Liang F, et al.
Efficient Targeting and Activation of Antigen-Presenting Cells In Vivo after Modified mRNA Vaccine Administration in Rhesus Macaques.
Mol Ther. 2017 Dec 6;25(12):2635-2647. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.006. Epub 2017 Aug 12.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768558/

[165] Fenton OS, et al
Synthesis and Biological Evaluation of Ionizable Lipid Materials for the In Vivo Delivery of Messenger RNA to B Lymphocytes.
Adv Mater. 2017 Sep;29(33). doi: 10.1002/adma.201606944. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28681930.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28681930/

[166] Pardi N, Nucleoside-modified mRNA vaccines induce potent T follicular helper and germinal center B cell responses.
J Exp Med. 2018 Jun 4;215(6):1571-1588. doi: 10.1084/jem.20171450. Epub 2018 May 8.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5987916/
[167] Benteyn D, Heirman C, Bonehill A, Thielemans K, Breckpot K.
mRNA-based dendritic cell vaccines.
Expert Rev Vaccines. 2015 Feb;14(2):161-76. doi: 10.1586/14760584.2014.957684. Epub 2014 Sep 8. PMID: 25196947.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25196947/

[168] Brisse M, Vrba SM, Kirk N, Liang Y, Ly H.
Emerging Concepts and Technologies in Vaccine Development.
Front Immunol. 2020;11:583077. Published 2020 Sep 30. doi:10.3389/fimmu.2020.583077
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554600/

[169] Kranz LM, et al

Sono state descritte numerose piattaforme per la somministrazione di mRNA e alcune sono già state testate in studi clinici [170] precedentemente alla sperimentazione per la profilassi del COVID-19, che comprendono trasportatori semplici, come la protamina [171], i dendrimeri [172], la polietilenimmina [173] o complessi colloidali più complessi come le miscele di nanoparticelle e lipidi [174] o nanoparticelle e peptidi che penetrano nelle cellule [175].

Principali metodi di somministrazione dei vaccini a mRNA

Sono mostrati i metodi di somministrazione comunemente usati e le molecole trasportatrici per i vaccini a mRNA insieme ai diametri tipici per i complessi particellari:
mRNA nudo (parte a);
mRNA nudo con elettroporazione in vivo (parte b);
protamina (peptide cationico) -mRNA complesso (parte c);
mRNA associato a una nanoemulsione cationica olio in acqua carica positivamente (parte d);
mRNA associato a un dendrimero modificato chimicamente e complessato con polietilenglicole (PEG) -lipid (parte e);
mRNA complessato con protamina in una nanoparticella lipidica PEG (parte f);
mRNA associato a un polimero cationico come polietilenimmina (PEI) (parte g);

Systemic RNA delivery to dendritic cells exploits antiviral defence for cancer immunotherapy. Nature. 2016 Jun 16;534(7607):396-401. doi: 10.1038/nature18300. Epub 2016 Jun 1.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27281205/

[170] Maruggi G, Zhang C, Li J, Ulmer JB, Yu D.
mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases.
Mol Ther. 2019;27(4):757-772. doi:10.1016/j.ymthe.2019.01.020
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453507/

Bahl K, et al
Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses.
Mol Ther. 2017 Jun 7;25(6):1316-1327. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.03.035. Epub 2017 Apr 27.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5475249/

Alberer M, et al
Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial.
Lancet. 2017 Sep 23;390(10101):1511-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. Epub 2017 Jul 25.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754494/

Feldman RA, et al
mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials.
Vaccine. 2019 May 31;37(25):3326-3334. doi: 10.1016/j.vaccine.2019.04.074. Epub 2019 May 10.
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X19305626?via%3Dihub

https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-provides-business-update-and-announces-three-new

[171] Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, Petsch B, Schlake T, Thess A, Baumhof P, Scheel B, Koch SD, Fotin-Mleczek M.
A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive(®) vaccines.
Hum Vaccin Immunother. 2013 Oct;9(10):2263-76. doi: 10.4161/hv.25181. Epub 2013 Jun 4.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906413/

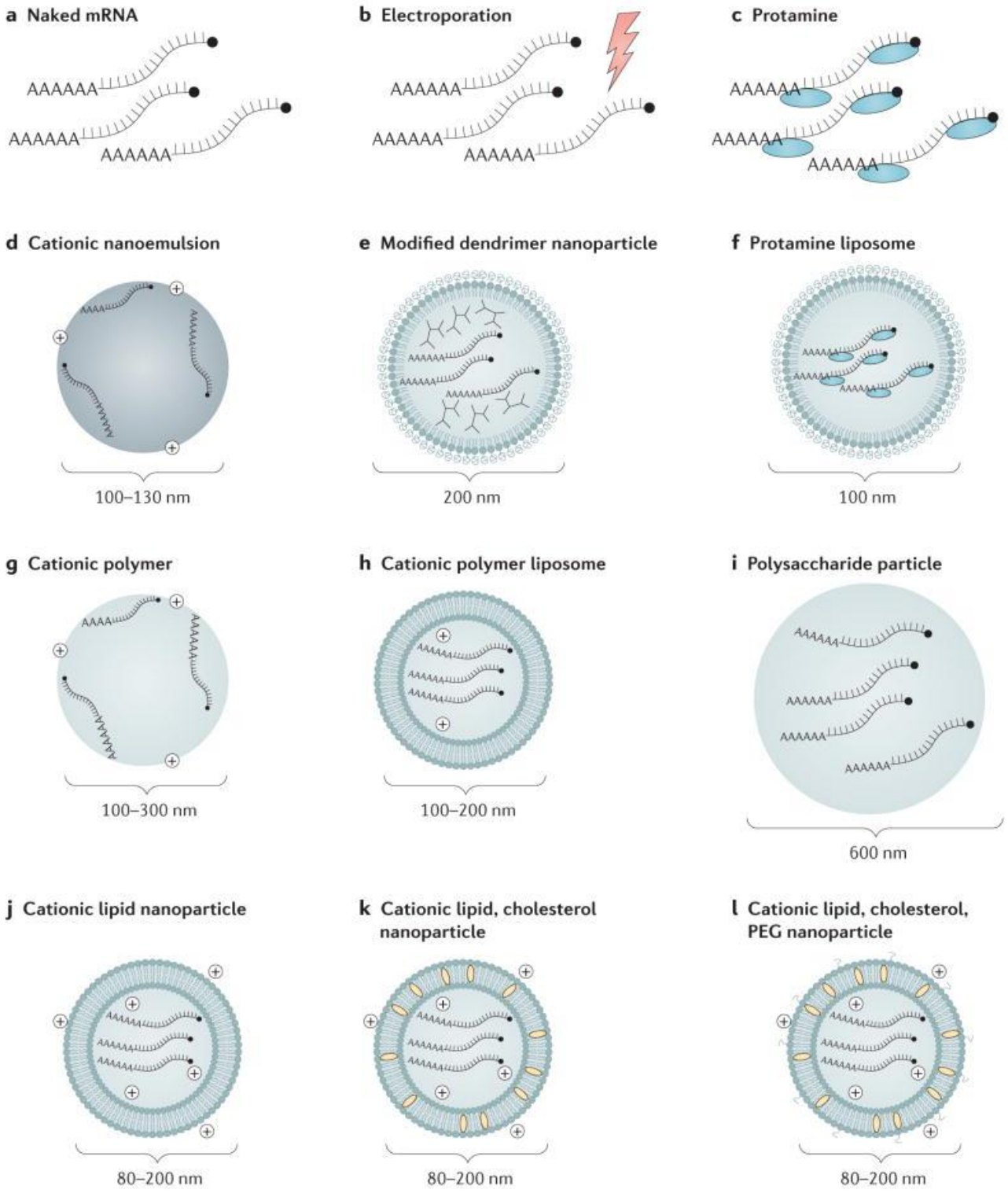
[172] Chahal JS, et al
Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 19;113(29):E4133-42. doi: 10.1073/pnas.1600299113. Epub 2016 Jul 5. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 30;113(35):E5250.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961123/

[173] Démoulins T, Ebensen T, Schulze K, Englezou PC, Pelliccia M, Guzmán CA, Ruggli N, McCullough KC.
Self-replicating RNA vaccine functionality modulated by fine-tuning of polyplex delivery vehicle structure.
J Control Release. 2017 Nov 28;266:256-271. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.018. Epub 2017 Sep 19.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28935594/

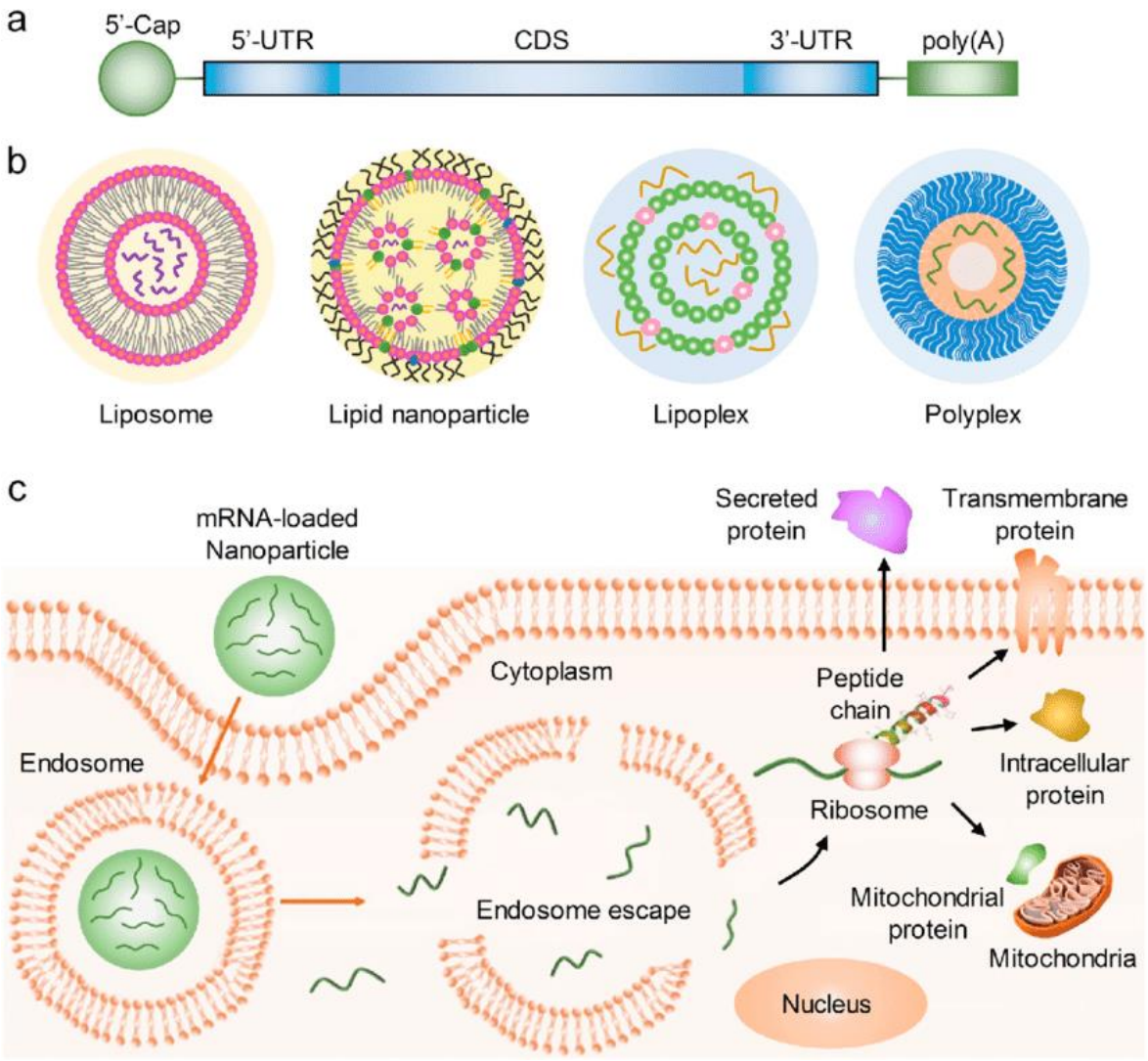
[174] de Groot AM, et al
Immunogenicity Testing of Lipidoids In Vitro and In Silico: Modulating Lipidoid-Mediated TLR4 Activation by Nanoparticle Design.
Mol Ther Nucleic Acids. 2018 Jun 1;11:159-169. doi: 10.1016/j.omtn.2018.02.003. Epub 2018 Feb 13.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5992342/

[175] Coolen AL, Lacroix C, Mercier-Gouy P, Delaune E, Monge C, Exposito JY, Verrier B.
Poly(lactic acid) nanoparticles and cell-penetrating peptide potentiate mRNA-based vaccine expression in dendritic cells triggering their activation.
Biomaterials. 2019 Mar;195:23-37. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.12.019. Epub 2018 Dec 21.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610991/

mRNA associato a un polimero cationico come PEI e un componente lipidico (parte h);
mRNA associato a una particella o gel di polisaccaride (ad esempio chitosano) (parte i);
mRNA in una nanoparticella lipidica cationica (per esempio, lipidi 1,2-dioleoilossi-3-trimetilammoniumpropano (DOTAP) o dioleoilfosfatidiletanolammina (DOPE)) (parte j);
mRNA complessato con lipidi cationici e colesterolo (parte k); e mRNA complessato con lipidi cationici, colesterolo e PEG-lipidi (parte l)



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5906799/



https://www.researchgate.net/figure/mRNA-delivery-and-protein-expression-a-Scheme-of-the-structure-of-in-vitro-transcribed_fig2_339409095
Veicolazione di mRNA ed espressione di proteine. (a) Schema della struttura dell'mRNA trascritto in vitro (IVT). (b) Formulazioni di consegna di mRNA rappresentative. (c) assorbimento cellulare dell'mRNA e processo di espressione delle proteine

Nel caso dei vaccini COVID-19 si utilizzano principalmente nanoparticelle lipidiche (LNP) come veicoli dell'mRNA.
I complessi LNP sono la piattaforma utilizzata più diffusa e presentano i migliori risultati nel rilascio dell'mRNA.

Le LNP sono composte principalmente da lipidi ionizzabili, colesterolo, fosfolipidi e polietilenglicole (PEG) ancorati ai lipidi e oltre al loro ruolo nella protezione dell'mRNA, facilitano l'assorbimento cellulare, migliorano l'uscita dagli endosomi e consentono il rilascio nel citoplasma.
Le LNP possono anche proteggere le molecole di mRNA dal riconoscimento negli endosomi da parte dei TLR, evitando l'eccessiva attivazione del sistema immunitario innato.
Tuttavia, rimangono alcune criticità che devono essere superate nella somministrazione di vaccini a mRNA, [176] quali:

- la tossicità di alcune formulazioni lipidiche;

[176] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG.
Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery.
Mol Ther. 2019 Apr 10;27(4):710-728. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012. Epub 2019 Feb 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/

Granot Y, Peer D.
Delivering the right message: Challenges and opportunities in lipid nanoparticles-mediated modified mRNA therapeutics-An innate immune system standpoint.
Semin Immunol. 2017 Dec;34:68-77. doi: 10.1016/j.smim.2017.08.015. Epub 2017 Sep 7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890238/

- la difficoltà nel raggiungere le cellule immunitarie in organi linfoidi secondari dedicati;
- la necessità di adattare ciascun sistema di rilascio alla via di somministrazione.

Per superare questi inconvenienti, il trasporto e l'uscita dagli endosomi dei veicoli di mRNA-LNP possono essere migliorati [177] utilizzando ad esempio diversi lipidi ionizzabili che favoriscono forti risposte immunitarie cellulari e umorali.
Tali lipidi ionizzabili sono neutri o leggermente carichi a pH fisiologico 7,4 e quindi hanno un buon profilo di sicurezza.
Più recentemente, sono stati progettati nuovi LNP a coda ramificata per superare il limite del rilascio dipendente dalla dimensione dell'mRNA [178].
In particolare, la ionizzazione di questi nanovettori a pH 5,0 (il pH endosomiale tardivo) è correlata all'efficienza della traduzione dell'mRNA trasportato e sembra che tali colloidi potrebbero essere un veicolo per l'mRNA di qualsiasi dimensione.
Ciò sottolinea la rilevanza delle interazioni chimiche tra mRNA e componenti della formulazione per l'espressione dell'mRNA in vivo.

Approfondimento Materiali utilizzati per la veicolazione di mRNA non virale [179]

Tra le tante barriere al funzionamento, l'mRNA deve attraversare la membrana cellulare per raggiungere il citoplasma. La membrana cellulare è una barriera dinamica e formidabile al rilascio intracellulare.
È costituita principalmente da un doppio strato lipidico di fosfolipidi zwitterionici e caricati negativamente, dove le teste polari dei fosfolipidi puntano verso l'ambiente acquoso e le code idrofobe formano un nucleo idrofobico.[180]

Varie pompe ioniche e canali ionici aiutano a mantenere un potenziale negativo (da –40 a –80 mV) attraverso la membrana cellulare e mantengono lo spazio citoplasmatico caricato negativamente controllando l'equilibrio della maggior parte degli ioni metallici essenziali (ad esempio, K^+, Na^+, Ca^{2+} e Mg^{2+}) .[181]
Il potenziale negativo attraverso il la membrana cellulare crea una barriera insormontabile per le molecole di mRNA che sono fortemente cariche negativamente.

I lipidi insaturi, in particolare quelli a doppio legame *cis*, aumentano la fluidità della membrana cellulare, mentre gli altri componenti principali del doppio strato includono gli steroli (∼30% dei lipidi totali), di cui Il colesterolo è il principale sterolo, che aiuta a mantenere un equilibrio tra la fluidizzazione e la condensazione del doppio strato lipidico.

---

[177] Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, Fenton OS, Anderson DG. Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs.
Nano Lett. 2015 Nov 11;15(11):7300-6. doi: 10.1021/acs.nanolett.5b02497. Epub 2015 Oct 20.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26469188/

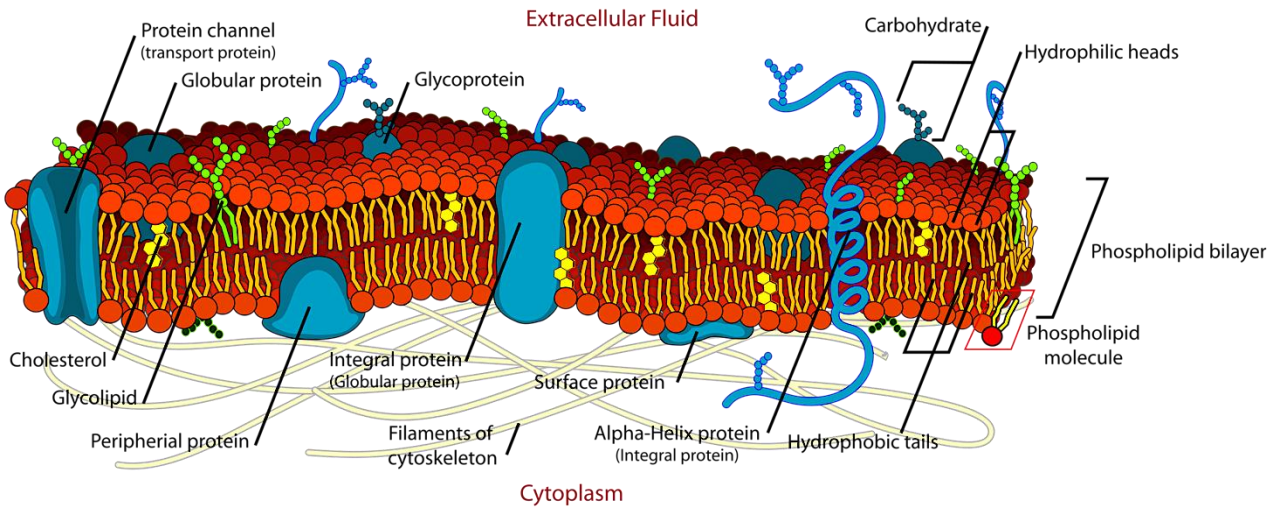
Hassett KJ, et al Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines.
Mol Ther Nucleic Acids. 2019 Apr 15;15:1-11. doi: 10.1016/j.omtn.2019.01.013. Epub 2019 Feb 7.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6383180/

[178] Hajj KA, Ball RL, Deluty SB, Singh SR, Strelkova D, Knapp CM, Whitehead KA.
Branched-Tail Lipid Nanoparticles Potently Deliver mRNA In Vivo due to Enhanced Ionization at Endosomal pH.
Small. 2019 Feb;15(6):e1805097. doi: 10.1002/smll.201805097. Epub 2019 Jan 13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637934/

[179] Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG.
Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery.
Mol Ther. 2019 Apr 10;27(4):710-728. doi: 10.1016/j.ymthe.2019.02.012. Epub 2019 Feb 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/

[180] Harayama T, Riezman H.
Understanding the diversity of membrane lipid composition.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 May;19(5):281-296. doi: 10.1038/nrm.2017.138. Epub 2018 Feb 7. Erratum in: Nat Rev Mol Cell Biol. 2019 Nov;20(11):715.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29410529/

[181] Honig BH, Hubbell WL, Flewelling RF.
Electrostatic interactions in membranes and proteins.
Annu Rev Biophys Biophys Chem. 1986;15:163-93. doi: 10.1146/annurev.bb.15.060186.001115.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2424473/



https://opm.phar.umich.edu/biological_membranes

Oltre alla barriera della membrana cellulare, l'mRNA deve affrontare la degradazione da parte delle ribonucleasi extracellulari presenti in abbondanza nella pelle e nel sangue. [182]
Per proteggere l'mRNA dalla degradazione da parte delle nucleasi e schermare la sua carica negativa, sono comunemente usati i materiali contenenti ammine come vettori non virali. Uno dei metodi più sviluppati per il trasporto di mRNA è, come già visto, la co-formulazione in nanoparticelle lipidiche (LNP) [183].

Le formulazioni di LNP sono tipicamente composte da

(1) un lipide ionizzabile o cationico o materiale polimerico, contenenti ammine terziarie o quaternarie per incapsulare l'mRNA polianionico;
(2) un lipide zwitterionico (ad esempio, 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolammina [DOPE]) che assomiglia ai lipidi nella membrana cellulare;
(3) il colesterolo per stabilizzare il doppio strato lipidico dell'LNP; e
(4) un polietilenglicole (PEG)-lipide per conferire alla nanoparticella uno strato idratante, migliorare la stabilità colloidale e ridurre l'assorbimento delle proteine.[184]

Sebbene il meccanismo di rilascio dell'mRNA da parte delle LNP non sia completamente compreso, è generalmente accettato che queste LNP multicomponenti siano assorbite mediante endocitosi e possano legarsi attraverso legami elettrostatici e fondersi con la membrana cellulare. [185]

---

[182] Houseley J, Tollervey D.
The many pathways of RNA degradation.
Cell. 2009 Feb 20;136(4):763-76. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.019. P
https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(09)00067-1

Tsui NB, Ng EK, Lo YM.
Stability of endogenous and added RNA in blood specimens, serum, and plasma.
Clin Chem. 2002 Oct;48(10):1647-53. PMID: 12324479.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12324479/

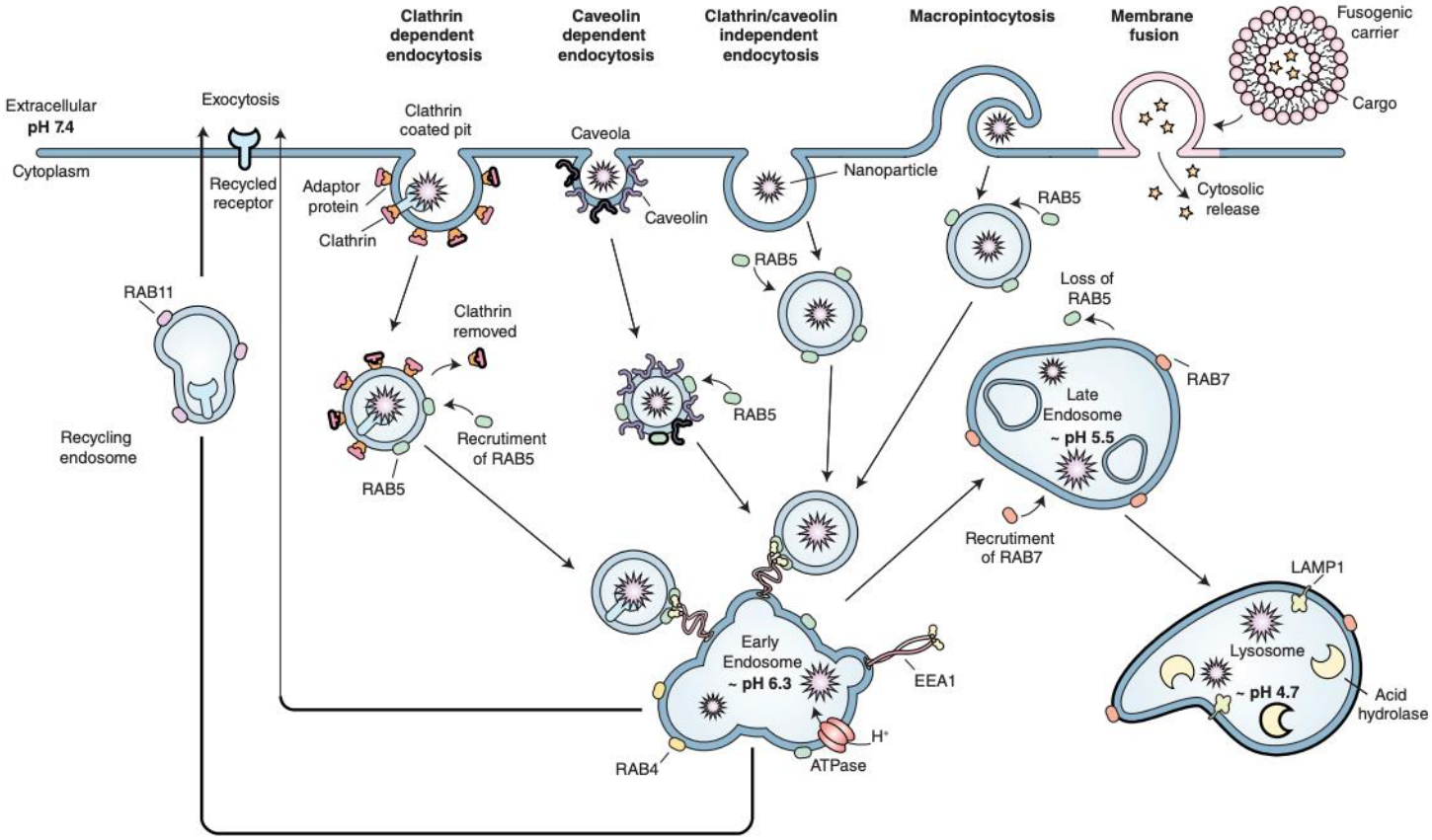
[183] Kauffman KJ, Dorkin JR, Yang JH, Heartlein MW, DeRosa F, Mir FF, Fenton OS, Anderson DG.
Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs.
Nano Lett. 2015 Nov 11;15(11):7300-6. doi: 10.1021/acs.nanolett.5b02497. Epub 2015 Oct 20.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26469188/

[184] Blanco E, Shen H, Ferrari M.
Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery.
Nat Biotechnol. 2015;33(9):941-951. doi:10.1038/nbt.3330
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978509/

Semple SC,
Rational design of cationic lipids for siRNA delivery.
Nat Biotechnol. 2010 Feb;28(2):172-6. doi: 10.1038/nbt.1602. Epub 2010 Jan 17.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20081866/

[185] Yanez Arteta M, Kjellman T, Bartesaghi S, et al.

È importante tenere presente che le LNP possono essere anche esocitate, ostacolando il rilascio cellulare.[186]
L'endocitosi iniziale dipendente dalla clatrina e la macropinocitosi, sono state identificate quali meccanismi comuni per il rilascio delle LNP all'interno delle cellule. [187]
Una volta all'interno della cellula, le LNP vengono dirette negli endosomi precoci, poi negli endosomi tardivi e infine nei lisosomi in cui il contenuto di mRNA viene degradato per via enzimatica. [188]



https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28160452/
Le nanoparticelle possono entrare nelle cellule attraverso molteplici meccanismi. Le particelle vengono assorbite in vescicole rivestite con clatrina, caveolina o utilizzando un meccanismo indipendente da clatrina / cavernaolina. EEA1 si lega a RAB5 sulle vescicole interiorizzate e le attira negli endosomi precoci positivi a

---

Successful reprogramming of cellular protein production through mRNA delivered by functionalized lipid nanoparticles.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2018;115(15):E3351-E3360. doi:10.1073/pnas.1720542115
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5899464/

[186] Sahay G, Querbes W, Alabi C, et al.
Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling.
Nat Biotechnol. 2013;31(7):653-658. doi:10.1038/nbt.2614
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3814166/

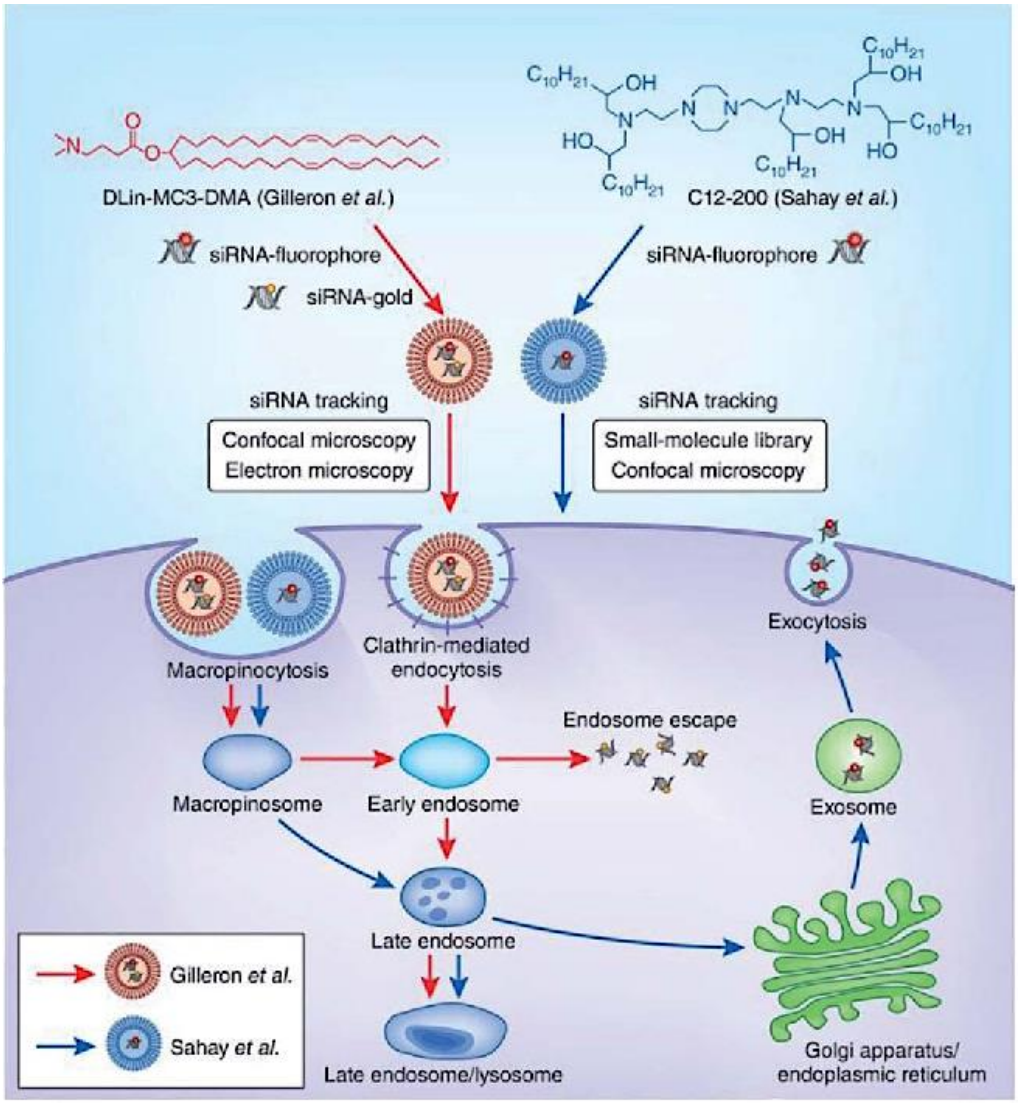
[187] Gilleron J, et al
Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape.
Nat Biotechnol. 2013 Jul;31(7):638-46. doi: 10.1038/nbt.2612. Epub 2013 Jun 23.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23792630/

Ma D.
Enhancing endosomal escape for nanoparticle mediated siRNA delivery.
Nanoscale. 2014 Jun 21;6(12):6415-25. doi: 10.1039/c4nr00018h.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24837409/

Dominska M, Dykxhoorn DM.
Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape.
J Cell Sci. 2010 Apr 15;123(Pt 8):1183-9. doi: 10.1242/jcs.066399.
http://jcs.biologists.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=20356929

[188] ur Rehman Z, Hoekstra D, Zuhorn IS.
Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis.
ACS Nano. 2013 May 28;7(5):3767-77. doi: 10.1021/nn3049494. Epub 2013 Apr 24.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23597090/

RAB5. Il pH scende a ~ 6,3 e il carico viene riciclato in superficie o trasferito a endosomi tardivi positivi a RAB7 (pH ~ 5,5). I contenuti vengono trasferiti al lisosoma (pH ~ 4.7) dove vengono degradati dalle idrolasi acide. Le modalità di ingresso alternative includono la fusione della membrana o la traslocazione diretta attraverso la membrana, aggirando il percorso del traffico.



https://www.semanticscholar.org/paper/Enhancing-endosomal-escape-for-nanoparticle-siRNA-Ma/d92abec09beec91102a82479e6233f533c17077a

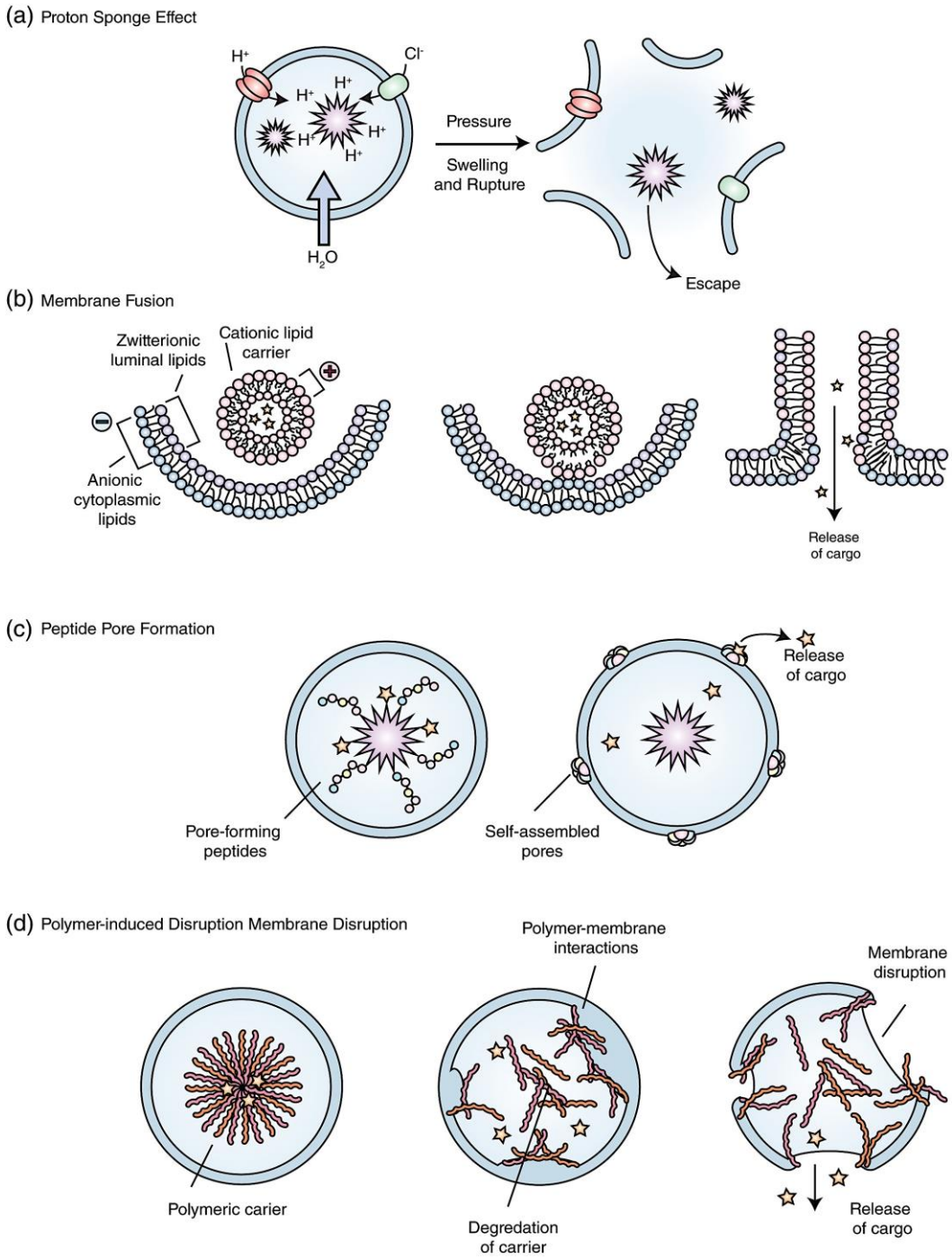
Un'ipotesi denominata “effetto spugna protonica” propone che una piccola percentuale (1% –2%) di LNP sfugga alla degradazione poiché l'acidificazione graduale da pH 6,5 a 5–6 guidata dall'ATP dei compartimenti promuove la protonazione delle ammine residue delle LNP e distrugge la membrana endosomiale che porta alla fuoriuscita dagli endosomi dell'mRNA. [189]
Altri studi però indicano che il meccanismo effettivo potrebbe essere molto più complesso.[190]

[189] Martens, Thomas, K. Remaut, J. Demeester, S. Smedt and K. Braeckmans.
Intracellular delivery of nanomaterials: how to catch endosomal escape in the act.
Nano Today 9 (2014): 344-364. https://doi.org/10.1016/j.nantod.2014.04.011
https://biblio.ugent.be/publication/5760110/file/5760123.pdf

Selby LI, Cortez-Jugo CM, Such GK, Johnston APR.
Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles.
Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2017 Sep;9(5). doi: 10.1002/wnan.1452. Epub 2017 Feb 3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28160452/

[190] Vermeulen LMP, Brans T, Samal SK, Dubruel P, Demeester J, De Smedt SC, Remaut K, Braeckmans K.
Endosomal Size and Membrane Leakiness Influence Proton Sponge-Based Rupture of Endosomal Vesicles.
ACS Nano. 2018 Mar 27;12(3):2332-2345. doi: 10.1021/acsnano.7b07583. Epub 2018 Mar 9.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29505236/

Li B, Zhang X, Dong Y.
Nanoscale platforms for messenger RNA delivery.
Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2019;11(2):e1530. doi:10.1002/wnan.1530
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6443240/



https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28160452/
Meccanismi di fuga endosomiale.
(a) Effetto spugna protonica: i polimeri capaci di tamponare diventano protonati quando i protoni vengono pompati negli endosomi come parte del regolare processo di traffico delle ATPasi. Gli ioni cloruro vengono anche trasportati per mantenere l'equilibrio di carica all'interno dell'endosoma. L'aumento della concentrazione di ioni provoca un rigonfiamento osmotico e la rottura della membrana.[191]
(b) Fusione della membrana: i lipidi anionici sul lato citoplasmatico degli endosomi si riorganizzano per formare una coppia ionica neutra con i lipidi cationici del trasportatore, destabilizzando la membrana.

Alfagih IM, Aldosari B, AlQuadeib B, Almurshedi A, Alfagih MM.
Nanoparticles as Adjuvants and Nanodelivery Systems for mRNA-Based Vaccines.
Pharmaceutics. 2020;13(1):45. Published 2020 Dec 30. doi:10.3390/pharmaceutics13010045
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7823281/

[191] Behr, Jean-Paul
The Proton Sponge: a Trick to Enter Cells the Viruses Did Not Exploit
CHIMIA International Journal for Chemistry, Volume 51, Numbers 1-2, January/February 1997, pp. 34-36(3)
https://www.ingentaconnect.com/content/scs/chimia/1997/00000051/F0020001/art00026?crawler=true&mimetype=application/pdf

Le membrane si fondono e consentono al carico di spostarsi nel citoplasma.[192]
(c) Formazione di pori: alcuni peptidi si autoassemblano nella membrana lipidica per formare pori che consentono la fuoriuscita di terapie a basso peso molecolare.
(d) Rottura della membrana: i polimeri o i peptidi interagiscono direttamente con la membrana endosomiale causando la rottura, consentendo al carico di fuoriuscire.

Lipidi ionizzabili

Una classe ben studiata di agenti di rilascio non virali dell'mRNA include i lipidi cationici o ionizzabili e materiali simili ai lipidi.
I lipidi cationici portano gruppi di ammonio quaternario alchilati e mantengono la loro natura cationica in modo indipendente dal pH, mentre i lipidi ionizzabili acquisiscono cariche positive per protonazione di ammine libere quando il pH viene abbassato.[193]
Recentemente, le agenzie regolatorie hanno approvato il primo farmaco a base di siRNA (Patisiran [Onpattro]), che contiene un lipide ionizzabile denominato Dlin-MC3-DMA (MC3). [194]

Polimeri

I materiali polimerici non sono clinicamente avanzati per il rilascio di acido nucleico come i lipidi ionizzabili, con poche formulazioni utilizzate per il rilascio di siRNA terapeutico. [195]
Relativamente ai lipidi, i materiali polimerici devono affrontare ulteriori sfide legate alla polidispersione e alla clearance o biodegradazione per polimeri di grande peso molecolare .
La polietilenimmina (PEI) a basso peso molecolare modificata con catene grasse è stata utilizzata per il rilascio di siRNA ed mRNA per ridurre la tossicità della PEI ad alto peso molecolare. [196]

Dendrimeri

I dendrimeri sono molecole che contengono una serie di ramificazioni che si estendono da un nucleo centrale e generalmente presentano diverse copie dello stesso gruppo funzionale al termine delle ramificazioni.

---

[192] Zelphati O, Szoka FC Jr.
Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(21):11493-11498. doi:10.1073/pnas.93.21.11493
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC38085/pdf/pnas01525-0218.pdf

[193] Ma Z, Li J, He F, Wilson A, Pitt B, Li S.
Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice.
Biochem Biophys Res Commun. 2005 May 13;330(3):755-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.03.041.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15809061/

[194] https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/onpattro-epar-product-information_it.pdf

[195] Wong SC, et al
HIF2α-Targeted RNAi Therapeutic Inhibits Clear Cell Renal Cell Carcinoma.
Mol Cancer Ther. 2018 Jan;17(1):140-149. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0471. Epub 2017 Oct 27.
https://mct.aacrjournals.org/content/17/1/140.full-text.pdf

Ramot Y, Rotkopf S, Gabai RM, Zorde Khvalevsky E, Muravnik S, Marzoli GA, Domb AJ, Shemi A, Nyska A.
Preclinical Safety Evaluation in Rats of a Polymeric Matrix Containing an siRNA Drug Used as a Local and Prolonged Delivery System for Pancreatic Cancer Therapy.
Toxicol Pathol. 2016 Aug;44(6):856-65. doi: 10.1177/0192623316645860. Epub 2016 May 4.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27147553/

[196] Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S, Yan J.
Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery.
J Control Release. 2006 Aug 10;114(1):100-9. doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.014. Epub 2006 May 13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16831482/

Khan OF, Kowalski PS, Doloff JC, et al.
Endothelial siRNA delivery in nonhuman primates using ionizable low-molecular weight polymeric nanoparticles.
Sci Adv. 2018;4(6):eaar8409. Published 2018 Jun 27. doi:10.1126/sciadv.aar8409
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6021147/

Dahlman JE, Barnes C, Khan O, et al.
In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight.
Nat Nanotechnol. 2014;9(8):648-655. doi:10.1038/nnano.2014.84
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4207430/

Zhao M, Li M, Zhang Z, Gong T, Sun X.
Induction of HIV-1 gag specific immune responses by cationic micelles mediated delivery of gag mRNA.
Drug Deliv. 2016 Sep;23(7):2596-2607. doi: 10.3109/10717544.2015.1038856. Epub 2015 May 29.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26024387/

I dendrimeri a base di poliammidoamina (PAMAM) o polipropilenimmina sono stati ampiamente studiati per il rilascio genico. [197]
Dendrimeri PAMAM sintetizzati con una catena grassa modificata per il rilascio degli siRNA, sono stati successivamente utilizzati per sviluppare una piattaforma vaccinale a mRNA auto-replicante, a dose singola, priva di adiuvanti, e somministrata per via intramuscolare per esprimere antigeni per Ebola, influenza H1N1, *Toxoplasma gondii* e Zika. [198]
Poiché le unità ripetitive dei dendrimeri si ramificano a forma di albero, la loro biodegradazione enzimatica può essere ostacolata a causa di fattori sterici, portando alla tossicità derivante dall'accumulo di questi materiali nei tessuti.

Peptidi che penetrano nelle cellule

I peptidi penetranti nelle cellule (CPP) sono stati studiati per il loro potenziale come vettori per il rilascio intracellulare di acido nucleico. [199]
Sebbene i loro meccanismi di internalizzazione non siano completamente compresi, si ipotizza che i CPP possano promuovere il raggruppamento dei glicosaminoglicani caricati negativamente sulla superficie cellulare, che a sua volta innesca la macropinocitosi e la diffusione laterale o rompe direttamente il doppio strato lipidico. [200]

Biodegradabilità e problemi di targeting con vettori non virali

Le LNP somministrate per via sistemica che trasportano l'mRNA devono affrontare più barriere per la veicolazione.
Il sistema fagocitico mononucleare (MPS), specialmente nel fegato e nella milza, è una destinazione frequente per le nanoparticelle iniettate, a causa del suo ruolo primario nel controllo per gli agenti infettivi di dimensioni nanometriche. [201]

Il rene filtra l'mRNA nudo o qualsiasi nanoparticella con diametro idrodinamico inferiore a 5,5 nm.[202]

---

[197] Abedi-Gaballu F, Dehghan G, Ghaffari M, et al.
PAMAM dendrimers as efficient drug and gene delivery nanosystems for cancer therapy.
Appl Mater Today. 2018;12:177-190. doi:10.1016/j.apmt.2018.05.002
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6269116/

Khan OF, Zaia EW, Yin H, et al.
Ionizable amphiphilic dendrimer-based nanomaterials with alkyl-chain-substituted amines for tunable siRNA delivery to the liver endothelium in vivo.
Angew Chem Int Ed Engl. 2014;53(52):14397-14401. doi:10.1002/anie.201408221
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4785599/

[198] Chahal JS, Khan OF, Cooper CL, et al.
Dendrimer-RNA nanoparticles generate protective immunity against lethal Ebola, H1N1 influenza, and Toxoplasma gondii challenges with a single dose
[published correction appears in Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Aug 30;113(35):E5250]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(29):E4133-E4142. doi:10.1073/pnas.1600299113
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4961123/

Chahal JS, Fang T, Woodham AW, et al.
An RNA nanoparticle vaccine against Zika virus elicits antibody and CD8+ T cell responses in a mouse model.
Sci Rep. 2017;7(1):252. Published 2017 Mar 21. doi:10.1038/s41598-017-00193-w
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5427874/

[199] Guidotti G, Brambilla L, Rossi D.
Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics.
Trends Pharmacol Sci. 2017 Apr;38(4):406-424. doi: 10.1016/j.tips.2017.01.003. Epub 2017 Feb 14
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28209404/

[200] Ziegler A, Seelig J.
Binding and clustering of glycosaminoglycans: a common property of mono- and multivalent cell-penetrating compounds.
Biophys J. 2008;94(6):2142-2149. doi:10.1529/biophysj.107.113472
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2257919/

Verdurmen WP, Brock R.
Biological responses towards cationic peptides and drug carriers.
Trends Pharmacol Sci. 2011 Feb;32(2):116-24. doi: 10.1016/j.tips.2010.11.005. Epub 2010 Dec 15.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21167610/

[201] Wilhelm, S., Tavares, A., Dai, Q. et al.
Analysis of nanoparticle delivery to tumours.
Nat Rev Mater 1, 16014 (2016). https://doi.org/10.1038/natrevmats.2016.14
https://www.nature.com/articles/natrevmats201614

[202] Albanese A, Tang PS, Chan WC.
The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems.
Annu Rev Biomed Eng. 2012;14:1-16. doi: 10.1146/annurev-bioeng-071811-150124. Epub 2012 Apr 18.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22524388/

La maggior parte dellle LNP ha un diametro di circa 100 nm ed è abbastanza grande da impedire la fuoriuscita dall'MPS e il raggiungimento di altri organi di interesse. [203]
Il fegato, che costituisce una parte importante dell'MPS, ha una vascolarizzazione fenestrata e contiene cellule fagocitiche come le cellule di Kupffer, che trattengono le LNP cationiche.
Inoltre, le grandi LNP cationiche non riescono a stravasare dai capillari che si trovano nei polmoni e quindi non possono essere filtrate dal flusso sanguigno nel rene.

Ciò può portare all'accumulo di materiale di rilascio nel fegato, nei polmoni o in altri organi. [204]
Pertanto, la clearance e la biodegradabilità dei componenti del sistema di rilascio è una considerazione rilevante da fare quando si sviluppano materiali di rilascio dell'mRNA.

Gli esteri sono il gruppo funzionale più comunemente usato per migliorare la biodegradabilità dei biomateriali, ma la degradazione *in vivo* di diversi legami estere può dipendere dalla chimica complessiva delle molecole e delle formulazioni. [205]
Ad esempio, sia LP-01 che il lipide 5 sono stati segnalati per eliminare rapidamente dal fegato (emivita [$t_{1/2}$] ~6 h), rispetto a DLin-MC3-DMA ($t_{1/2}$>50 h), con un'espressione proteica comparabile se non maggiore.

In alcuni tessuti, la presenza di gruppi funzionali esteri può accelerare la degradazione delle LNP, limitando potenzialmente anche l'espressione delle proteine.
OF-Deg-Lin per esempio ha indotto selettivamente l'espressione proteica nella milza, anche se era in grado di raggiungere le cellule epatiche, [206] perciò si è ipotizzato che questo potesse essere dovuto alla rapida degradazione delle LNP da parte degli enzimi epatici.

La progettazione razionale di lipidi o polimeri degradabili a base di poliesteri o policarbonati [207] potrebbe offrire un migliore controllo sulla degradazione dei sistemi di somministrazione.

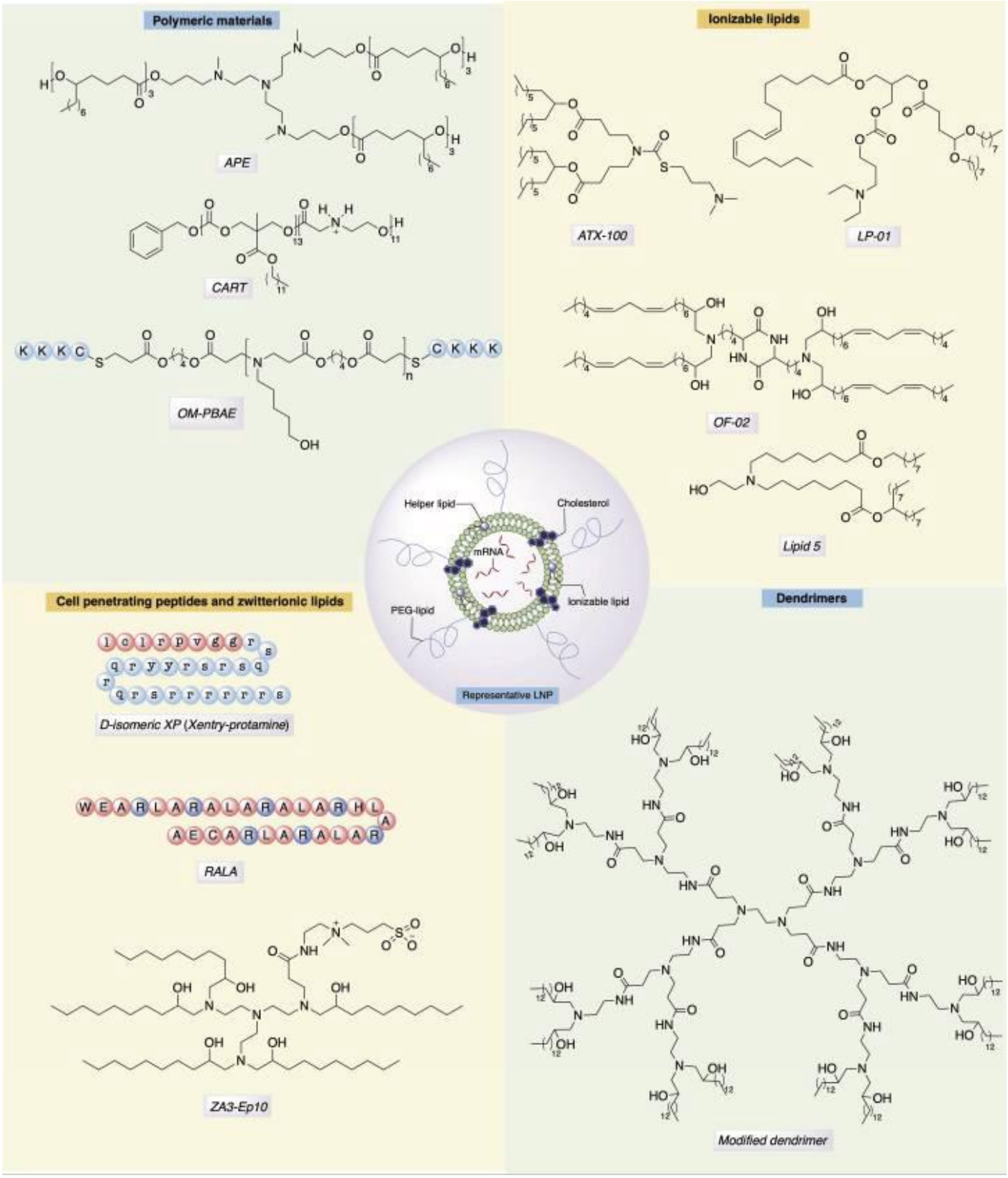
[203] De Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJ, Geertsma RE.
Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration.
Biomaterials. 2008 Apr;29(12):1912-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.037. Epub 2008 Feb 1.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18242692/

[204] Barz, Matthias & Luxenhofer, Robert & Zentel, Rudolf & Vicent, María.
Overcoming the PEG Addiction: well-defined alternatives to PEG, from structure-property relationships to better defined therapeutics.
Polymer Chemistry. (2013). 2. 1900. 10.1039/C0PY00406E.
https://www.researchgate.net/publication/224968821_Overcoming_the_PEG_Addiction_well-defined_alternatives_to_PEG_from_structure-property_relationships_to_better_defined_therapeutics

[205] Hajj KA, Ball RL, Deluty SB, Singh SR, Strelkova D, Knapp CM, Whitehead KA.
Branched-Tail Lipid Nanoparticles Potently Deliver mRNA In Vivo due to Enhanced Ionization at Endosomal pH.
Small. 2019 Feb;15(6):e1805097. doi: 10.1002/smll.201805097. Epub 2019 Jan 13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30637934/

[206] Fenton OS, et al
Synthesis and Biological Evaluation of Ionizable Lipid Materials for the In Vivo Delivery of Messenger RNA to B Lymphocytes.
Adv Mater. 2017 Sep;29(33). doi: 10.1002/adma.201606944. Epub 2017 Jul 6.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28681930/

[207] Junji Watanabe, Hideaki Kotera, and Mitsuru Akashi
Reflexive Interfaces of Poly(trimethylene carbonate)-Based Polymers: Enzymatic Degradation and Selective Adsorption
Macromolecules **2007** *40* (24), 8731-8736 DOI: 10.1021/ma071030q
https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ma071030q



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/
Strutture rappresentative di varie classi di materiali sviluppati per la veicolazione dell'mRNA

IL LIPOSOMA DEL VACCINO PFIZER E MODERNA

Prodotto finito del vaccino "Pfizer"

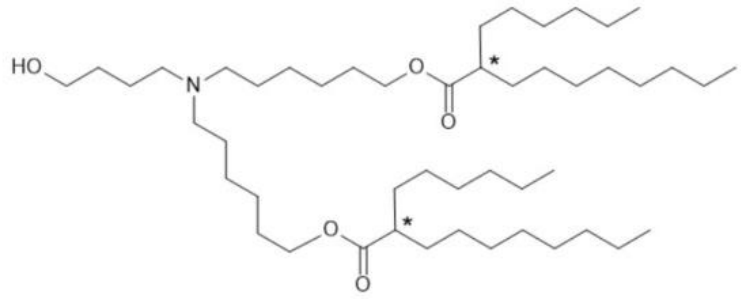
Il prodotto finito BNT162b2 viene fornito come concentrato multidose a 5 dosi senza conservanti da diluire prima dell'iniezione intramuscolare. Il prodotto finito è una dispersione sterile di nanoparticelle lipidiche (LNP) contenenti RNA in un tampone crioprotettore acquoso.

Gli altri ingredienti sono:

- ALC-0315 (4-idrossibutil) azandiil) bis (esano-6,1-diil) bis (2-hexyldecanoate),
- ALC-0159 (2 - [(polietilenglicole) -2000] -N, N-ditetradecilacetammide), 1,2-Distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DSPC),
- colesterolo,
- cloruro di potassio, diidrogeno di potassio, fosfato, sodio cloruro, disodio fosfato diidrato, saccarosio e acqua per preparazioni iniettabili.

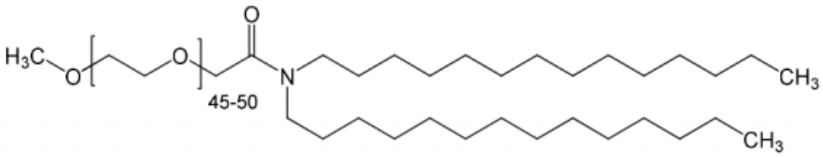
Il liposoma che costituisce il veicolo del vaccino Pfizer contiene due nuovi eccipienti:
il lipide cationico ALC-0315 contenente un'ammina terziaria e due porzioni esterificate, e il lipide PEGilato ALC-0159 contenente un gruppo funzionale acetamidico.

Nuovi eccipienti
ALC-0315



Asterisks (*) indicate chiral centers.

ALC-0159



Entrambi i composti sono ancora in corso di studio per la tossicologia, farmacocinetica e farmacodinamica perché di nuova introduzione.
Va però segnalato che nell'Assessment report del vaccino Pfizer [208] è indicato che è stata utilizzata solo l'intera formulazione (RNA modificato nelle LNP), quindi non ci sono dati tossicologici sul solo LNP o sui suoi nuovi eccipienti specifici.
Il produttore fa notare che ALC-0159 deve essere perso dalla superficie dell'LNP per facilitare un assorbimento efficiente nelle cellule bersaglio. Allo stesso tempo, ALC-0315 è presente nell'LNP con un'elevata % in moli (50% in moli) rispetto agli altri lipidi, suggerendo che è più probabile che questo lipide sia presente all'interno delle cellule (e probabilmente nei vacuoli).
Non sono stati forniti studi di genotossicità né cancerogenicità, in quanto i componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non si prevede abbiano potenziale genotossico.

[208] https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf

Tuttavia, il nuovo eccipiente ALC-0159 contiene una porzione di acetammide potenzialmente genotossica.
La valutazione del rischio eseguita dal produttore indica che il rischio di genotossicità relativo a questo eccipiente è molto basso sulla base dei dati della letteratura riferiti alla genotossicità dell'acetamide in seguito all'uso cronico ad alte dosi per via orale (non iniettiva). Tale valutazione è però contestabile perché le vie di somministrazione iniettiva e orale non sono confrontabili in termini tossicologici.

Il lipide cationico ALC-0315 per la presenza di gruppi funzionali cationici amminici è potenzialmente in grado di scatenare l'attivazione sistemica del complemento (vedi sotto), ma il produttore segnala che, nonostante sia nota tale attivazione, non è stata studiata poiché non sono stati rilevati segni indicativi di tali manifestazioni negli studi clinici.
Va invece fatto notare che molte reazioni avverse riportate nel rapporto di farmacovigilanza [209], come si vedrà in seguito, sono indicative di questo tipo di meccanismo d'induzione del danno.

Prodotto finito del vaccino "Moderna"

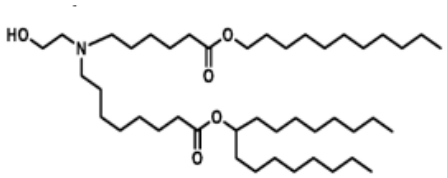
Il prodotto finito si presenta come una dispersione multidose pronta per l'uso da bianca a biancastra per iniezione intramuscolare.
Il principio attivo è incapsulato in nanoparticelle lipidiche (LNP) disperse in un tampone diluente a pH 7,5.
Le LNP sono composte da quattro lipidi che agiscono come protettori e trasportatori dell'mRNA:

- eptadecan-9-il 8 - ((2-idrossietil) (6-osso-6- undecilossi) esil) ammino) ottanoato (SM-102, un lipide ionizzabile customizzato),
- 1,2-dimiristoil-rac-glicero -3-metossipolietilenglicole-2000 (PEG2000-DMG),
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3- fosfocolina (DSPC)
- colesterolo.

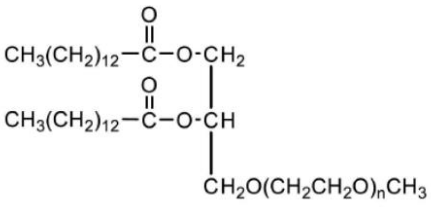
Gli altri eccipienti sono il trometamolo cloridrato, acido acetico, sodio acetato triidrato, saccarosio e acqua per preparazioni iniettabili.

L'SM-102 è un nuovo eccipiente lipidico ionizzabile, carico positivamente per indurre i lipidi a interagire elettrostaticamente con l'mRNA, quando combinato.
Il colesterolo è incorporato per fornire stabilità fisico-chimica e alla struttura delle particelle.
Il lipide zwitterionico "helper", DSPC, è incorporato per aumentare le proprietà fusogeniche delle particelle.
Il nuovo eccipiente del coniugato polietilenglicole-lipide, PEG2000-DMG, conferisce stabilizzazione sterica alle nanoparticelle.
Il saccarosio viene aggiunto per promuovere la stabilità del prodotto al congelamento / scongelamento e per la conservazione a lungo termine.

Nuovi eccipienti
SM-102 eptadecan-9-il 8 - ((2-idrossietil) (6-osso-6- undecilossi) esil) ammino) ottanoato



PEG2000-DMG



[209] https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/962405/COVID-19_mRNA_Pfizer-_BioNTech_Vaccine_Analysis_Print.pdf

Miglioramento dell'attività adiuvante dei vaccini a mRNA

Come affermato in precedenza, i vaccini a mRNA hanno proprietà adiuvanti intrinseche che possono essere benefiche o dannose.
Pertanto, nel campo delle malattie infettive, sono state testate strategie adiuvanti specifiche per promuovere l'attivazione immunitaria senza bloccare l'espressione dell'mRNA.
Una strategia consiste nel co-formulare l'mRNA con nucleosidi modificati con l'MPLA (monofosforil lipide A), un agonista del TLR-4 [210].

Come già discusso, l'uso di nucleosidi modificati altera la risposta IFN di tipo I osservata, mentre l'MLPA consente una migliore induzione dell'attivazione delle cellule T.
Una strategia più recente è stata quella di sviluppare regioni corte a doppio filamento nella coda poli-A [211] o nel 3'UTR [212] dell'mRNA.
L'ibridazione di un breve poli-U RNA nell'mRNA non riduce sostanzialmente l'efficienza traduzionale del trascritto nelle DC.
Rispetto al solo mRNA, il trascritto poli-A / poli-U induce di 10-100 volte l'IFN-β e l'IL-6, e sovraregola le molecole co-stimolatorie coinvolte nell'attivazione e migrazione delle DC (CD40, CD86) e il recettore delle chemochine (CCR7), inoltre la regione dsRNA poli-A / poli-U è riconosciuta da TLR-3 e RIG-I, ma non da MDA-5.

L'uso dell'adiuvante nei vaccini a mRNA sta aumentando, ma dovrebbe essere usato con cautela in quanto potrebbe essere controproducente, soprattutto quando si utilizzano molecole immunostimolanti, a causa della loro stretta interazione con la via dell'immunità innata.

Impatto dell'IFN di tipo I nella vaccinazione con mRNA

L'attivazione dei PRR da parte dell'mRNA dopo la vaccinazione porta generalmente a una forte produzione di IFN di tipo I, il principale agente che modula l'efficienza del vaccino con mRNA.
La comunità scientifica sta ancora discutendo se un aumento del livello di IFN di tipo I sia benefico o dannoso in tale contesto a causa del suo effetto "Janus".
In effetti, può essere positivo per le sue proprietà stimolanti, portando a una risposta immunitaria produttiva, o negativo quando blocca la traduzione dell'mRNA e smorza la risposta immunitaria.

Ad esempio, le DC incubate con IFN di tipo I mostrano una sovraregolazione di molecole co-stimolatorie che promuovono la presentazione dell'antigene [213], mentre *in vivo* e in base alla tempistica del segnale dell'IFN di tipo I, le

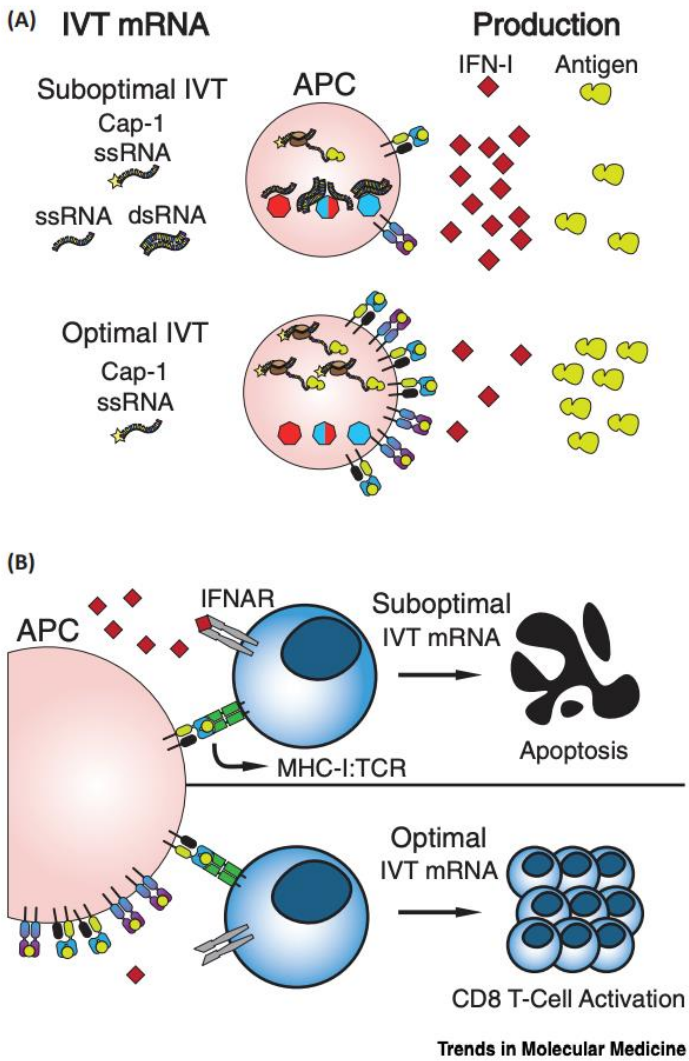
[210] Verbeke R, Lentacker I, Wayteck L, Breckpot K, Van Bockstal M, Descamps B, Vanhove C, De Smedt SC, Dewitte H.
Co-delivery of nucleoside-modified mRNA and TLR agonists for cancer immunotherapy: Restoring the immunogenicity of immunosilent mRNA.
J Control Release. 2017 Nov 28;266:287-300. doi: 10.1016/j.jconrel.2017.09.041. Epub 2017 Oct 5.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28987878/

[211] Uchida S, Yoshinaga N, Yanagihara K, Yuba E, Kataoka K, Itaka K.
Designing immunostimulatory double stranded messenger RNA with maintained translational activity through hybridization with poly A sequences for effective vaccination.
Biomaterials. 2018 Jan;150:162-170. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.033. Epub 2017 Sep 27.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29031816/

[212] Loomis KH, Lindsay KE, Zurla C, Bhosle SM, Vanover DA, Blanchard EL, Kirschman JL, Bellamkonda RV, Santangelo PJ.
In Vitro Transcribed mRNA Vaccines with Programmable Stimulation of Innate Immunity.
Bioconjug Chem. 2018 Sep 19;29(9):3072-3083. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00443. Epub 2018 Aug 13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30067354/

[213] Pantel A, Teixeira A, Haddad E, Wood EG, Steinman RM, Longhi MP.
Direct type I IFN but not MDA5/TLR3 activation of dendritic cells is required for maturation and metabolic shift to glycolysis after poly IC stimulation.
PLoS Biol. 2014 Jan;12(1):e1001759. doi: 10.1371/journal.pbio.1001759. Epub 2014 Jan 7.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3883643/

cellule T CD8 possono essere attivate (aumentando l'attivazione e la proliferazione cellulare) o inibite (portando all'apoptosi).[214]



Interazione dei vaccini a IVT-mRNA e dell'interferone di tipo I (IFN), per quanto riguarda la produzione di antigeni e le risposte delle cellule T.
(A) In presenza di RNA a doppio filamento (dsRNA) o RNA a filamento singolo (ssRNA) (popolazioni IVT-mRNA non ottimali) l'iperattivazione del recettore di riconoscimento del pattern (PRR) porta all'inibizione del meccanismo di traduzione e alla sovrapproduzione e secrezione di IFN-I (quadrato rosso) nell'ambiente extracellulare. Gli IVT-mRNA ottimali e con il capping non attivano i PRR, determinando una bassa produzione di IFN-I e un'elevata espressione di antigene (giallo) e presentazione nelle APC.
(B) Quando vengono utilizzati IVT-mRNA non ottimali (pannello superiore), i linfociti T CD8 naïve (blu) sono innescati per primi dall'IFN-I e ricevono un secondo segnale del recettore delle cellule T (TCR) -MHC-I , portando all'apoptosi delle cellule T [89,90]. Quando vengono utilizzati IVT-mRNA ottimizzati (pannello inferiore), si potrebbe ipotizzare un effetto opposto, le cellule T CD8 naïve vengono innescate prima dal segnale TCR-MHC-I e successivamente dall'IFN-I, portando all'attivazione delle cellule T CD8 e proliferazione.
Abbreviazione: IFNAR, recettore IFN di tipo I.

https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8

Sulla base del suo effetto autoadiuvante, l'mRNA vaccinale può esibire alcune proprietà simili all'mRNA virale, in quanto può essere riconosciuto dalle cellule presentanti l'antigene (APC), che successivamente attivano i recettori di riconoscimento del pattern (PRR) come i recettori Toll-like 3 (TLR3), TLR7 e TLR8. [215]

[214] De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S.
Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines.
Trends Mol Med. 2017 Mar;23(3):216-226. doi: 10.1016/j.molmed.2017.01.006. Epub 2017 Feb 7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185789/

[215] Weissman D.
mRNA transcript therapy.
Expert Rev Vaccines. 2015 Feb;14(2):265-81. doi: 10.1586/14760584.2015.973859. Epub 2014 Oct 31.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25359562/

Kowalski PS, Rudra A, Miao L, Anderson DG.
Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery.
Mol Ther. 2019;27(4):710-728. doi:10.1016/j.ymthe.2019.02.012
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6453548/

Kallen KJ, Heidenreich R, Schnee M, et al.
A novel, disruptive vaccination technology: self-adjuvanted RNActive(®) vaccines.
Hum Vaccin Immunother. 2013;9(10):2263-2276. doi:10.4161/hv.25181
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3906413/

L'RNA a doppio filamento (dsRNA) può combinarsi con alcuni recettori simili al gene I (RIG-I) inducibili dall'acido retinoico (RLR) nel citoplasma, come RIG-I e 5 associato alla differenziazione del melanoma (MDA5), che promuove la maturazione delle APC, la secrezione di citochine pro-infiammatorie e la secrezione di interferone di tipo I (IFN). [216] Questo porta a forti risposte immunitarie umorali e cellulari antigene-specifiche.
L'RNA a filamento singolo (ssRNA) può innescare lo stato di attivazione antivirale delle cellule dendritiche attraverso il riconoscimento dei TLR7 e TLR8 durante la trasmissione *in vivo* dell'mRNA. [217]
I contaminanti di dsRNA possono anche innescare l'attivazione immunitaria tramite il riconoscimento dei TLR3. [218] Tuttavia, un'eccessiva risposta immunitaria stimolata dall'mRNA nel citoplasma può indurre le cellule a secernere grandi quantità di IFN di tipo I e altri interferoni che possono inibire la traduzione dell'mRNA e alla fine portare ad una stagnazione traduzionale, la degradazione dell'RNA, la riduzione dell'attivazione dei linfociti T $CD8^+$ e infine il blocco della risposta immunitaria. [219] Come già visto, ciò potrebbe avere effetti negativi su alcune applicazioni dell'mRNA come i vaccini e le terapie sostitutive delle proteine.

[216] De Beuckelaer A, Grooten J, De Koker S.
Type I Interferons Modulate CD8+ T Cell Immunity to mRNA Vaccines.
Trends Mol Med. 2017 Mar;23(3):216-226. doi: 10.1016/j.molmed.2017.01.006. Epub 2017 Feb 7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28185789/

Bourquin C, Schmidt L, Hornung V, Wurzenberger C, Anz D, Sandholzer N, Schreiber S, Voelkl A, Hartmann G, Endres S.
Immunostimulatory RNA oligonucleotides trigger an antigen-specific cytotoxic T-cell and IgG2a response.
Blood. 2007 Apr 1;109(7):2953-60. doi: 10.1182/blood-2006-07-033258.
https://ashpublications.org/blood/article/109/7/2953/125660/Immunostimulatory-RNA-oligonucleotides-trigger-an

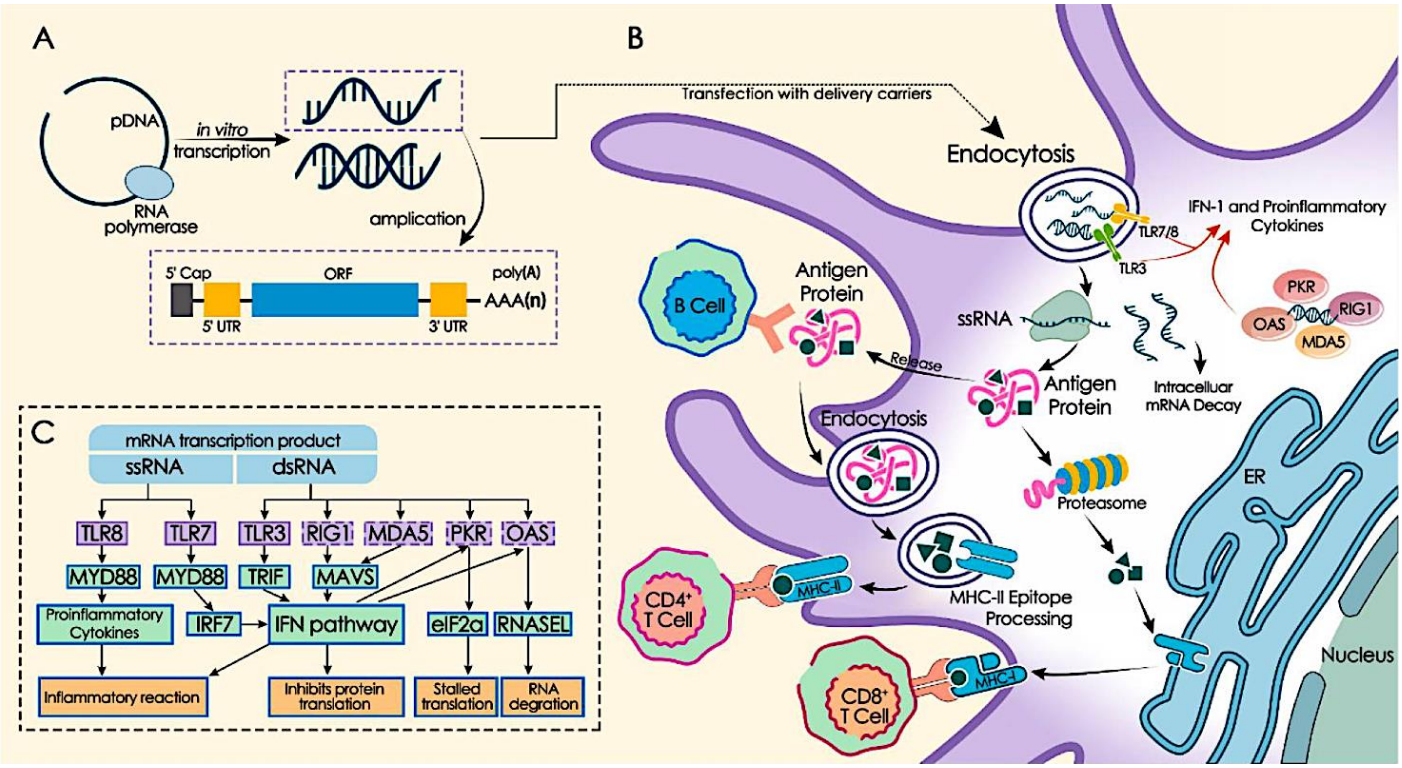
[217] Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S.
Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8.
Science. 2004 Mar 5;303(5663):1526-9. doi: 10.1126/science.1093620. Epub 2004 Feb 19.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14976262/

[218] Verbeke, Rein, I. Lentacker, S. D. Smedt and Heleen Dewitte.
"Three decades of messenger RNA vaccine development."
Nano Today 28 (2019): 100766.
https://biblio.ugent.be/publication/8628303/file/8628317.pdf

Schlake T, Thess A, Fotin-Mleczek M, Kallen KJ.
Developing mRNA-vaccine technologies.
RNA Biol. 2012;9(11):1319-1330. doi:10.4161/rna.22269
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3597572/

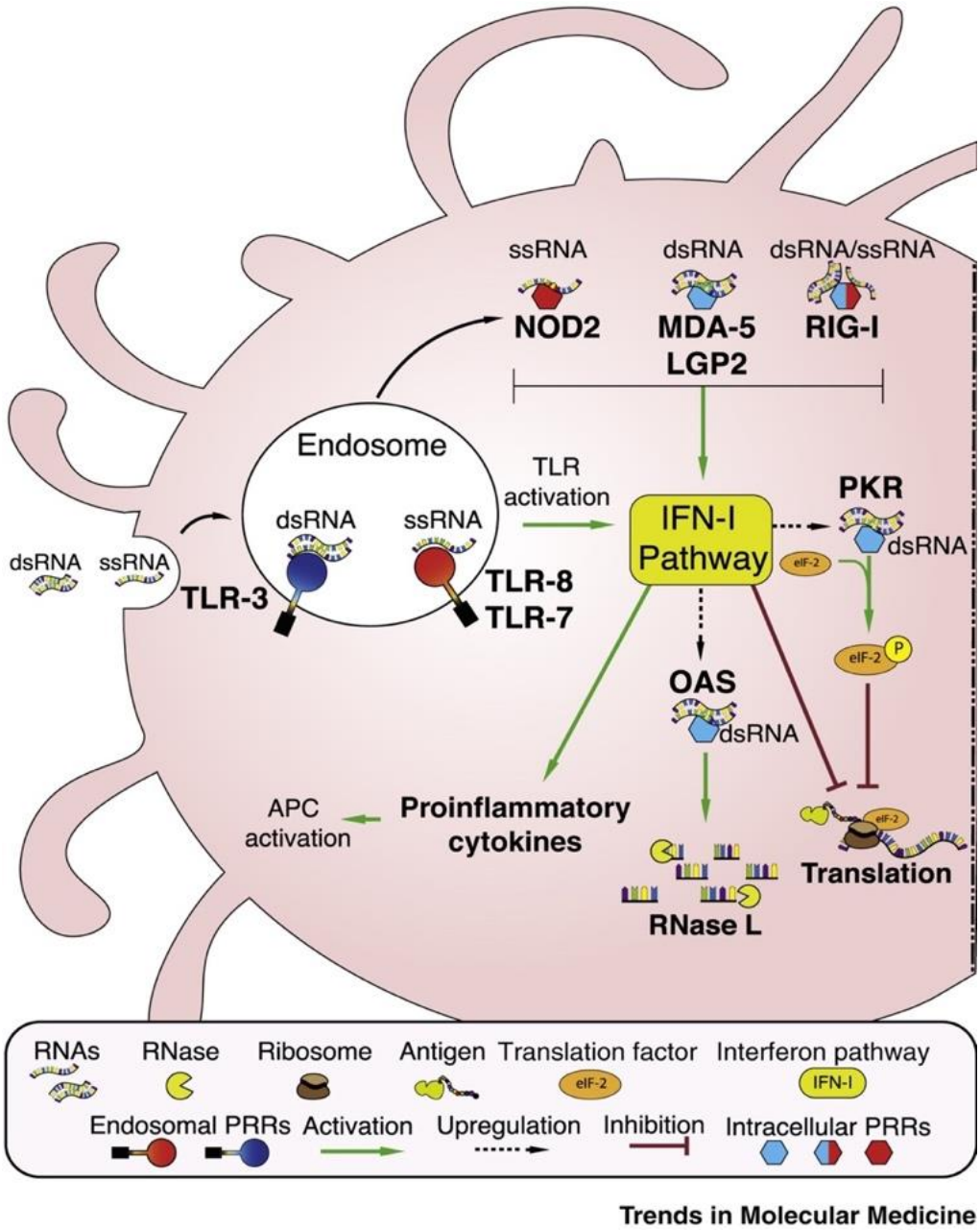
[219] Karikó K, Muramatsu H, Welsh FA, et al.
Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability.
Mol Ther. 2008;16(11):1833-1840. doi:10.1038/mt.2008.200
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2775451/

De Beuckelaer A, Pollard C, Van Lint S, et al.
Type I Interferons Interfere with the Capacity of mRNA Lipoplex Vaccines to Elicit Cytolytic T Cell Responses.
Mol Ther. 2016;24(11):2012-2020. doi:10.1038/mt.2016.161
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5154477/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7554980/

trascrizione in vitro dell'mRNA e attivazione dell'immunità innata. (A) trascrizione di mRNA in vitro. Utilizzando il DNA con la sequenza codificante l'antigene come templato, i prodotti di trascrizione in vitro dell'mRNA contengono RNA a filamento singolo (ssRNA), RNA a doppio filamento (dsRNA), ecc. La struttura ssRNA normalmente include cappuccio a cinque primi (cappuccio 5 '), regione non tradotta a cinque primi (5 ' UTR), regione del frame di lettura aperto (ORF), regione non tradotta a tre primi (3 ' UTR) e struttura della coda in poli (A). (B) traduzione dell'RNA e presentazione dell'antigene. Attraverso l'endocitosi, gli mRNA entrano nel citoplasma. Alcuni mRNA si combinano con i ribosomi della cellula ospite e si traducono con successo. Le proteine antigeniche possono essere degradate in peptidi antigenici dal proteasoma nel citoplasma e presentate ai linfociti T citotossici (CTL) attraverso la via principale del complesso di istocompatibilità (MHC) I. Oppure possono essere rilasciati dalla cellula ospite e ripresi dalle DC. Quindi, vengono degradati e presentati ai linfociti T helper e ai linfociti B tramite il percorso MHC-II. Le cellule B possono anche riconoscere le proteine dell'antigene rilasciato. (C) Effetto autoadiuvante. Vari recettori di riconoscimento del pattern (PRR) possono riconoscere il prodotto di trascrizione in vitro dell'mRNA. ssRNA può essere riconosciuto dai recettori immunitari innati endosomiali (ad es., Toll-like receptor 7 (TLR7), TLR8). dsRNA può essere riconosciuto dai recettori immunitari innati endosomiali (p. es., TLR3) e dai recettori immunitari innati citoplasmatici (p. es., proteina chinasi RNA attivata (PKR), proteina genica I indotta dall'acido retinoico [21] cible (RIG-I), differenziazione del melanoma -proteina associata 5 (MDA5) e 2′-5′-oligoadenilato sintasi (OAS). Sulla base di questi, i prodotti dell'mRNA possono stimolare la secrezione di citochine proinfiammatorie e interferone di tipo I (IFN), che porta alla presentazione dell'antigene attivazione delle cellule (APC) e reazione infiammatoria, ma possono anche attivare enzimi antivirali che causano lo stallo della traduzione dell'mRNA e la degradazione dell'mRNA.



https://www.cell.com/trends/molecular-medicine/fulltext/S1471-4914(19)30244-8

RNA Sensing and Innate Immunity Activation.

Dopo l'assorbimento cellulare, l'RNA può essere riconosciuto da diversi set di recettori di riconoscimento del pattern (PRR); endosomico (struttura simile a una lampadina) o citosolico (esagoni) specifico per RNA a filamento singolo (ssRNA, rosso) ed RNA a doppio filamento (dsRNA, blu). Al rilevamento dell'RNA, i PRR possono portare all'attivazione della via dell'interferone di tipo I (IFN-I) caratterizzata dalla sovraregolazione di centinaia di geni, inclusi quelli che codificano le citochine proinfiammatorie, la proteina chinasi RNA-dipendente (PKR) e i recettori oligoadenilato sintetasi (OAS), ma anche l'inibizione della traduzione e la degradazione dell'mRNA. La produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie porta all'attivazione delle cellule presentanti l'antigene (APC). Abbreviazioni: MDA-5, 5 associato alla differenziazione del melanoma; NOD2, dominio di oligomerizzazione nucleotidica 2; RIG-I, gene I inducibile dall'acido retinoico; TLR, recettore Toll-like.

TOSSICOLOGIA DEI VACCINI A mRNA

Nella seguente sezione saranno approfonditi i meccanismi d'induzione del danno dei due componenti del vaccino a mRNA: i liposomi e l'mRNA.

Valutazione del rischio

Le immunoterapie con mRNA contro il cancro hanno assunto un ruolo primario nell'uso delle terapie a base di mRNA, e questo ha permesso di avanzare più rapidamente nel campo dei vaccini profilattici.

Tuttavia, i ricercatori dovrebbero essere cauti quando i dati vengono estrapolati dal cancro ai vaccini profilattici per le malattie infettive.
La valutazione della sicurezza del vaccino (rischio-beneficio) nei vaccini contro il cancro è più permissiva che nei vaccini profilattici, inoltre una forte risposta IFN-I può aiutare la clearance del cancro e la via di somministrazione può essere molto diversa (endovenosa, intranodale o intratumorale nei vaccini contro il cancro vs intramuscolare, intradermico o sottocutaneo nei vaccini profilattici).

A causa del ruolo dell'immunità innata nella qualità delle risposte immunitarie del vaccino, ciascuna piattaforma di somministrazione e il design dell'mRNA devono corrispondere perfettamente al patogeno mirato per garantire l'efficacia.
Un vaccino che richiede una forte risposta delle cellule T (patogeni intracellulari) non porterà alla stessa risposta immunitaria con gli anticorpi neutralizzanti di lunga durata (patogeni extracellulari).

Anche se la piattaforma del vaccino a mRNA ha fornito dati di sicurezza considerati adeguati dalle agenzie regolatorie, possono comunque verificarsi effetti avversi: la diffusione delle molecole di mRNA nello spazio extracellulare, la generazione di anticorpi anti-mRNA o l'induzione di malattie autoimmuni croniche potrebbero mettere a repentaglio il campo dei vaccini a mRNA se questi rischi non vengono affrontati con attenzione.

Alcune strategie per minimizzare il rischio di generare anticorpi anti-mRNA potrebbero essere la diminuzione delle quantità di mRNA, la limitazione della presenza di mRNA nello spazio extracellulare o l'uso di un minor numero di nucleosidi modificati immunogenici.
Prima di entrare negli studi clinici, i dati in vitro e in vivo devono essere sottoposti a screening per la reattogenicità e la tollerogenicità, per garantire che le risposte immunitarie innate e il design del vaccino siano stati adeguatamente affrontati.

Poiché queste risposte sono altamente sensibili, è importante valutare caso per caso ciascun sistema di somministrazione, formulazione o via di somministrazione nei modelli animali pertinenti per prevenire potenziali effetti negativi.
Diversi studi clinici sui vaccini a mRNA hanno mostrato effetti avversi tra cui miopatia, acidosi lattica, pancreatite, lipodistrofia, steatosi epatica e danni al tessuto nervoso. Pertanto, oltre all'mRNA di per sé, alcuni elementi del veicolo devono essere sottoposti a screening per la tossicità, ad esempio le LNP hanno mostrato tossicità epatica in uno studio clinico che utilizza l'mRNA terapeutico per la sindrome di Crigler-Najjar.
L'induzione dell'immunità innata da parte delle sequenze di mRNA è la barriera principale per la progettazione di vaccini a mRNA efficienti e sicuri. [220]

Sicurezza dei vaccini a mRNA contro le malattie infettive

Poiché il processo di produzione dell'mRNA non richiede sostanze chimiche tossiche o colture cellulari che potrebbero essere contaminate da virus avventizi, la produzione di mRNA evita i rischi comuni associati ad altre piattaforme vaccinali, inclusi virus vivi, vettori virali, virus inattivati e vaccini proteici subunità.
Inoltre, il breve tempo di produzione dell'mRNA presenta poche opportunità di introdurre microrganismi contaminanti.
Nelle persone vaccinate, i rischi teorici di infezione o integrazione del vettore nel DNA della cellula ospite non sono ritenuti un problema per l'mRNA, e quindi i vaccini a mRNA sono stati considerati un formato di vaccino relativamente sicuro.

Tuttavia, recenti studi sull'uomo hanno dimostrato reazioni sistemiche o al sito di iniezione moderate e in alcuni casi gravi per diverse piattaforme di mRNA. [221]

[220] https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31699497/

[221] Bahl K, Senn JJ, Yuzhakov O, et al.
Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses.
Mol Ther. 2017;25(6):1316-1327. doi:10.1016/j.ymthe.2017.03.035
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5475249/

I potenziali problemi di sicurezza che potrebbero essere valutati in futuri studi preclinici e clinici includono l'infiammazione locale e sistemica, la biodistribuzione e la persistenza dell'immunogeno espresso, la stimolazione di anticorpi autoreattivi e potenziali effetti tossici di eventuali nucleotidi non nativi e dei componenti del sistema di rilascio.

Una possibile preoccupazione potrebbe essere che alcune piattaforme vaccinali basate su mRNA inducano potenti risposte all'interferone di tipo I, associate non solo all'infiammazione ma anche all'autoimmunità [222].
Stimolando la maturazione delle cellule dendritiche e suscitando risposte robuste delle cellule T e B, i vaccini a mRNA possono attivare i linfociti autoreattivi e riattivare malattie autoimmuni.
Pertanto, l'identificazione di individui a maggior rischio di reazioni autoimmuni prima della vaccinazione con mRNA dovrebbe prevedere l'adozione di opportune precauzioni. [223]

Alberer M, et al
Safety and immunogenicity of a mRNA rabies vaccine in healthy adults: an open-label, non-randomised, prospective, first-in-human phase 1 clinical trial.
Lancet. 2017 Sep 23;390(10101):1511-1520. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31665-3. Epub 2017 Jul 25.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28754494/

[222] Edwards DK, Jasny E, Yoon H, et al.
Adjuvant effects of a sequence-engineered mRNA vaccine: translational profiling demonstrates similar human and murine innate response.
J Transl Med. 2017;15(1):1. Published 2017 Jan 3. doi:10.1186/s12967-016-1111-6
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5210268/

Pepini T, Pulichino AM, Carsillo T, et al.
Induction of an IFN-Mediated Antiviral Response by a Self-Amplifying RNA Vaccine: Implications for Vaccine Design.
J Immunol. 2017;198(10):4012-4024. doi:10.4049/jimmunol.1601877
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5421303/

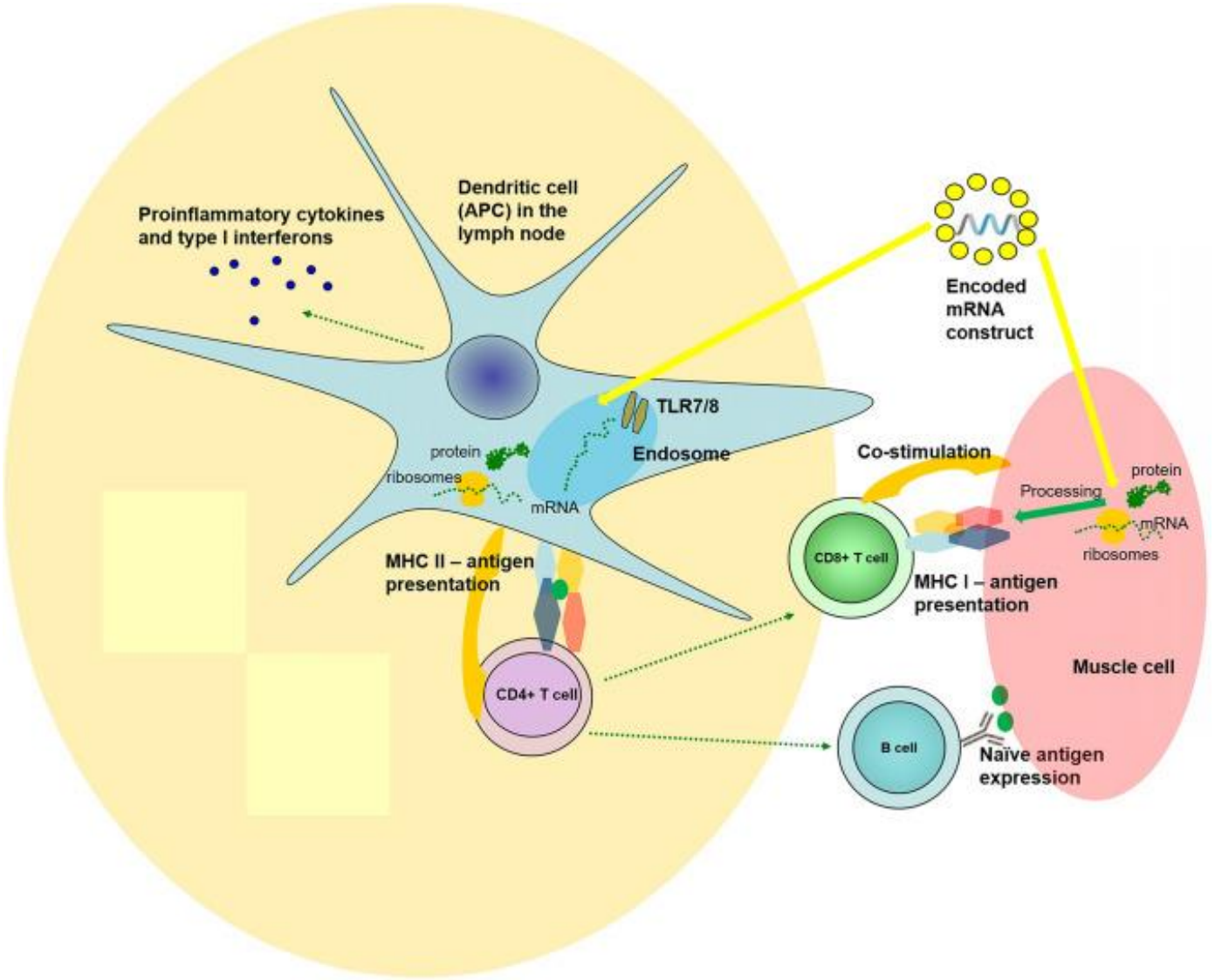
Rönnblom L.
The importance of the type I interferon system in autoimmunity.
Clin Exp Rheumatol. 2016 Jul-Aug;34(4 Suppl 98):21-4. Epub 2016 Jul 21.
https://www.clinexprheumatol.org/abstract.asp?a=10861

Rönnblom L.
The type I interferon system in the etiopathogenesis of autoimmune diseases.
Ups J Med Sci. 2011 Nov;116(4):227-37. doi: 10.3109/03009734.2011.624649.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3207297/

[223] Talotta R.
Do COVID-19 RNA-based vaccines put at risk of immune-mediated diseases? In reply to "potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases".
Clin Immunol. 2021;224:108665. doi:10.1016/j.clim.2021.108665
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7833091/

Vojdani A, Kharrazian D.
Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases.
Clin Immunol. 2020;217:108480. doi:10.1016/j.clim.2020.108480
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7246018/

Velikova T, Georgiev T.
SARS-CoV-2 vaccines and autoimmune diseases amidst the COVID-19 crisis.
Rheumatol Int. 2021;41(3):509-518. doi:10.1007/s00296-021-04792-9
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7846902/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7846902/
I processi immunitari coinvolti nel meccanismo dei vaccini a mRNA: attivazione delle cellule T helper (CD4 $^{+}$) tramite molecole MHC I e antigene virale processato nelle cellule che presentano l'antigene nel linfonodo; stimolazione delle cellule T citotossiche (CD8 $^{+}$) tramite molecole MHC di classe II e antigene virale processato e cellule B da antigeni virali nativi. Nelle cellule presentanti l'antigene, l'mRNA rileva TLR7 e 8, portando all'attivazione della cascata verso il basso e alla produzione e secrezione di citochine proinfiammatorie e interferoni di tipo I. Alcuni dei meccanismi sono semplificati nella figura per omissione (cioè, l'inflammasoma, il proteasoma, i messaggeri secondari, ecc.)

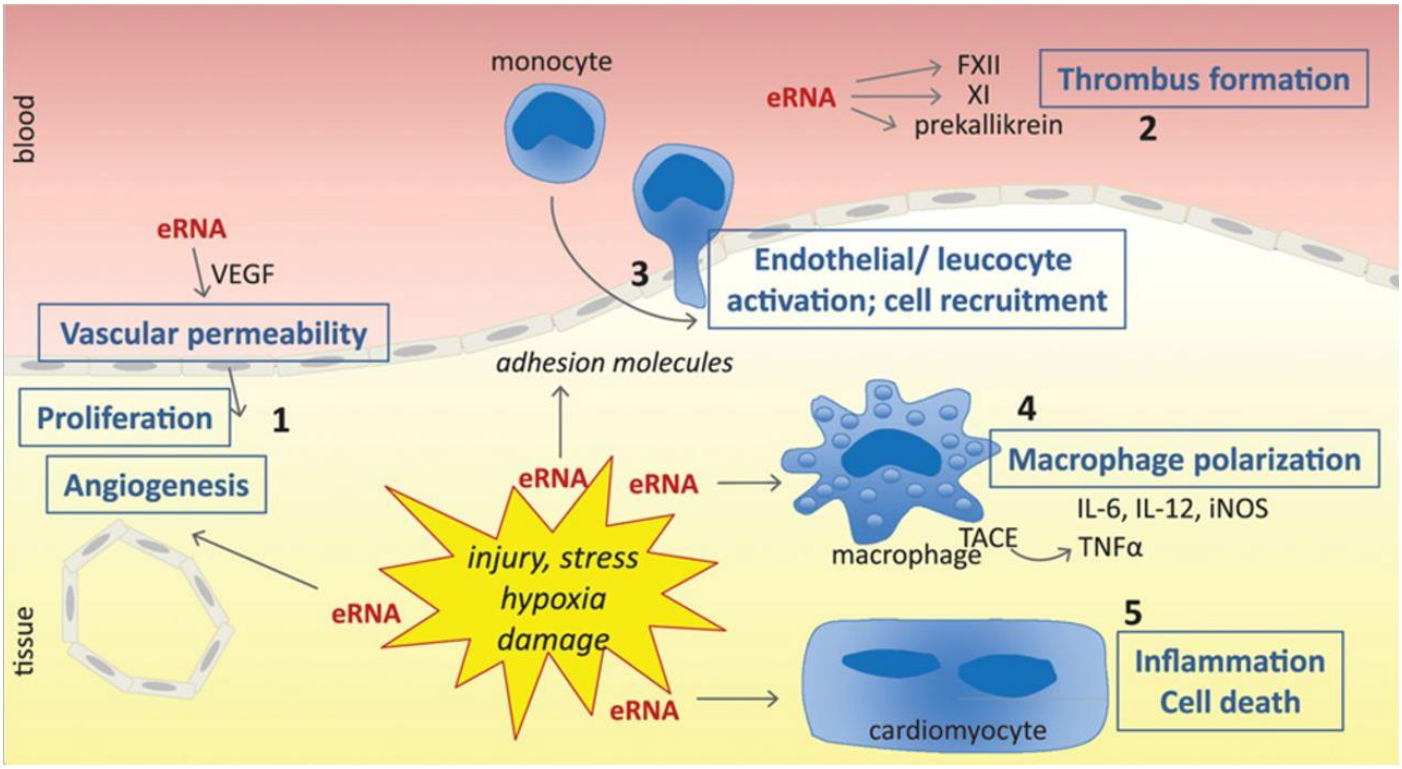
Un altro potenziale problema di sicurezza, come già accennato, potrebbe derivare dalla presenza di mRNA extracellulare durante la vaccinazione. È stato dimostrato che l'RNA extracellulare nudo aumenta la permeabilità delle cellule endoteliali strettamente compattate e può quindi contribuire all'edema.[224]

Altri studi hanno dimostrato che l'RNA extracellulare, agendo come un DAMPS, promuove anche la formazione patologica di trombi, e la morte dei cardiomiociti [225].

[224] Fischer S, Gerriets T, Wessels C, Walberer M, Kostin S, Stolz E, Zheleva K, Hocke A, Hippenstiel S, Preissner KT.
Extracellular RNA mediates endothelial-cell permeability via vascular endothelial growth factor.
Blood. 2007 Oct 1;110(7):2457-65. doi: 10.1182/blood-2006-08-040691. Epub 2007 Jun 18.
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120604967?via%3Dihub

[225] Kannemeier C, Shibamiya A, Nakazawa F, et al.
Extracellular RNA constitutes a natural procoagulant cofactor in blood coagulation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(15):6388-6393.
doi:10.1073/pnas.0608647104
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1851071/

Preissner KT, Fischer S, Deindl E.
Extracellular RNA as a Versatile DAMP and Alarm Signal That Influences Leukocyte Recruitment in Inflammation and Infection.
Front Cell Dev Biol. 2020;8:619221. Published 2020 Dec 18. doi:10.3389/fcell.2020.619221
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7775424/



https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.307961
Contributo degli RNA extracellulari (eRNA) all'omeostasi vascolare e alle patologie cardiovascolari. Dopo stress cellulare (come ipossia, lesioni ed esposizione a patogeni), si trova che l'eRNA viene espresso in vari siti extracellulari, sia intravascolare che extravascolare. Inoltre, l'eRNA può essere derivato da cellule danneggiate o apoptotiche o viene rilasciato all'attivazione delle cellule infiammatorie e si accumula all'interno delle placche aterosclerotiche nel corso dello sviluppo della malattia. Le seguenti attività funzionali dell'eRNA sono promosse dalle interazioni dirette con specifiche proteine extracellulari: (1) promozione dell'iperpermeabilità vascolare da parte dell'eRNA come corecettore / cofattore del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e dall'induzione della vasculogenesi / angiogenesi. (2) Inizio della coagulazione del sangue intrinseca (tramite le proteine della fase di contatto) e formazione di trombi. (3) Induzione del reclutamento di leucociti alla parete del vaso infiammato mediante elevazione mediata da eRNA dell'espressione della molecola di adesione intercellulare 1 nelle cellule endoteliali o molecola di adesione delle cellule vascolari 1 e P-selectina nelle cellule muscolari lisce vascolari. (4) orientamento dei monociti / macrofagi verso il fenotipo proinfiammatorio M1, accompagnata da un'espressione sovraregolata del fattore di necrosi tumorale-α (TNF-α), interleuchina-6 (IL-6), IL-12, ossido nitrico sintasi inducibile (iNOS) e fattori di risposta, come le chemochine. Qui, l'eRNA innesca l'enzima di conversione del TNF-α (TACE) per liberare il TNF-α funzionalmente attivo. (5) Promozione della morte dei cardiomiociti inducendo una cascata iperinfiammatoria che coinvolge il TNF-α nel contesto del danno da ischemia-riperfusione.

La sicurezza richiederà quindi una valutazione continua poiché diverse modalità di mRNA e sistemi di somministrazione vengono utilizzati per la prima volta negli esseri umani e vengono testati su popolazioni di pazienti più ampie.

Deindl E, Fischer S, Preissner KT.
New directions in inflammation and immunity: the multi-functional role of the extracellular RNA/RNase system.
Indian J Biochem Biophys. 2009 Dec;46(6):461-6.
https://www.researchgate.net/publication/42973591_New_Directions_in_Inflammation_and_Immunity_The_Multi-functional_Role_of_the_Extracellular_RNARNase_System

Zernecke A, Preissner KT.
Extracellular Ribonucleic Acids (RNA) Enter the Stage in Cardiovascular Disease.
Circ Res. 2016 Feb 5;118(3):469-79. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307961.
https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCRESAHA.115.307961

Foley JH, Conway EM.
Cross Talk Pathways Between Coagulation and Inflammation.
Circ Res. 2016 Apr 29;118(9):1392-408. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306853.
https://www.ahajournals.org/doi/full/10.1161/CIRCRESAHA.116.306853

Approfondimento I meccanismi dell'anafilassi [226]

Nel 2003, per armonizzare la nomenclatura delle allergie a livello mondiale, l'Organizzazione mondiale delle allergie (WAO) ha proposto due classificazioni di anafilassi sulla base del meccanismo fisiopatologico coinvolto nella reazione.

Il termine **anafilassi allergica** denota reazioni mediate da un meccanismo immunologico, correlato con le IgE, le immunoglobuline o il complesso immunitario del complemento (corrispondenti alle classiche reazioni di ipersensibilità [HSR] descritte da Gell e Coombs).

Il termine **anafilassi non allergica** denota reazioni mediate da altri meccanismi (p. es. attivazione diretta da parte della bradichinina o del complemento), che sono solitamente innescate da agenti o eventi che inducono l'attivazione improvvisa dei mastociti o dei basofili.[227]

I *fenotipi* sono definiti dalla presentazione clinica e gli *endotipi* si riferiscono ai meccanismi cellulari e molecolari delle HSR definiti dai biomarcatori diagnostici (test cutaneo, triptasi, IgE, interleuchina-6 e altri).

I fenotipi dell'anafilassi sono classificati, in base alla loro presentazione clinica, in reazioni di tipo I, reazioni da rilascio di citochine (CRR), reazioni miste e, infine, reazioni simili a bradichinina e complemento. Gli endotipi corrispondenti alla base di questi fenotipi includono meccanismi IgE e non IgE-mediati, meccanismi mediati da citochine, processi misti e attivazione diretta delle cellule immunitarie da parte del complemento o della bradichinina.[228]

---

[226] Jimenez-Rodriguez TW, Garcia-Neuer M, Alenazy LA, Castells M.
Anaphylaxis in the 21st century: phenotypes, endotypes, and biomarkers.
J Asthma Allergy. 2018;11:121-142. Published 2018 Jun 20. doi:10.2147/JAA.S159411
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6016596/

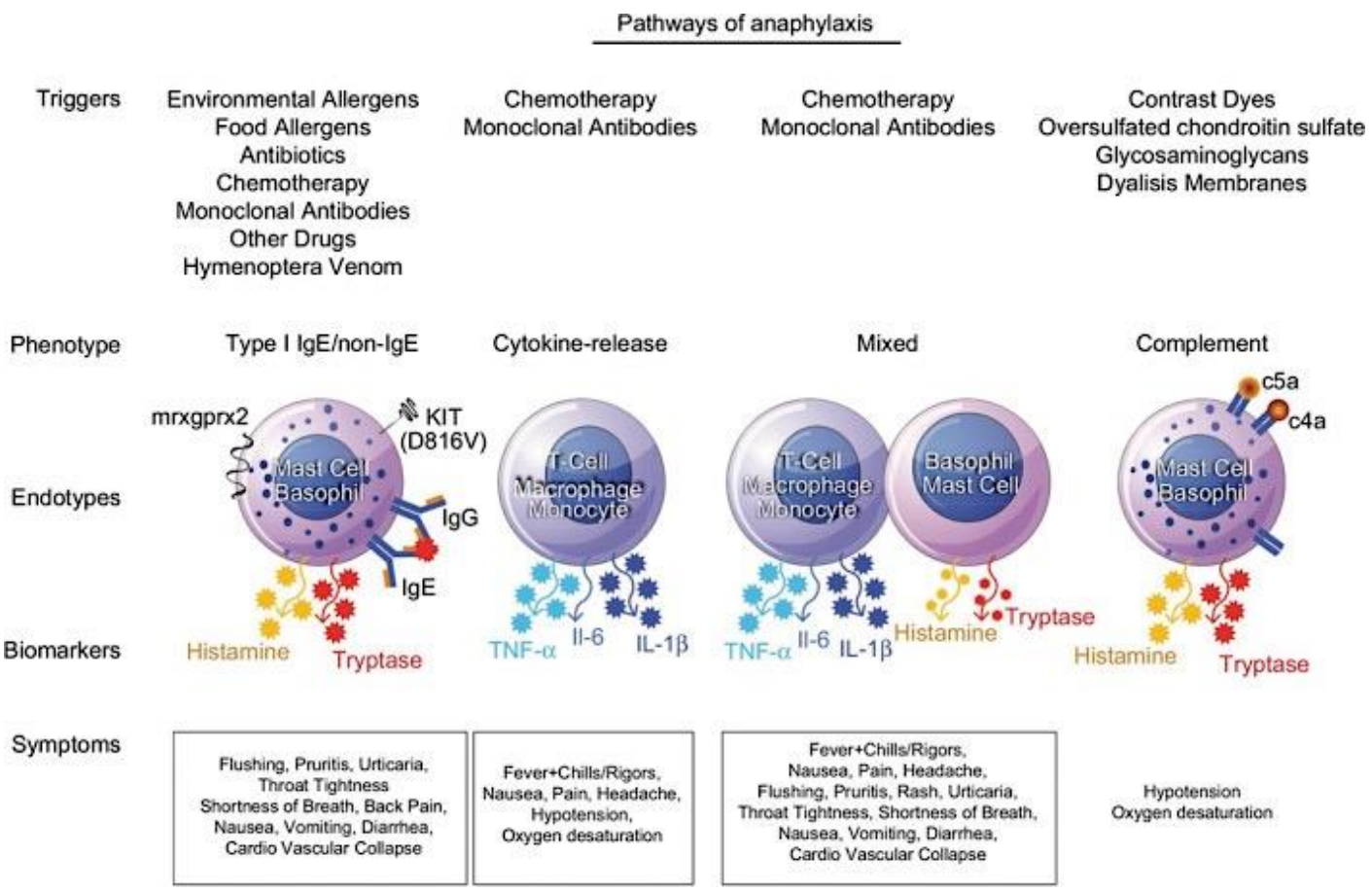
Buonaguro FM, Ascierto PA, Morse GD, et al.
Covid-19: Time for a paradigm change.
Rev Med Virol. 2020;30(5):e2134. doi:10.1002/rmv.2134
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361272/

Justiz Vaillant AA, Vashisht R, Zito PM.
Immediate Hypersensitivity Reactions. 2020 Dec 30.
In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 30020687.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513315/

Sala-Cunill A, Guilarte M, Cardona V.
Phenotypes, endotypes and biomarkers in anaphylaxis: current insights.
Curr Opin Allergy Clin Immunol. 2018 Oct;18(5):370-376. doi: 10.1097/ACI.0000000000000472.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30048251/

[227] Johansson SG, et al
Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003.
J Allergy Clin Immunol. 2004 May;113(5):832-6. doi: 10.1016/j.jaci.2003.12.591.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15131563/

[228] Castells M.
Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine.
J Allergy Clin Immunol. 2017 Aug;140(2):321-333. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.012.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780940/



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7361272/

Reazioni di Tipo I.

L'anafilassi mediata da IgE è il principale meccanismo alla base dell'anafilassi allergica. [229]
Dopo l'esposizione all'allergene, una serie di segnali innesca la produzione di IgE allergene-specifiche da parte delle cellule B (fenomeno di sensibilizzazione).
Nelle esposizioni successive, il complesso IgE antigene-allergene specifico si lega al recettore Fcε-RI su mastociti e / o basofili e, con adeguata segnalazione, attiva e degranula queste cellule, rilasciando così mediatori preformati, enzimi e citochine e facilitando la sintesi di mediatori infiammatori *de novo* (p. es., triptasi, istamina, leucotrieni, prostaglandine, fattore di attivazione delle piastrine [PAF], citochine) .[230]

I mediatori provocano sintomi allergici agendo direttamente sui tessuti. La reazione si propaga reclutando e attivando ulteriori cellule infiammatorie, in particolare gli eosinofili, che rilasciano più mediatori, inclusi i mediatori derivati dai lipidi come la prostaglandina D2 e i leucotrieni cisteinilici. [231]

---

[229] Ring J, Behrendt H, de Weck A.
History and classification of anaphylaxis.
Chem Immunol Allergy. 2010;95:1-11. doi: 10.1159/000315934. Epub 2010 Jun 1.
https://www.karger.com/Article/Abstract/315934

Abbas M, Moussa M, Akel H.
Type I Hypersensitivity Reaction. 2020 Oct 20.
In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560561/

[230] Dombrowicz D, Brini AT, Flamand V, Hicks E, Snouwaert JN, Kinet JP, Koller BH.
Anaphylaxis mediated through a humanized high affinity IgE receptor.
J Immunol. 1996 Aug 15;157(4):1645-51.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8759751/

[231] Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ.
The pathophysiology of anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2017;140(2):335-348. doi:10.1016/j.jaci.2017.06.003
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657389/

Oltre alla via classica mediata dalle IgE, altre possibili vie sono state descritte in modelli animali. [232]
Una di queste vie alternative è simile alla via mediata da IgE, ma coinvolge gli anticorpi IgG.
Le reazioni mediate da IgG sono mediate da complessi IgG che si legano in modo crociato al recettore a bassa affinità dei macrofagi (Fcγ-RIII) stimolando così il rilascio di PAF (piuttosto che di istamina).[233]

Il PAF provoca l'aggregazione piastrinica e il rilascio del potente vasocostrittore trombossano A2 e della serotonina; agisce direttamente sulle cellule endoteliali vascolari per aumentare la permeabilità vascolare; diminuisce la gittata cardiaca, con conseguente ipotensione e disfunzioni cardiache; e aumenta la contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree, dell'intestino e dell'utero. [234]

Sebbene l'anafilassi IgG-dipendente non sia stata dimostrata nell'uomo, è stato ipotizzato che gli anticorpi IgG possano mediare l'anafilassi sistemica se sono presenti un gran numero di IgG e di antigene. [235]
I recettori IgG sono in grado di attivare macrofagi [236] e neutrofili [237] per secernere PAF e attivare i mastociti [238] per indurre l'anafilassi nell'uomo. [239]

---

[232] Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R.
Human IgE-independent systemic anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2016;137(6):1674-1680. doi:10.1016/j.jaci.2016.02.015
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7607869/

[233] Gillis CM, Jönsson F, Mancardi DA, Tu N, Beutier H, Van Rooijen N, Macdonald LE, Murphy AJ, Bruhns P.
Mechanisms of anaphylaxis in human low-affinity IgG receptor locus knock-in mice.
J Allergy Clin Immunol. 2017 Apr;139(4):1253-1265.e14. doi: 10.1016/j.jaci.2016.06.058. Epub 2016 Aug 24.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27568081/

[234] Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G.
Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology.
Physiol Rev. 2000 Oct;80(4):1669-99. doi: 10.1152/physrev.2000.80.4.1669.
https://journals.physiology.org/doi/pdf/10.1152/physrev.2000.80.4.1669

Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P.
Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2015 Jun;135(6):1424-32. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.019.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051949/

[235] Finkelman FD.
Anaphylaxis: lessons from mouse models.
J Allergy Clin Immunol. 2007 Sep;120(3):506-15; quiz 516-7. doi: 10.1016/j.jaci.2007.07.033.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17765751/

[236] Jiao D, Liu Y, Lu X, Liu B, Pan Q, Liu Y, Liu Y, Zhu P, Fu N.
Macrophages are the dominant effector cells responsible for IgG-mediated passive systemic anaphylaxis challenged by natural protein antigen in BALB/c and C57BL/6 mice.
Cell Immunol. 2014 May-Jun;289(1-2):97-105. doi: 10.1016/j.cellimm.2014.03.018. Epub 2014 Apr 6.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24751884/

[237] Jönsson F, Mancardi DA, Kita Y, et al.
Mouse and human neutrophils induce anaphylaxis.
J Clin Invest. 2011;121(4):1484-1496. doi:10.1172/JCI45232
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3069785/

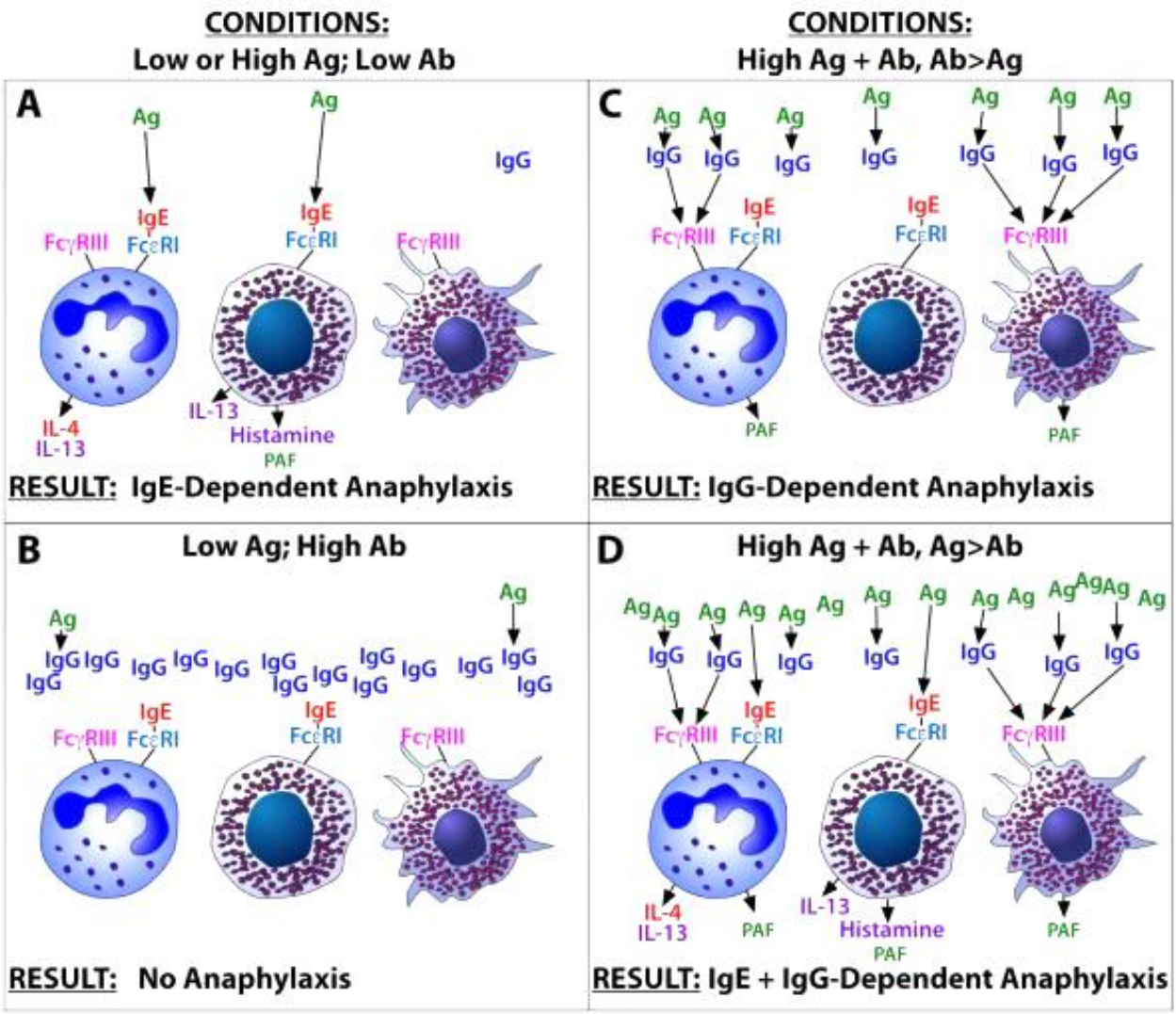
Jönsson F, et al
An IgG-induced neutrophil activation pathway contributes to human drug-induced anaphylaxis.
Sci Transl Med. 2019 Jul 10;11(500):eaat1479. doi: 10.1126/scitranslmed.aat1479.
https://stm.sciencemag.org/content/11/500/eaat1479.full

[238] Burton OT, Epp A, Fanny ME, Miller SJ, Stranks AJ, Teague JE, Clark RA, van de Rijn M, Oettgen HC.
Tissue-Specific Expression of the Low-Affinity IgG Receptor, FcγRIIb, on Human Mast Cells.
Front Immunol. 2018 Jun 6;9:1244. doi: 10.3389/fimmu.2018.01244. PMID: 29928276;
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5997819/

[239] Gill P, Jindal NL, Jagdis A, Vadas P.
Platelets in the immune response: Revisiting platelet-activating factor in anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2015 Jun;135(6):1424-32. doi: 10.1016/j.jaci.2015.04.019.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26051949/

Sala-Cunill A, et al
Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions.

Gli anticorpi monoclonali IgG chimerici (mAbs), come rituximab, hanno dimostrato di indurre anafilassi anche in assenza di IgE, suggerendo l'anafilassi IgG-dipendente. [240]



J Allergy Clin Immunol. 2015 Apr;135(4):1031-1043.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.057. Epub 2014 Sep 18.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25240785/

Kajiwara N, Sasaki T, Bradding P, Cruse G, Sagara H, Ohmori K, Saito H, Ra C, Okayama Y.
Activation of human mast cells through the platelet-activating factor receptor.
J Allergy Clin Immunol. 2010 May;125(5):1137-1145.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2010.01.056. Epub 2010 Apr 14
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20392487/

Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, Romagnani S, Maggi E.
Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions.
Allergy. 2010 May;65(5):657-61. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02280.x. Epub 2009 Nov 27. PMID: 19951375.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951375/

Castells MC.
Anaphylaxis to chemotherapy and monoclonal antibodies.
Immunol Allergy Clin North Am. 2015 May;35(2):335-48. doi: 10.1016/j.iac.2015.01.011.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25841555/

[240] Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, Romagnani S, Maggi E.
Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions.
Allergy. 2010 May;65(5):657-61. doi: 10.1111/j.1398-9995.2009.02280.x. Epub 2009 Nov 27.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19951375/

Castells MC.
Anaphylaxis to chemotherapy and monoclonal antibodies.
Immunol Allergy Clin North Am. 2015 May;35(2):335-48. doi: 10.1016/j.iac.2015.01.011.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25841555/

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7607869/
Le concentrazioni relative di Ag e Ab determinano il ruolo di IgE e IgG Abs nell'anafilassi mediata da Ab
L'anafilassi mediata da IgE richiede molto meno Ab e Ag rispetto all'anafilassi mediata da IgG. Di conseguenza, quando i livelli di Ab sono bassi (A), può verificarsi solo anafilassi mediata da IgE. Quando i livelli di Ag sono bassi ma i livelli di Ab sono alti (B), gli Abs "bloccanti" IgG prevengono l'anafilassi mediata da IgE intercettando l'Ag prima che possa legarsi alle IgE associate a FcεRI e legandosi al recettore inibitorio, FcγRIIB, ma la quantità di I complessi IgG / Ag sono troppo bassi per innescare l'anafilassi mediata da IgG. Di conseguenza, l'anafilassi non si verifica. Quando i livelli di Ag e Ab sono entrambi alti, ma Ab è in eccesso rispetto ad Ag (C), gli Abs IgG bloccano il legame di Ag alle IgE legate a FcεRI ma i complessi IgG / Ag possono legarsi a FcγRs; di conseguenza, si verifica solo anafilassi mediata da IgG. Quando i livelli di Ag e Ab sono entrambi alti, ma Ag è in eccesso (D), i complessi IgG / Ab sono sufficienti per innescare l'anafilassi mediata da IgG e abbastanza Ag sfugge al blocco IgG per legarsi alle IgE associate a FcεRI e innescare l'anafilassi IgE mediata.

Report recenti riguardanti l'attivazione diretta dei mastociti, indipendenti da quelli mediati dalle IgE, indicano che il recettore accoppiato alla proteina G umana - MRGPRX2 - può essere il recettore di molti farmaci e proteine cationiche, come gli antibiotici chinolonici (p. ciprofloxacina, levofloxacina), anestetici generali come atracuronio e rocuronio, icatibant e altri farmaci con il gruppo della tetraidroisochinolina (THIQ). [241]

L'endotipo delle reazioni IgE-mediate è il rilascio di mediatori dai mastociti e basofili che causa vampate, prurito, orticaria, angioedema, mancanza di respiro, respiro sibilante, nausea, vomito, diarrea, ipotensione, desaturazione di ossigeno e collasso cardiovascolare insieme ad altri sintomi. [242]
I fattori scatenanti comuni di queste reazioni includono alimenti, farmaci, lattice, veleni di imenotteri e allergeni ambientali. [243]

---

[241] Lieberman P, Garvey LH.
Mast Cells and Anaphylaxis.
Curr Allergy Asthma Rep. 2016 Mar;16(3):20. doi: 10.1007/s11882-016-0598-5.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26857018/

Subramanian H, Gupta K, Ali H.
Roles of Mas-related G protein-coupled receptor X2 on mast cell-mediated host defense, pseudoallergic drug reactions, and chronic inflammatory diseases.
J Allergy Clin Immunol. 2016;138(3):700-710. doi:10.1016/j.jaci.2016.04.051
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5014572/

Spoerl D, Nigolian H, Czarnetzki C, Harr T.
Reclassifying Anaphylaxis to Neuromuscular Blocking Agents Based on the Presumed Patho-Mechanism: IgE-Mediated, Pharmacological Adverse Reaction or "Innate Hypersensitivity"?
Int J Mol Sci. 2017;18(6):1223. Published 2017 Jun 7. doi:10.3390/ijms18061223
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5486046/

Zhang T, Che D, Liu R, Han S, Wang N, Zhan Y, Pundir P, Cao J, Lv Y, Yang L, Wang J, Ding M, Dong X, He L.
Typical antimicrobials induce mast cell degranulation and anaphylactoid reactions via MRGPRX2 and its murine homologue MRGPRB2.
Eur J Immunol. 2017 Nov;47(11):1949-1958. doi: 10.1002/eji.201746951. Epub 2017 Sep 4.
https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/eji.201746951

[242] Reber LL, Hernandez JD, Galli SJ.
The pathophysiology of anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2017 Aug;140(2):335-348. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.003.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5657389/

[243] Simons FE.
Anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2010 Feb;125(2 Suppl 2):S161-81. doi: 10.1016/j.jaci.2009.12.981.
Erratum in: J Allergy Clin Immunol. 2010 Oct;126(4):885.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20176258/

Simons FE.
Anaphylaxis: Recent advances in assessment and treatment.
J Allergy Clin Immunol. 2009 Oct;124(4):625-36; quiz 637-8. doi: 10.1016/j.jaci.2009.08.025.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19815109/

Simons FE.
9. Anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2008 Feb;121(2 Suppl):S402-7; quiz S420. doi: 10.1016/j.jaci.2007.08.061. PMID: 18241691.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18241691/

Clark S, Camargo CA Jr.
Epidemiology of anaphylaxis.
Immunol Allergy Clin North Am. 2007 May;27(2):145-63, v. doi: 10.1016/j.iac.2007.03.002.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17493495/

Altman AM, et al
Anaphylaxis in America: A national physician survey.
J Allergy Clin Immunol. 2015 Mar;135(3):830-3. doi: 10.1016/j.jaci.2014.10.049. Epub 2015 Jan 7.

Esistono importanti variazioni geografiche e legate all'età tra i paesi; tuttavia, gli allergeni alimentari più comuni sono arachidi, latte, uova, noci, crostacei, frutta e verdura. [244]
Gli antibiotici come β-lattamici, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS), agenti chemioterapici come i derivati del platino e i taxani, gli anticorpi monoclonali (mAb) chimerici umanizzati e umani, gli anestetici generali e gli allergeni dell'immunoterapia sono altri allergeni comuni sia nei bambini che negli adulti.[245]

Reazioni da rilascio di citochine (CRR)

Il fenotipo CRR è causato dal rilascio di mediatori pro-infiammatori come il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF-α), IL-1B e IL-6 e le loro cellule bersaglio (endotipo) includono monociti, macrofagi, mastociti e altre cellule con il recettore Fc gamma (FcγR), un partecipante essenziale in molte funzioni effettrici del sistema immunitario, incluso il rilascio di mediatori infiammatori e citotossicità cellulare anticorpo-dipendente.

I trigger per queste reazioni includono mAb chimerici, umanizzati e umani e agenti chemioterapici, incluso l'oxaliplatino. Questi farmaci non sono stati utilizzati solo per trattare malattie neoplastiche, autoimmuni e infiammatorie, ma anche per trattare disturbi allergici tra cui l'asma allergico, l'asma eosinofila e l'orticaria cronica.[246]
Le HSR agli agenti biologici sono meno comuni delle reazioni all'infusione standard e variano in base agli agenti biologici coinvolti. [247]
I sintomi fenotipici includono brividi, febbre e dolore che rispondono all'ibuprofene e ai liquidi e sono stati clinicamente correlati con l'IL-6. [248] Le CRR non sono tipicamente così gravi come le reazioni alle tempeste di citochine.

Le reazioni alla tempesta di citochine sono complicazioni sistemiche acute, gravi e potenzialmente letali dovute alla produzione di grandi quantità di citochine e chemochine, che svolgono un ruolo patologico nello sviluppo dei sintomi

---

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4859205/

Simons FE, Ardusso LR, Dimov V, Ebisawa M, El-Gamal YM, Lockey RF, Sanchez-Borges M, Senna GE, Sheikh A, Thong BY, Worm M; World Allergy Organization. World Allergy Organization Anaphylaxis Guidelines: 2013 update of the evidence base. Int Arch Allergy Immunol. 2013;162(3):193-204. doi: 10.1159/000354543. Epub 2013 Sep 5. https://www.karger.com/Article/FullText/354543

[244] Mostmans Y, Blykers M, Mols P, Gutermuth J, Grosber M, Naeije N. Anaphylaxis in an urban Belgian emergency department: epidemiology and aetiology. Acta Clin Belg. 2016 Apr;71(2):99-106. doi: 10.1179/2295333715Y.0000000060. Epub 2016 Feb 5. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26243353/

[245] Cavkaytar O, Karaatmaca B, Cetinkaya PG, Esenboga S, Arik Yilmaz E, Sahiner UM, Sekerel BE, Soyer O. Characteristics of drug-induced anaphylaxis in children and adolescents. Allergy Asthma Proc. 2017 Sep 1;38(5):56-63. doi: 10.2500/aap.2017.38.4064. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28814352/

Turner PJ, Jerschow E, Umasunthar T, Lin R, Campbell DE, Boyle RJ. Fatal Anaphylaxis: Mortality Rate and Risk Factors. J Allergy Clin Immunol Pract. 2017 Sep-Oct;5(5):1169-1178. doi: 10.1016/j.jaip.2017.06.031. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5589409/

[246] Galvão VR, Castells MC. Hypersensitivity to biological agents-updated diagnosis, management, and treatment. J Allergy Clin Immunol Pract. 2015 Mar-Apr;3(2):175-85; quiz 186. doi: 10.1016/j.jaip.2014.12.006. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25754718/

Khan DA. Hypersensitivity and immunologic reactions to biologics: opportunities for the allergist. Ann Allergy Asthma Immunol. 2016 Aug;117(2):115-20. doi: 10.1016/j.anai.2016.05.013 https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27499538/

[247] Castells MC. Anaphylaxis to chemotherapy and monoclonal antibodies. Immunol Allergy Clin North Am. 2015 May;35(2):335-48. doi: 10.1016/j.iac.2015.01.011. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25841555/

[248] Isabwe GAC, Garcia Neuer M, de Las Vecillas Sanchez L, Lynch DM, Marquis K, Castells M. Hypersensitivity reactions to therapeutic monoclonal antibodies: Phenotypes and endotypes. J Allergy Clin Immunol. 2018 Jul;142(1):159-170.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.018. Epub 2018 Mar 5. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29518427/

sistemici [249], IL-6 e altre citochine infiammatorie come IL -8, TNF-α, IFN-γ e IL-1β inducono l'inattivazione della caderina, che media l'adesione cellulare, portando a perdite vascolari per aumento della permeabilità capillare; inoltre, induce la formazione del fattore tissutale (tromboplastina) sulla superficie cellulare dei monociti, con conseguente attivazione della via estrinseca della coagulazione. [250]
Gli effetti delle citochine infiammatorie giocano un ruolo patologico nello sviluppo del dolore, ipossia tissutale, ipotensione , disfunzione miocardica, coagulazione intravascolare disseminata (CID) e disfunzione multiorgano.
L'IL-6 è un eccellente biomarcatore delle reazioni da tempesta di citochine a causa della sua correlazione con la gravità della reazione e la sua longevità nel siero del sangue. [251]

Questo fenotipo è caratterizzato da brividi, febbre e malessere generalizzato seguiti da ipotensione, desaturazione e collasso cardiovascolare. [252]
La premedicazione con inibitori anti-infiammatori della COX-1 e corticosteroidi può ridurre l'intensità di questi sintomi ma non protegge dalle reazioni gravi. [253]

Reazioni miste (Tipo I / CRR)

Reazioni miste si verificano come una miscela di fenotipi di tipo I e CRR e, tipicamente, si osservano durante la chemioterapia e / o l'HSR con mAbs, in cui i sintomi di reazioni IgE-mediate come arrossamento, prurito, orticaria, angioedema, difficoltà respiratorie, respiro sibilante, nausea, vomito, diarrea, ipotensione, desaturazione, collasso cardiovascolare e anafilassi pericolosa per la vita, che si verificano secondariamente al rilascio di mastociti / mediatori basofili (triptasi, istamina, leucotrieni e prostaglandine), si sovrappongono ai sintomi secondari al rilascio di citochine

[249] Schulert GS, Grom AA.
Macrophage activation syndrome and cytokine-directed therapies.
Best Pract Res Clin Rheumatol. 2014 Apr;28(2):277-92. doi: 10.1016/j.berh.2014.03.002.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4074772/

Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T.
Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm.
Immunotherapy. 2016 Jul;8(8):959-70. doi: 10.2217/imt-2016-0020.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27381687/

[250] Gomez-Salinero JM, Rafii S.
Plasmin regulation of acute cytokine storm.
Blood. 2017 Jul 6;130(1):5-6. doi: 10.1182/blood-2017-04-776385.
https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000649712033233X?via%3Dihub

Neumann FJ, Ott I, Marx N, Luther T, Kenngott S, Gawaz M, Kotzsch M, Schömig A.
Effect of human recombinant interleukin-6 and interleukin-8 on monocyte procoagulant activity.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997 Dec;17(12):3399-405. doi: 10.1161/01.atv.17.12.3399.
https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.ATV.17.12.3399

[251] Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T.
Immunotherapeutic implications of IL-6 blockade for cytokine storm.
Immunotherapy. 2016 Jul;8(8):959-70. doi: 10.2217/imt-2016-0020..
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27381687/

[252] Castells M.
Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine.
J Allergy Clin Immunol. 2017 Aug;140(2):321-333. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.012.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780940/

Castells MC.
Anaphylaxis to chemotherapy and monoclonal antibodies.
Immunol Allergy Clin North Am. 2015 May;35(2):335-48. doi: 10.1016/j.iac.2015.01.011.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25841555/

Khan DA.
Hypersensitivity and immunologic reactions to biologics: opportunities for the allergist.
Ann Allergy Asthma Immunol. 2016 Aug;117(2):115-20. doi: 10.1016/j.anai.2016.05.013.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27499538/

[253] Castells M.
Diagnosis and management of anaphylaxis in precision medicine.
J Allergy Clin Immunol. 2017 Aug;140(2):321-333. doi: 10.1016/j.jaci.2017.06.012.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28780940/

proinfiammatorie e chemochine (IL-1β, IL-6 e TNF-α) come brividi, febbre, malessere, ipotensione, desaturazione e collasso cardiovascolare, rendendo così impossibile distinguere i meccanismi.

Reazioni complementari / simili alla bradichinina

Le reazioni del complemento implicano l'attivazione diretta dei mastociti e di altre cellule immunitarie attraverso l'attivazione del complemento nonché l'attivazione diretta e indiretta della via intrinseca della coagulazione.[254]
Gli immunocomplessi possono attivare il sistema del complemento, generando anafilatossine come C3a e C5a, che può legarsi ai recettori del complemento con conseguente rilascio di istamina, leucotrieni e prostaglandine che possono indurre vampate, orticaria, ipossia, vasodilatazione e ipotensione. [255]
Questo meccanismo è stato descritto con farmaci come vancomicina, [256] mezzi di contrasto, [257] membrane di dialisi , e le infusioni di farmaci che sono sospesi in alcuni veicoli lipidici come Cremophor EL, polisorbato 80 e polietilenglicole. [258]

In particolare, i report hanno anche suggerito che il complemento può avere un ruolo importante nell'anafilassi indotta da vespidi, esacerbando la reazione dovuta all'attivazione del complemento da parte delle proteasi presenti nel veleno, che si aggiunge alla reazione mediata da IgE.[259]

La via molecolare delle reazioni da bradichinina è stata chiarita in modelli animali e comporta un aumento dell'eparina e del sistema di contatto guidato dal Fattore XII che si traduce nella produzione di bradichinina e, in ultima analisi, spiega la maggiore permeabilità vascolare (dal punto di vista clinico con ipotensione e desaturazione). [260]

---

[254] Muñoz-Cano R, Picado C, Valero A, Bartra J.
Mechanisms of Anaphylaxis Beyond IgE.
J Investig Allergol Clin Immunol. 2016;26(2):73-82; quiz 2p following 83. doi: 10.18176/jiaci.0046.
http://www.jiaci.org/issues/vol26issue2/1.pdf

Sala-Cunill A, et al
Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions.
J Allergy Clin Immunol. 2015 Apr;135(4):1031-1043.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.057. Epub 2014 Sep 18.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25240785/.

[255] Fregonese L, et al
Expression of the anaphylatoxin receptors C3aR and C5aR is increased in fatal asthma.
J Allergy Clin Immunol. 2005 Jun;115(6):1148-54. doi: 10.1016/j.jaci.2005.01.068.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15940127/

[256] Chopra N, Oppenheimer J, Derimanov GS, Fine PL.
Vancomycin anaphylaxis and successful desensitization in a patient with end stage renal disease on hemodialysis by maintaining steady antibiotic levels.
Ann Allergy Asthma Immunol. 2000 Jun;84(6):633-5. doi: 10.1016/S1081-1206(10)62416-7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10875494/

[257] Simon RA, Schatz M, Stevenson DD, Curry N, Yamamoto F, Plow E, Ring J, Arroyave C.
Radiographic contrast media infusions. Measurement of histamine, complement, and fibrin split products and correlation with clinical parameters.
J Allergy Clin Immunol. 1979 Apr;63(4):281-8. doi: 10.1016/0091-6749(79)90114-3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/85650/.

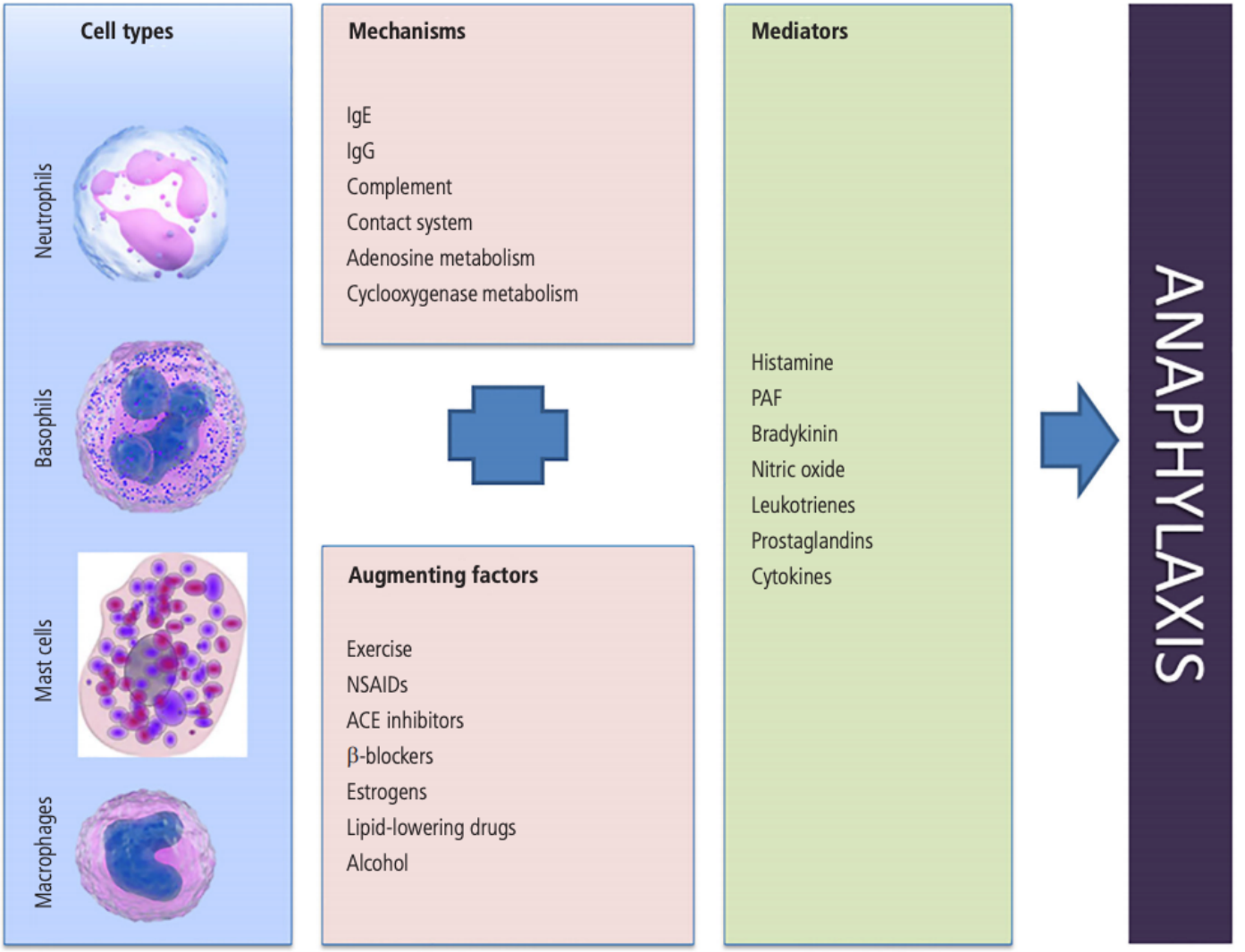
[258] Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R.
Human IgE-independent systemic anaphylaxis.
J Allergy Clin Immunol. 2016 Jun;137(6):1674-1680. doi: 10.1016/j.jaci.2016.02.015. Epub 2016 Apr 26.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7607869/

Weiszhár Z, Czúcz J, Révész C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z.
Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20.
Eur J Pharm Sci. 2012 Mar 12;45(4):492-8. doi: 10.1016/j.ejps.2011.09.016. Epub 2011 Sep 22.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21963457/

[259] van der Linden PW, Hack CE, Kerckhaert JA, Struyvenberg A, van der Zwan JC.
Preliminary report: complement activation in wasp-sting anaphylaxis.
Lancet. 1990 Oct 13;336(8720):904-6. doi: 10.1016/0140-6736(90)92272-j.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1976931/

[260] Sala-Cunill A, et al
Plasma contact system activation drives anaphylaxis in severe mast cell-mediated allergic reactions.
J Allergy Clin Immunol. 2015 Apr;135(4):1031-1043.e6. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.057. Epub 2014 Sep 18.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25240785/

Questi i sintomi sono stati associati ad es. alla contaminazione dell'eparina con condroitin solfato eccessivamente solfatato.[261]



http://www.jiaci.org/issues/vol26issue2/1.pdf
Meccanismo dell'anafilassi. Ig indica immunoglobulina; FANS, farmaco antinfiammatorio non steroideo; ACE, enzima di conversione dell'angiotensina; PAF, fattore di attivazione delle piastrine

Tossicologia dei liposomi

Per un approfondimento sulla tossicologia delle nanoparticelle si veda anche
Le piattaforme vaccinali tradizionali – Parte prima

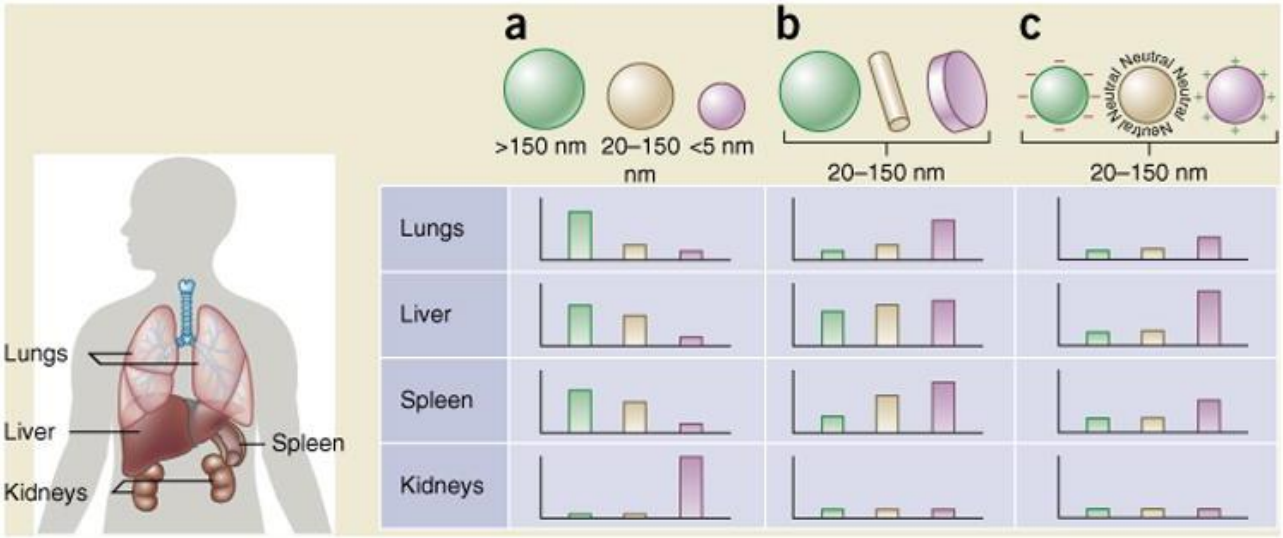
Pseudoallergia non-IgE mediata (CARPA)

Dal punto di vista tossicologico, va ricordato che da studi sul rilascio di RNAi attraverso LNP cationiche è emerso che le poliammine come la polietilenimmina e la poli-L-lisina portavano ad alti livelli di enzimi epatici nel siero, ridotto peso

[261] Kishimoto TK, Viswanathan K, Ganguly T, et al.
Contaminated heparin associated with adverse clinical events and activation of the contact system
[published correction appears in N Engl J Med. 2010 Mar 18;362(11):1056]. N Engl J Med. 2008;358(23):2457-2467. doi:10.1056/NEJMoa0803200
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3778681/

corporeo e riducevano drasticamente il numero totale dei leucociti, suggerendo un meccanismo di immunosoppressione dopo la somministrazione endovenosa.[262]

Nella figura seguente è riportata la biodistribuzione delle nanoparticelle in base alle dimensioni, alla carica superficiale e la forma.
I liposomi utilizzati nel vaccino Pfizer e Moderna tendono principalmente ad accumularsi nel fegato, con l'aumento del rischio di epatotossicità, (vedi Assessment report di Comirnaty- studi preclinici sui nuovi ingredienti)



https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4978509/
Le dimensioni, la forma e la carica superficiale delle nanoparticelle determinano la biodistribuzione tra i diversi organi tra cui polmoni, fegato, milza e reni.
(a) Le particelle sferiche, comprese le nanoparticelle d'oro, i liposomi e le micelle / nanoparticelle polimeriche possono variare di dimensioni e mostrare destini in vivo disparati. Le particelle rigide di grandi dimensioni con diametri> 2.000 nm si accumulano facilmente all'interno della milza e del fegato, nonché nei capillari dei polmoni. È stato dimostrato che le nanoparticelle nella gamma di 100-200 nm stravasano attraverso fenestrazioni vascolari dei tumori (effetto EPR) e sfuggono alla filtrazione da parte del fegato e della milza. Quando le dimensioni aumentano oltre 150 nm, sempre più nanoparticelle vengono intrappolate nel fegato e nella milza. Le nanoparticelle di piccole dimensioni (<5 nm) vengono filtrate dai reni. [263]
(b) Nuove tecniche di fabbricazione "dall'alto verso il basso" e "dal basso verso l'alto" hanno consentito l'esplorazione di diverse geometrie di nanoparticelle, comprese le forme cilindriche e discoidali, che hanno dimostrato di esibire effetti pronunciati sulla farmacocinetica e sulla biodistribuzione. Diverse forme di nanoparticelle mostrano caratteristiche di flusso uniche che alterano sostanzialmente la durata della circolazione, le interazioni della membrana cellulare e l'assorbimento dei macrofagi, che a loro volta influenzano la biodistribuzione tra i diversi organi. [264]
(c) La carica di nanoparticelle derivanti da distinte sostanze chimiche di superficie influenza l'opsonizzazione, i tempi di circolazione e l'interazione con i macrofagi residenti degli organi che compongono l'MPS (sistema fagocitico mononucleare), con particelle cariche positivamente più inclini al sequestro da parte dei macrofagi nei polmoni, nel fegato e nella milza. Le nanoparticelle neutre e leggermente caricate negativamente hanno una vita di circolazione più lunga e un minore accumulo nei suddetti organi dell'MPS. [265]
Sia in b che in c, si presume che la dimensione delle nanoparticelle sia compresa tra 20 e 150 nm. I singoli pannelli rappresentano il destino in vivo delle nanoparticelle, tenendo conto di parametri di progetto singolari di dimensione, forma e carica superficiale indipendenti l'uno dall'altro, e per questo motivo le rispettive scale variano da un pannello all'altro. È importante notare che la biodistribuzione in vivo varierà senza dubbio in base all'interazione di molti dei parametri di cui sopra.

[262] Landesman-Milo D, Peer D.
Toxicity profiling of several common RNAi-based nanomedicines: a comparative study.
Drug Deliv Transl Res. 2014 Feb;4(1):96-103. doi: 10.1007/s13346-013-0158-7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25786620/

[263] Longmire M, Choyke PL, Kobayashi H.
Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats.
Nanomedicine (Lond). 2008;3(5):703-717. doi:10.2217/17435889.3.5.703
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3407669/

[264] Black KC, Wang Y, Luehmann HP, et al.
Radioactive 198Au-doped nanostructures with different shapes for in vivo analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution.
ACS Nano. 2014;8(5):4385-4394. doi:10.1021/nn406258m
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4358630/

[265] Xiao K, Li Y, Luo J, et al.
The effect of surface charge on in vivo biodistribution of PEG-oligocholic acid based micellar nanoparticles.
Biomaterials. 2011;32(13):3435-3446. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.021
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3055170/

E' noto inoltre che l'iniezione endovenosa di una varietà di farmaci nanotecnologici potenziati (liposomiali, micellari, coniugati con polimeri) e a base di proteine (anticorpi, enzimi) può portare a reazioni di ipersensibilità (HSR), conosciute anche come reazioni da infusione o anafilattoidi.
Il meccanismo molecolare dei sintomi di allergia da lieve a grave può differire da caso a caso e per lo più non è noto, tuttavia, in molti casi una delle cause principali, o un fattore che contribuisce, è l'attivazione del sistema del complemento (C).

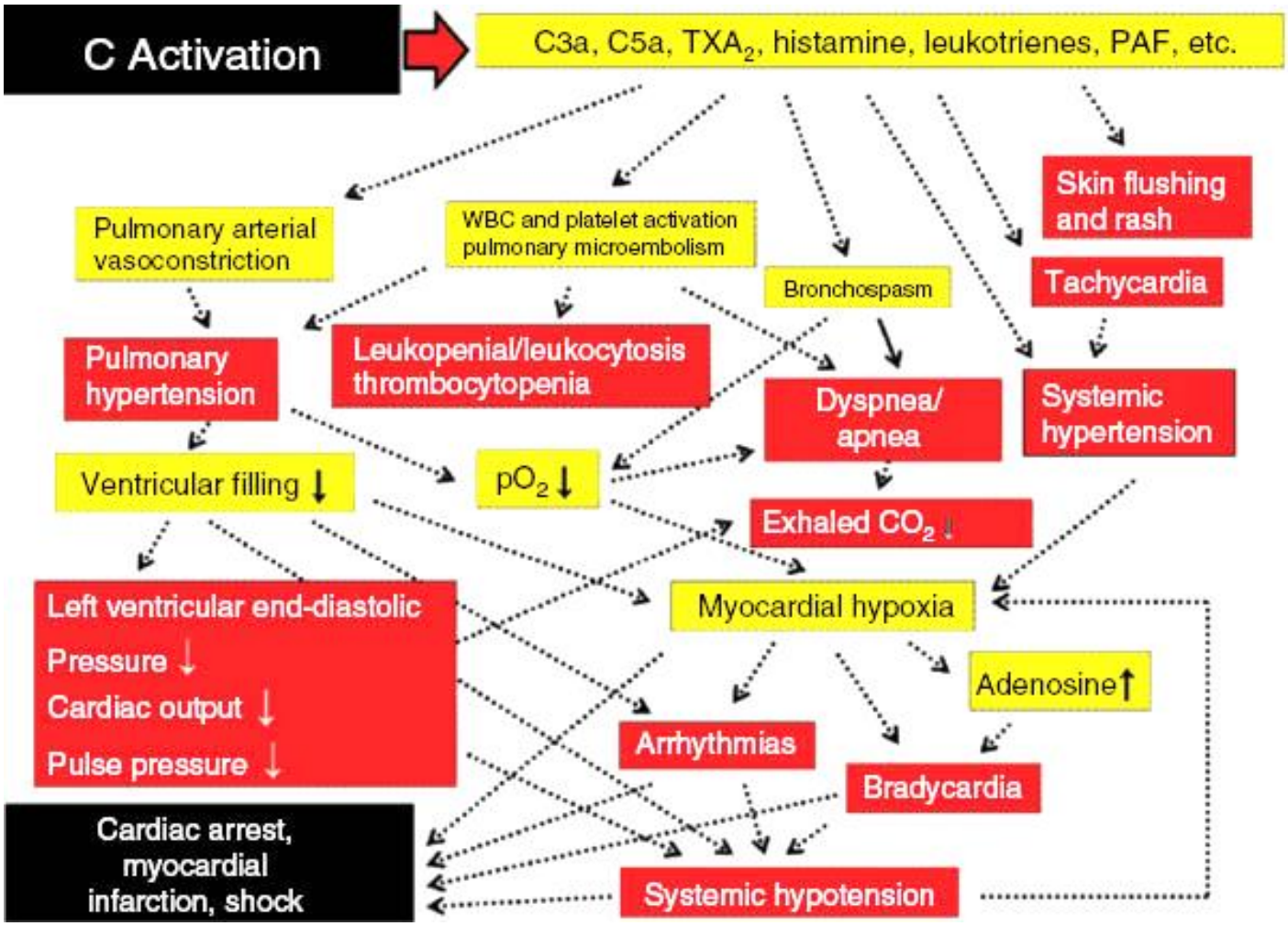
La rilevanza clinica delle HSR correlate all'attivazione del complemento, in particolare la *pseudoallergia non-IgE mediata (CARPA)*, risiede nella sua imprevedibilità e nell'occasionale esito letale. Di conseguenza, esiste la necessità medica di sviluppare analisi di laboratorio e modelli animali per quantificare la CARPA.

Si sottolinea che il rilascio di mastociti indotto dall'anafilatossina non spiega completamente le reazioni gravi, ma potrebbe essere necessario un secondo evento scatenante sulle cellule che mediano le allergie, e si suggerisce che la CARPA rappresenti una reazione di "stress sanguigno", una lotta sistemica del corpo contro agenti biologici e chimici dannosi attraverso l'asse anafilatossina / mastociti / sistema circolatorio, in analogia alla lotta del corpo contro lo stress fisico ed emotivo attraverso l'asse ipotalamo / ipofisi / surrene.
In entrambi i casi la risposta a un'ampia varietà di effetti nocivi viene orientata in uno schema uniforme di cambiamenti fisiologici.[266]

[266] Szebeni J.
Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals.
Mol Immunol. 2014 Oct;61(2):163-73. doi: 10.1016/j.molimm.2014.06.038. Epub 2014 Aug 12.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25124145/

Patkó, Zsófia and Szebeni, János.
Blood cell changes in complement activation-related pseudoallergy
European Journal of Nanomedicine, vol. 7, no. 3, 2015, pp. 233-244. https://doi.org/10.1515/ejnm-2015-0021
https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ejnm-2015-0021/html

Dézsi L, et al
Features of complement activation-related pseudoallergy to liposomes with different surface charge and PEGylation: comparison of the porcine and rat responses.
J Control Release. 2014 Dec 10;195:2-10. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.08.009.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25148822/



https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/ejnm-2015-0021/html
Interrelazioni tra le diverse anomalie durante CARPA, che portano a sintomi clinici.

integrazione nel DNA

Le nuove biotecnologie di produzione hanno sollevato importanti domande sulla sicurezza dei nuovi farmaci OGM. Una delle preoccupazioni espresse è relativa al potenziale rischio dell'integrazione dell'mRNA nel DNA umano.
Va notato che mentre c'è una preoccupazione teorica per l'integrazione nel genoma dell'ospite per quanto riguarda i vaccini a DNA plasmidico, questa preoccupazione non è condivisa per i vaccini a base di mRNA per i seguenti motivi:

(1) l'mRNA rimane nel citoplasma e non viene trasportato al nucleo.
(2) Per l'integrazione, l'mRNA dovrebbe essere convertito in una molecola di DNA. Sebbene sia possibile che il DNA a filamento singolo possa essere integrato, la forma di integrazione del DNA è generalmente il DNA a doppio filamento. Ciò richiede la presenza di una trascrittasi inversa e di primer appropriati e siti di legame complementari sull'mRNA per generare prima un DNA a filamento singolo e quindi convertire questo DNA a filamento singolo in DNA a doppio filamento, che ancora richiede primer e siti di legame appropriati.
Nei retrovirus, questo processo si verifica nella particella del retrovirus. Questo non è il caso dei vaccini a mRNA, in quanto nonostante la trascrittasi inversa endogena è presente nelle cellule di mammifero, gli enzimi e l'RNA non si trovano nel complesso appropriato per consentire una trascrizione inversa efficiente.
(3) La fase finale dell'integrazione retrovirale richiede l'attività dell'integrasi virale, che si trova ancora nella particella retrovirale. È stato dimostrato che l'integrazione del DNA nudo a doppia elica è molto inefficiente.
(4) È stato dimostrato che l'mRNA del vaccino si degrada in un tempo relativamente breve una volta assorbito nelle cellule del corpo. Infine, poiché l'mRNA cellulare è più abbondante di un vaccino a mRNA, è altamente improbabile

che una trascrittasi inversa cellulare (RT) copi preferenzialmente l'mRNA del vaccino rispetto all'mRNA cellulare. Per tutti questi motivi, il rischio di integrazione dei vaccini a mRNA è stato considerato trascurabile. [267]

No, Really, mRNA Vaccines Are Not Going To Affect Your DNA
mRNA Vaccines and COVID-19

Vale però la pena riportare le osservazioni del dott. Cimolai N. nel suo articolo *"Do RNA vaccines obviate the need for genotoxicity studies?"* [268] sulla possibilità avanzata dai produttori che i vaccini a RNA possiedono i requisiti per ovviare a qualsiasi preoccupazione per la trasformazione cellulare e quindi possono essere esonerati dalla necessità di effettuare gli studi di genotossicità regolatori [269]
Nonostante la capacità dei retrovirus di produrre la retrotrascittasi e di integrarsi nel DNA genomico sia nota da più di 50 anni, [270] la capacità delle cellule eucariotiche di esprimere la trascrittasi inversa è di più recente acquisizione [271].

[267] Knezevic I, Liu MA, Peden K, Zhou T, Kang HN.
Development of mRNA Vaccines: Scientific and Regulatory Issues.
Vaccines (Basel). 2021 Jan 23;9(2):81. doi: 10.3390/vaccines9020081.
https://www.mdpi.com/2076-393X/9/2/81

[268] Cimolai N.
Do RNA vaccines obviate the need for genotoxicity studies?
Mutagenesis. 2020 Nov 20:geaa028. doi: 10.1093/mutage/geaa028.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33216145/

[269] Cimolai N.
Preliminary concerns with vaccine vectors.
Mutagenesis. 2020 Sep 12;35(4):359-360. doi: 10.1093/mutage/geaa020.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32785590/

[270] Temin HM.
The protovirus hypothesis: speculations on the significance of RNA-directed DNA synthesis for normal development and for carcinogenesis.
J Natl Cancer Inst. 1971 Feb;46(2):3-7.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5115908/

[271] Järås M, Edqvist A, Rebetz J, Salford LG, Widegren B, Fan X.
Human short-term repopulating cells have enhanced telomerase reverse transcriptase expression.
Blood. 2006 Aug 1;108(3):1084-91. doi: 10.1182/blood-2005-09-008904.
https://ashpublications.org/blood/article/108/3/1084/22369/Human-short-term-repopulating-cells-have-enhanced

Schwertz H, et al
Endogenous LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Element-1) Reverse Transcriptase Activity in Platelets Controls Translational Events Through RNA-DNA Hybrids.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Apr;38(4):801-815. doi: 10.1161/ATVBAHA.117.310552. Epub 2018 Jan 4.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5864535/

Holinstat M.
New LINE(s) of Evidence for Genetic Regulation of Platelets.
Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Apr;38(4):690-691. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310690.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5951185/

Su Y, Ghodke PP, Egli M, Li L, Wang Y, Guengerich FP.
Human DNA polymerase η has reverse transcriptase activity in cellular environments.
J Biol Chem. 2019 Apr 12;294(15):6073-6081. doi: 10.1074/jbc.RA119.007925. Epub 2019 Mar 6.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6463694/

La diversità di questa classe di enzimi così come i loro ruoli comuni nei processi biologici di routine è stata confermata [272]. Inoltre, anche il ruolo potenziale degli stessi enzimi nel modulare o promuovere l'oncogenesi o la proliferazione cellulare è stato oggetto di ricerca. [273]
Shimizu et al. approfondiscono ulteriormente questo problema con la scoperta nelle cellule di DNA citoplasmatico complementare a virus a RNA non retrovirale che può spiegare l'integrazione di sequenze di bornavirus e filovirus nei genomi di diversi mammiferi. [274]

Inoltre, è di recente pubblicazione in preprint una ricerca in cui è stata dimostrata, in via preliminare e quindi da confermare con ulteriori studi più approfonditi [275], l'integrazione del SARS-Cov-2 nel DNA genomico.[276]

Lo sviluppo di vaccini a mRNA stabilizzato può anche aggiungere un altro livello di complessità. [277] Queste modificazioni chimiche producono un mRNA che è meno immunogenico, in quanto l'mRNA non modificato può essere riconosciuto più facilmente dai recettori Toll-like e degradato.[278] Tali modificazioni genetiche possono rendere più stabile l'mRNA o

[272] Spadafora C.
A reverse transcriptase-dependent mechanism plays central roles in fundamental biological processes.
Syst Biol Reprod Med. 2008 Jan-Feb;54(1):11-21. doi: 10.1080/19396360701876815.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18543862/

Gladyshev EA, Arkhipova IR.
A widespread class of reverse transcriptase-related cellular genes.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Dec 20;108(51):20311-6. doi: 10.1073/pnas.1100266108. Epub 2011 Aug 29.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3251080/

[273] Sciamanna I, De Luca C, Spadafora C.
The Reverse Transcriptase Encoded by LINE-1 Retrotransposons in the Genesis, Progression, and Therapy of Cancer.
Front Chem. 2016 Feb 11;4:6. doi: 10.3389/fchem.2016.00006.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4749692/

Khattar E, Kuet al
Telomerase reverse transcriptase promotes cancer cell proliferation by augmenting tRNA expression.
J Clin Invest. 2016 Oct 3;126(10):4045-4060. doi: 10.1172/JCI86042. Epub 2016 Sep 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5096818/

[274] Shimizu A, Nakatani Y, Nakamura T, et al.
Characterisation of cytoplasmic DNA complementary to non-retroviral RNA viruses in human cells.
Sci Rep. 2014;4:5074. Published 2014 May 30. doi:10.1038/srep05074
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4038843/

[275] https://science.thewire.in/the-sciences/why-the-study-claiming-sars-cov-2s-rna-is-fused-into-human-dna-is-flawed/

[276] Zhang L, Richards A, Khalil A, Wogram E, Ma H, Young RA, Jaenisch R.
SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome.
bioRxiv [Preprint]. 2020 Dec 13:2020.12.12.422516. doi: 10.1101/2020.12.12.422516.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7743078/

[277] Pardi N, Weissman D.
Nucleoside Modified mRNA Vaccines for Infectious Diseases.
Methods Mol Biol. 2017;1499:109-121. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_6.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987145/

Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, Gurunathan S, DeRosa F.
The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective.
NPJ Vaccines. 2020 Feb 4;5:11. doi: 10.1038/s41541-020-0159-8.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7000814/

[278] Badieyan ZS, Evans T.
Concise Review: Application of Chemically Modified mRNA in Cell Fate Conversion and Tissue Engineering.
Stem Cells Transl Med. 2019 Aug;8(8):833-843. doi: 10.1002/sctm.18-0259. Epub 2019 Mar 19.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6646692/

portare alla produzione di una maggiore espressione proteica.[279] La modificazione dei nucleosidi, tuttavia, può anche influenzare le strutture dell'RNA secondario e può anche avere un impatto su una varietà di funzioni cellulari. [280]

Se tali modifiche in un vaccino a mRNA possono avere un impatto deleterio sulla funzione delle cellule eucariotiche andrà verificato su ampia scala. In ambito normativo, diversi gruppi di ricerca hanno valutato la sicurezza dei vaccini e in particolare i vaccini a RNA. [281]
Mentre si ritiene generalmente che le formulazioni dei vaccini non richiedano studi di genotossicità, le versioni più recenti di vaccini come i vaccini a DNA o RNA attirano un diverso livello di discussione, nonostante non siano considerati prodotti di terapia genica . [282]
Una discussione specifica più recente sui vaccini COVID-19 si è concentrata sulla tossicità sullo sviluppo, la riproduzione e la biodistribuzione.[283] Il potenziale per l'RNA esogeno, virale o altro, di integrarsi nel DNA umano in seguito alla vaccinazione è ad oggi teorico, come pure il potenziale per qualsiasi RNA di questo tipo di indurre processi alterati od oncogenici nelle cellule umane è teorico, ma fino a quando tali ipotesi non saranno opportunamente verificate in seguito alla vaccinazione o all'infezione naturale e saranno pubblicati studi appropriati, di cui c'è una carenza sorprendente vista l'importanza, le valutazioni normative sulla sicurezza per l'immissione in commercio dei vaccini a RNA dovrebbero includere studi di genotossicità.

Nonostante i vaccini ad acidi nucleici e a vettori virali non rientrino nella categoria dei farmaci per terapia genica, sono però classificati come farmaci OGM (organismi geneticamente modificati).
L'uso clinico sia delle terapie geniche (che sono anche OGM) che dei vaccini profilattici OGM comporta il rischio che questi prodotti possono entrare nell'ambiente per dispersione involontaria o tramite escrezione da parte del paziente e l'OGM potrebbe subire cambiamenti genetici o fenotipici, infettare, riprodursi, rimanere latente, competere con specie esistenti o trasferire il suo materiale genetico ad altre specie, con un impatto sulla salute umana e sull'ambiente. Di conseguenza, i medicinali costituiti da o contenenti un OGM sono regolati dalla legislazione ambientale e sui farmaci per uso umano nell'Unione Europea (UE) e tutti i suoi potenziali rischi devono essere valutati effettuando una valutazione del rischio ambientale (ERA) durante il suo sviluppo. Per condurre una sperimentazione clinica con un prodotto basato su un OGM, lo Sponsor deve ottenere non solo l'autorizzazione dai comitati etici e dalle autorità sanitarie nazionali competenti (NHA) in cui si svolgerà lo studio, ma anche un'ulteriore autorizzazione ottenuta in

[279] Andries O, Mc Cafferty S, De Smedt SC, Weiss R, Sanders NN, Kitada T.
N(1)-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice.
J Control Release. 2015 Nov 10;217:337-44. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.08.051. Epub 2015 Sep 3.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26342664/

[280] Zhao BS, He C.
Pseudouridine in a new era of RNA modifications.
Cell Res. 2015 Feb;25(2):153-4. doi: 10.1038/cr.2014.143. Epub 2014 Nov 4.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650566/

Parr CJC, Wada S, Kotake K, Kameda S, Matsuura S, Sakashita S, Park S, Sugiyama H, Kuang Y, Saito H.
N 1-Methylpseudouridine substitution enhances the performance of synthetic mRNA switches in cells.
Nucleic Acids Res. 2020 Apr 6;48(6):e35. doi: 10.1093/nar/gkaa070.
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102939/

[281] Naik R, Peden K.
Regulatory Considerations on the Development of mRNA Vaccines.
Curr Top Microbiol Immunol. 2020 Jul 8. doi: 10.1007/82_2020_220.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32638114/

Hinz T, et al
The European Regulatory Environment of RNA-Based Vaccines.
Methods Mol Biol. 2017;1499:203-222. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_13.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987152/

https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-and-licensure-vaccines-prevent-covid-19

[282] https://www.who.int/biologicals/vaccines/nonclinial_evaluation_of_vaccines/en/

[283] Hager G.
Nonclinical Safety Testing of RNA Vaccines.
Methods Mol Biol. 2017;1499:253-272. doi: 10.1007/978-1-4939-6481-9_16.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27987155/

seguito all'approvazione di un'ERA dalle autorità governative di ciascuno Stato membro incaricate delle valutazioni degli OGM e responsabili dell'ambiente in ogni paese.[284]

Data l'emergenza sanitaria pubblica causata dall'epidemia di COVID-19, il 13 luglio 2020 [285], il Parlamento europeo e il Consiglio dell'UE hanno concesso una deroga temporanea a questi requisiti ambientali per facilitare le sperimentazioni cliniche con OGM destinate a trattare o a prevenire la COVID-19, in modo da farle iniziare il prima possibile, senza i ritardi generati dalle diverse implementazioni nazionali delle Direttive ambientali 2001/18 / CE e 2009/41 / CE e dai loro diversi requisiti [286].
Sebbene queste due Direttive mirino a garantire la protezione della salute umana e dell'ambiente attraverso la valutazione dei rischi derivanti dall'emissione deliberata o dall'uso contenuto di OGM, si è ritenuto che la tutela della salute pubblica, attraverso l'accelerazione della diffusione di un vaccino COVID-19, dovesse prevalere in questa situazione ritenuta senza precedenti.
Questa deroga temporanea è però molto contestata. Alcuni gruppi di esperti hanno infatti sottolineato che questa misura potrebbe essere irresponsabile in quanto lo sviluppo di vaccini basati su virus OGM potrebbe comportare rischi per la salute umana e l'ambiente, e tali rischi non sono necessariamente coperti dai protocolli generali di sicurezza volti a proteggere partecipanti.[287]

[284] Iglesias-Lopez C.
Temporary derogation from European environmental legislation for clinical trials of genetically modified organisms for coronavirus disease 2019.
Cytotherapy. 2021;23(1):10-11. doi:10.1016/j.jcyt.2020.09.005
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7537551/

[285] https://www.consilium.europa.eu/en/press/press-releases/2020/07/14/vaccine-against-covid-19-council-adopts-measures-to-facilitate-swift-development/

https://data.consilium.europa.eu/doc/document/PE-28-2020-INIT/en/pdf

Communication from the Commission to the European Parliament the European Council the Council and the European Investment Bank . EU Strategy for COVID-19 vaccines [Internet] 2020. https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/communication-eu-strategy-vaccines-covid19_en.pdf [cited 2020 Sep 2].

Official Journal of the European Union . Regulation (EU) 2020/1043 of the European Parliament and of the Council of 15 July 2020 on the conduct of clinical trials with and supply of medicinal products for human use containing or consisting of genetically modified organisms intended to treat or p
[Internet] 2020. https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R1043&from=EN [cited 2020 Sep 2

286 https://eur-lex.europa.eu/legal-content/IT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009L0041&from=EN

https://www.minambiente.it/sites/default/files/Direttiva_2001_18_CE_del_Parlamento_europeo_e_del_Consiglio_del_12_marzo_2001.pdf

Iglesias-Lopez C, Obach M, Vallano A, Agustí A, Montané J.
Hurdles of environmental risk assessment procedures for advanced therapy medicinal products: comparison between the European Union and the United States.
Crit Rev Toxicol. 2019 Aug;49(7):580-596. doi: 10.1080/10408444.2019.1689380. Epub 2019 Dec 17.
https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31846383/

[287] Commissie Genetische Modificatie . COGEM advice concerning the proposal by the EC to suspend the environmental risk assessment of clinical trials for the treatment or prevention of COVID-19 [Internet] 2020. https://cogem.net/app/uploads/2020/07/200624-01-Advice-concerning-the-proposal-by-the-EC-to-suspend-the-environmental-risk-assessment-of-clinical-trials-for-the-treatment-or-prevention-of-COVID-19.pdf [cited 2020 Sep 2]