

7Giugno

Veicoli per a rilascio controllato di vaccini a mRNA

*Il veicolo non è un problema:
problematici sono soltanto il conducente,
i viaggiatori e la strada.*

Il *vaccino mRNA* è una tecnologia di nuova concezione, una combinazione di biologia molecolare e immunologia attraverso una tecnologia strettamente correlata alla terapia genica. Durante questi ultimi decenni, grazie al miglioramento di alcune procedure sperimentali sono stati ottenuti importanti progressi per quanto riguarda la *sicurezza, l'efficacia* e la *produzione* industriale dei vaccini mRNA.

I *vaccini mRNA* si sono dimostrati capaci di indurre anticorpi negli studi clinici di *fase I* sull'uomo. Il "segreto" è che l'*mRNA* non è un vettore replicante, non presenta caratteristiche di resistenza agli antibiotici, nessuna integrazione genomica e non si accompagna a forti risposte immunogeniche. Inoltre, le *nucleasi* degradano rapidamente l'*RNA* a singolo filamento. Sebbene i componenti dell'*mRNA* degradati inneschino l'eccessiva attivazione del sistema immunitario, lo sviluppo di un sistema di trasporto efficace e sicuro con *mRNA* modificato può aumentarne l'efficacia ed eliminare eventuali gli effetti collaterali.

La loro *efficacia terapeutica* dipende dalle modifiche e principalmente dai veicoli utilizzati. Ad esempio, il *vaccino HSV-2* (virus dell'herpes simplex 2) a *mRNA* modificato con *nucleosidi* ha ridotto i carichi di virus. *Liposomi* modificati con *mannosio* sono stati utilizzati per fornire *mRNA* direttamente alle cellule. Il vettore ha protetto l'*mRNA* dalla degradazione e ha promosso la sovraespressione dell'*mRNA* mediante la sovraregolazione del recettore del mannosio (CD206) sulle superfici cellulari. La produzione di vaccini mRNA su larga scala tende ad essere industrializzata; la scala di produzione di massa si basa sulla *scienza traslazionale*, fondamentale per accelerare la velocità di produzione. In vitro, la *tecnologia traslazionale* seleziona rapidamente formulazioni e costrutti per disegnare studi preclinici e clinici

Strategie di somministrazione dei vaccini mRNA

A causa dell'instabilità dei vaccini mRNA, l'introduzione di *vaccini mRNA* necessita di assistenza da parte dei veicoli. Pertanto, sono state sviluppati a base di **lipidi, di polimeri, peptidi, fino a repliconi simili a virus e di nanoemulsioni cationiche**. Inoltre, il vaccino mRNA nudo può anche essere iniettato direttamente nelle cellule. Ad oggi, i vaccini mRNA basati su DC sono stati recentemente sviluppati per suscitare l'immunità adattativa. Quella che segue è una "vetrina" dei principali veicoli utilizzabili per trasferire mRNA

Veicoli a base di lipidi

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) sono state ampiamente utilizzate come vettori per fornire mRNA. Il primo studio clinico condotto sui vaccini mRNA è consegnato con LNP. Gli LNP sono piattaforme di rilascio di acido nucleico mature con carica negativa caratterizzate da **aminolipidi ionizzabili, polietilenglicole, fosfolipidi e colesterolo**. Gli **aminolipidi ionizzabili** essenziali facilitano la fuoriuscita dell'*mRNA* dall'endosoma interagendo con gli amminolipidi ionizzabili e la membrana endosomiale. Il glicole polietilenico è un altro componente essenziale per prolungare il tempo di circolazione LNP in quanto ostacola spazialmente il legame dell'*mRNA* e delle proteine plasmatiche, responsabile di accelerare la clearance svolta da reticoloendoteliale (ER). **Fosfolipidi e colesterolo** possono integrare stabilmente la struttura dei LNP. Per essere precisi, i LNP hanno due

vantaggi come vettore di vaccini mRNA. Da un lato, i LNP difendono l'mRNA dalla degradazione da parte degli *enzimi dell'endosoma*. La caratteristica garantisce un'elevata efficienza di incapsulamento. D'altra parte, gli LNP hanno una *buona biocompatibilità* attraverso una serie di processi biologici per fornire mRNA per l'espressione. Il primo processo coinvolge la via dell'apolipoproteina E (ApoE)-recettore delle lipoproteine a bassa densità (LDLR). Questo percorso endogeno è una base mirata per un rilascio efficiente (Tang B 2020)

Quindi, *l'endocitosi mediata da TLR4* assorbe i LNP, formando una vescicola capace di fondersi con gli endosomi. Dopo essere sfuggiti agli endosomi, i LNP rilasciano mRNA nel citoplasma che potrà così sintetizzare gli antigeni del vaccino. (Kedmi R 2010)

Veicoli a base di polimeri

I materiali polimerici sono meno studiati clinicamente rispetto ai lipidi ionizzabili. Tuttavia, rivestono l'mRNA senza subire degradazione e promuovono l'espressione delle proteine. Gli svantaggi dei materiali polimerici sono la *polidispersione* e la *clearance* di grandi molecole. Per migliorare l'effetto terapeutico, sono state aggiunte *catene lipidiche*, che hanno ampliato le strutture ramificate e costruito domini che promuovono la *biodegradazione*. Nel complesso, il sistema di somministrazione a base di polimeri è una piattaforma promettente per la sua efficacia di somministrazione di mRNA. Tuttavia, il loro utilizzo è ancora nella fase iniziale degli studi preclinici. (Kowalski PS 2019)

Veicoli a base di peptidi

A causa dell'interazione elettrostatica, l'mRNA caricato negativamente viene facilmente trasportato dal *peptide cationico*. Il motivo per cui i peptidi sono caricati positivamente è dovuto alla presenza di *gruppi amminici caricati positivamente*. Ad esempio, il residuo di *lisina* e il residuo di *arginina* portano cariche positive all'amminoacido, consentendo all'mRNA elettronegativo di adsorbirsi strettamente sul peptide cationico. La quantità di mRNA caricato è correlata positivamente con i rapporti N/P (negativo/positivo). Inoltre, un aumento del rapporto di gruppi *ammino/fosfato* carichi può aumentare il *potenziale zeta* e ridurre al minimo la dimensione delle particelle, aumentando così l'efficienza di incapsulamento (Udhayakumar VK 2017)

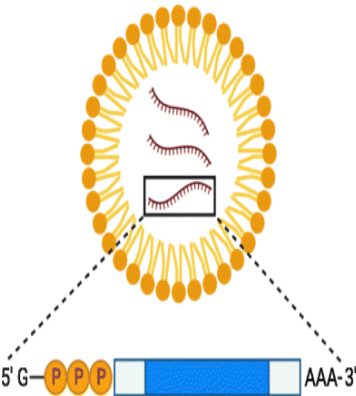
Veicoli repliconici (virus.like)

Le particelle di replicone simili a virus (VRP) possono incapsulare *saRNA* che codifica l'antigene per il rilascio nel citosol, praticamente una modalità alternativa di infettare il virus. Le proteine della struttura virale sono sintetizzate in vitro, seguite dall'incapsulamento del *saRNA* codificante per l'antigene designato. Alcuni virus attenuati mantengono la *capacità di autoreplicazione*. In più tipi di virus, è stato convalidato il potenziamento della potenza del vaccino. Più di recente, *l'RNA replicone* derivato da alfavirus che codifica per la proteina spike (S) di SARS-CoV-2 è stato incapsulato in nanoparticelle inorganiche lipidiche (Li W 2017)

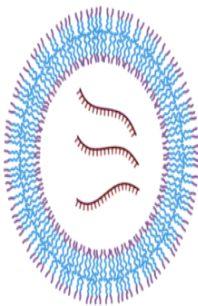
Veicoli a Nanoemulsione cationica

La nanoemulsione cationica (CNE) è un sistema di somministrazione non virale che potenzia i vaccini mRNA legandosi ai saRNA. Uno dei componenti più essenziali è *il lipide cationico 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfolina (DOTAP)*. DOTAP è stato utilizzato in studi clinici per le sue cariche positive emulsionate con lo stesso componente dell'adiuvante dell'emulsione MF59. Fatta eccezione per l'uso clinico, DOTAP ha la priorità nella disponibilità, nella solubilità dello *squalene* e nella caratteristica cationica a un certo pH. I *lipidi cationici* possono formare un'emulsione di dimensioni nanometriche pH-dipendente (Tanaka H 2017)

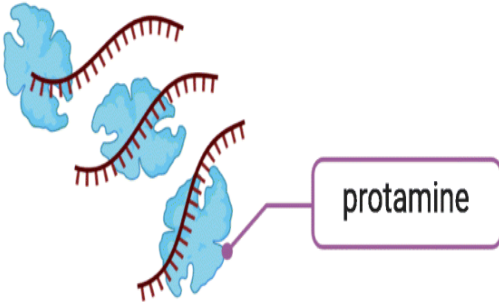
Lipid-based Delivery



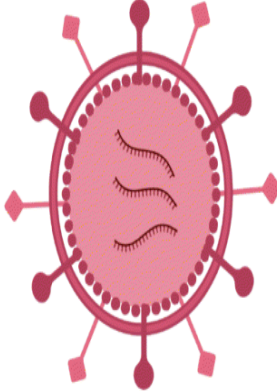
Polymer-based Delivery



Peptide-based Delivery



Virus-like Replicon Particle



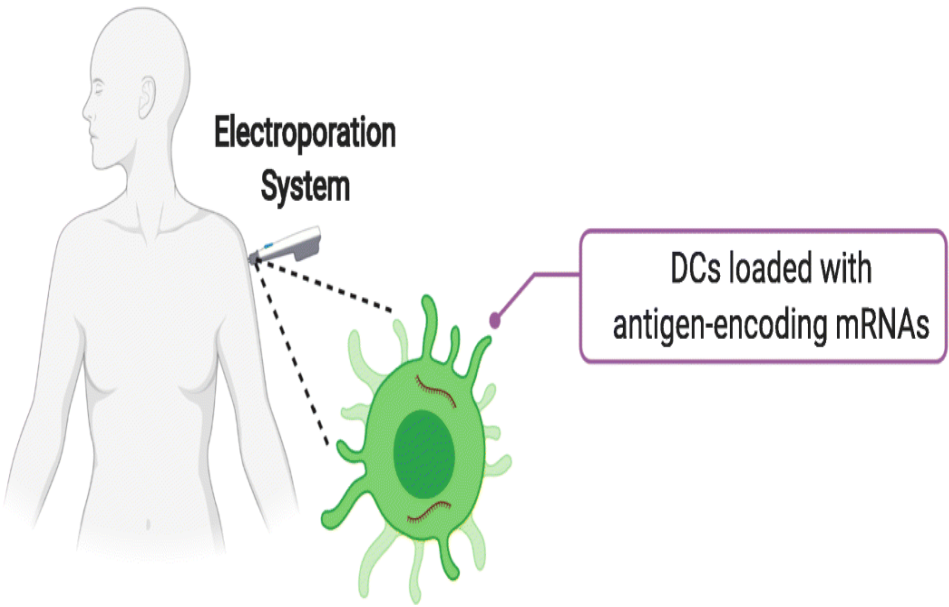
Cationic Nanoemulsion



Naked mRNAs



Dendritic Cell-Based mRNA Vaccines



Senza veicolo.

Diversamente dai vaccini a *mRNA* basati su carrier, gli mRNA nudi vengono rilasciati iniettando direttamente la soluzione di *mRNA*. Sebbene gli *mRNA* nudi non possano attraversare liberamente la membrana, diversi studi hanno proposto alcune ipotesi sul suo meccanismo di assorbimento. Alcuni ricercatori suggeriscono che l'assorbimento dell'*mRNA* nudo coinvolge la *macropinositosi* mediata da *cellule dendritiche* (DC). Permette l'espressione dell'*mRNA* che codifica l'antigene e promuove l'attivazione delle cellule T/DC. Una volta che le DC sono mature, gli mRNA vengono diminuiti dalle DC. Senza l'assistenza del vettore, altri scienziati ritengono che gli mRNA intracellulari vengano rilasciati dalla rottura della membrana (penetrazione diretta e permeabilizzazione). La microiniezione è un rappresentante della penetrazione diretta, iniziata per la prima volta negli anni '70 (Brachet J 1973)

Riferimenti

- Tang B et al. Development of Lipid-Polymer Hybrid Nanoparticles for Improving Oral Absorption of Enoxaparin. *Pharmaceutics*. 2020 Jun 30;12(7):607.
- Kedmi R, Ben-Arie N, Peer D. The systemic toxicity of positively charged lipid nanoparticles and the role of Toll-like receptor 4 in immune activation. *Biomaterials*. 2010 Sep;31(26):6867-75.
- Kowalski PS et al. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery. *Mol Ther*. 2019 Apr 10;27(4):710-728.
- Udhayakumar VK et al Arginine-Rich Peptide-Based mRNA Nanocomplexes Efficiently Instigate Cytotoxic T Cell Immunity Dependent on the Amphipathic Organization of the Peptide. *Adv Healthc Mater*. 2017 Jul;6(13).
- Li W et al. West Nile virus infectious replicon particles generated using a packaging-restricted cell line is a safe reporter system. *Sci Rep*. 2017 Jun 12;7(1):3286.
- Tanaka H, Oasa S, Kinjo M, Tange K, Nakai Y, Harashima H, Akita H. Temperature and pH sensitivity of a stabilized self-nanoemulsion formed using an ionizable lipid-like material via an oil-to-surfactant transition. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2017 Mar 1;151:95-101.
- Brachet J et al. Microinjection of rabbit hemoglobin messenger RNA into amphibian oocytes and embryos. *Proc*