

17.Maggio

Per aumentare l'efficacia dei vaccini a mRNA in arrivo "nuove" nanoparticelle lipidiche

*Migliorare significa cambiare,
essere perfetti significa cambiare spesso.*
Winston Churchill

Conosciute come **nanoparticelle lipidiche (LNP)**, queste minuscole bolle di grasso racchiudono l'RNA messaggero (mRNA) che codifica per una proteina virale, aiutandola a traghettarla nelle cellule e proteggerla dagli enzimi distruttivi.

Questa tecnologia è stata la chiave del successo dei vaccini COVID-19 di **Moderna** e della collaborazione **Pfizer-BioNTech**. Ma per quanto "risolutivi" possano sembrare questi *carrier lipidici* c'è ancora un ampio margine di miglioramento della loro efficienza.

Le **nanoparticelle** sono, purtroppo, una delle principali fonti degli **effetti collaterali** indesiderati quando si diffondono nel corpo, provocando dolori e infiammazioni che molte persone accusano in seguito alla vaccinazione.

La loro funzione è quella di veicolare il loro carico una volta all'interno delle cellule, un passaggio indispensabile affinché il *macchinario per la produzione di proteine* trasformi le sequenze di **mRNA** in segnali di innesco immunitario. E poiché all'interno della cellula la temperatura le surriscalda fino a disgregarsi producendo **frammenti flogogeni** che diffondono dalla cellula nell'intero organismo. Per questo devono essere conservate a basse temperature, limitandone così l'uso globale.

Una nuova generazione di **LNP**, con maggiore potenza e minori effetti collaterali, maggiore stabilità è attualmente in fase di sviluppo presso le grandi *startup farmaceutiche* e biotecnologiche. Queste nuove **nanoparticelle** potrebbero portare a produrre migliori vaccini **mRNA** non solo per il COVID-19 ma utilizzabili per altre patologie. Potrebbero aiutare l'**mRNA** a mantenere alte le aspettative di un strumento terapeutico strategico

Le prime **LNP** sono stati utilizzate circa 20 anni fa per trasportare farmaci per il *silenzamento genico* nelle cellule. In seguito i quattro componenti lipidici delle **LNP** sono stati adattati per veicolare **mRNA** per la correzione della malattia nelle cellule difettose. Nella attuale pandemia vengono utilizzati con differenti modalità nei vaccini **Moderna** e **Pfizer**

All'inizio di quest'anno è emerso un indizio importante quando gli scienziati della **Genentech** hanno dimostrato che le **nanoparticelle** attivano un particolare **percorso infiammatorio**. Infatti l'asse **dell'interleuchina-1**, che è fondamentale per generare risposte immunitarie protettive, può anche stimolare effetti collaterali.

Tra le **LNP** testate, **SM-102**, un lipide "ionizzabile" che aiuta a legare e impacchettare l'**mRNA** alle LNP, si è dimostrato un **forte attivatore flogistico**.

In dettaglio: *L'asse "antagonista del recettore dell'interleuchina 1 (IL-1)-interleuchina 1 (IL-1ra)" regola l'infiammazione sistemica mediata dal vaccino in modo specifico per l'ospite. Nelle cellule*

immunitarie umane, i vaccini a RNA inducono la produzione di citochine IL-1, prevalentemente IL-1 β , che dipende sia dall'RNA che dalla formulazione lipidica. IL-1 a sua volta innesca l'induzione dell'ampio spettro di citochine pro-infiammatorie (compresa IL-6). A differenza degli esseri umani, i leucociti murini rispondono ai vaccini a RNA sovraregolando IL-1ra antinfiammatorio rispetto a IL-1 (prevalentemente IL-1 α), proteggendo i topi dalle tossicità mediate dalle citochine a >1, Dosi di vaccino 000 volte superiori.

Pertanto, la via IL-1 svolge un ruolo chiave nell'innescare la segnalazione innata associata al vaccino RNA, un effetto che è stato inaspettatamente amplificato da alcuni lipidi utilizzati nelle formulazioni del vaccino che incorporano l'RNA N1-metil-pseudouridina modificato per ridurre l'attivazione del recettore Toll-like segnalazione.

Per aumentare la potenza del vaccino e limitarne gli effetti collaterali, i ricercatori stanno modificando ciascuno dei quattro ingredienti che compongono le **nanoparticelle lipidiche**.

Ogni particella incorpora **lipidi ionizzabili** che legano l'**RNA messaggero (mRNA)** e spostano la loro carica da positiva a neutra una volta all'interno della cellula limitandone la tossicità potenziale.

Gli altri tre tipi di grassi contribuiscono alla sua struttura e stabilità. Questi lipidi "ausiliari" aiutano favoriscono la fusione delle particelle con le cellule, in particolare il **colesterolo** le aiuta a "fuggire" dagli **endosomi cellulari** mentre i lipidi legati al **polietilenglicole (PEG)** impediscono loro di aggregarsi prolungandone la loro azione.

Dan Peer, biochimico *dell'Università di Tel Aviv* e co-fondatore della startup che produce vaccini **NeoVac**, ha sviluppato librerie di nuovi **lipidi ionizzabili** con strutture atipiche. Questi, in esperimenti non pubblicati, sembrano consentire migliori vaccini **mRNA** con minori effetti collaterali e con una maggiore stabilità a temperatura ambiente.

Altri miglioramenti potrebbero derivare dall'aumento dell'assorbimento di **LNP** nelle cellule e quindi dal miglioramento della loro capacità di liberarsi dagli endosomi che le trasportano all'interno. La stragrande maggioranza degli **LNP** rimane intrappolata in queste vescicole e quindi distrutta o espulsa senza fornire il carico utile del vaccino, il che significa che c'è un'enorme quantità di RNA che non viene utilizzata.

La forma dei lipidi ionizzabili influisce sulla capacità di un **LNP** di distruggere un **endosoma**, così come il colesterolo, uno degli altri grassi negli **LNP**.

Dal lavoro congiunto dei ricercatori di **Moderna e Sahay** si è potuto dimostrare che l'uso di **diverse forme di colesterolo** può aumentare i tassi di fuga di **LNP** dall'intrappolamento endosomiale (Patel S,2020)

In dettaglio: *L'analisi struttura-attività degli analoghi del colesterolo rivela che l'incorporazione di fitosteroli alchilici C-24 negli LNP (eLNP) migliora la trasfezione genica e la lunghezza della coda alchilica, la flessibilità dell'anello sterico e la polarità dovuta al gruppo -OH è necessaria per mantenere un'elevata trasfezione .*

Cryo-TEM mostra una forma poliedrica per gli eLNP rispetto agli LNP sferici, mentre la dispersione dei raggi X mostra poche disparità nella struttura interna. Gli eLNP mostrano un maggiore assorbimento e ritenzione cellulare, portando potenzialmente a un rilascio costante dagli endosomi nel tempo. Il monitoraggio 3D di singole particelle mostra una maggiore diffusività intracellulare degli eLNP rispetto agli LNP, suggerendo il traffico eLNP verso percorsi produttivi per la fuga.

L'obiettivo attuale dei ricercatori ora è progettare **lipidi ionizzabili** che attivino percorsi immunitari favorevoli senza sovrastimolare quelli dannosi.

Prima della sua morte a marzo, **Michael Buschmann** della *George Mason University* ha guidato il team che nel 2021 ha dimostrato come la carica elettrica delle **LNP** sia fondamentale per il successo del vaccino (Carrasco MJ 2021)

Infatti una *carica negativa* rende meno probabile che la particella rimanga nei muscoli e nei linfonodi, dove potrebbe suscitare risposte immunitarie benefiche; tende invece a diffondersi ampiamente, aumentando tuttavia il rischio di febbri, brividi e altre reazioni avverse.

Per creare una **nanoparticella** con carica meno negativa, i ricercatori hanno ottimizzato la chimica del **lipide ionizzabile**. Quando è stato formulato in un vaccino mRNA per COVID-19, il **nuovo vettore LNP** ha spinto i topi a produrre anticorpi più protettivi rispetto ai sistemi di rilascio convenzionali e ha avuto meno effetti collaterali, secondo i dati pubblicati l'anno scorso in forma di pre stampa e ora in fase di revisione su *Nature Communications* .

Sanofi ha iniziato a valutare alcune delle sue **LNP personalizzate** in test condotto sull'uomo. In uno studio lanciato nel 2021, ad esempio, l'azienda ha valutato due opzioni LNP per somministrare un vaccino antinfluenzale a **mRNA** che sta sviluppando. Secondo i dati preliminari, una formulazione lipidica si è rivelata migliore nell'attivare l'immunità anti.influenzale. Ma lo stesso **LNP** ha anche provocato **effetti collaterali** più frequenti a dosi più elevate.

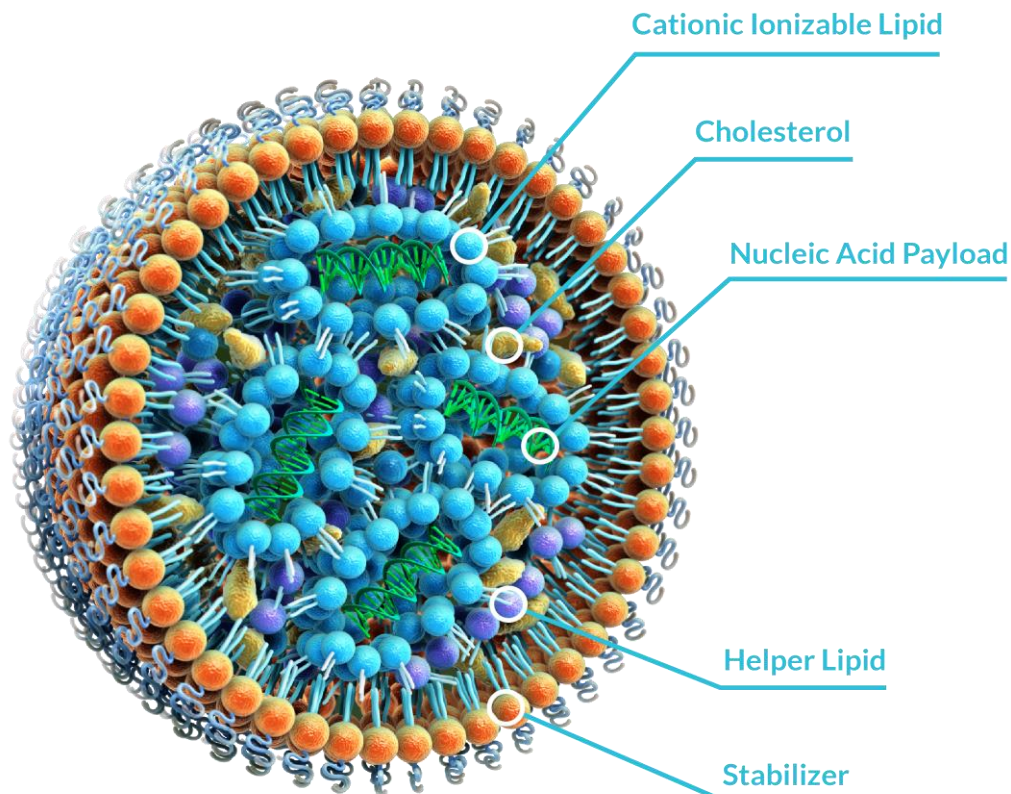
Altre aziende, tra cui **BioNTech** e **Arcturus Therapeutics**, hanno iniziato a esplorare modalità per eliminare il **polietilenglicole**, che aiuta a stabilizzare le **LNP** ma è stato anche collegato ad alcuni tipi di reazioni negative al vaccino.

Molte altre aziende, nel frattempo, si concentrano sull'ottimizzazione dei lipidi per fornire mRNA per curare le malattie piuttosto che prevenirle. Ciò richiede l'ottenimento di **mRNA** che codificano le proteine correttive della malattia nelle cellule e nei tessuti precisi in cui sono necessari, non solo nel fegato, dove le attuali formulazioni di **LNP** tendono a finire dopo l'infusione.

L'accresciuta attenzione alle tecnologie **LNP**, insieme ai profitti raccolti dai vaccini COVID-19, ha scatenato un aumento del contenzioso.

Alnylam, che ha contribuito a sviluppare il primo farmaco approvato fornito in un **LNP**, un farmaco per il silenziamento genico commercializzato dal 2018 per il trattamento di una rara malattia neurodegenerativa, afferma che i suoi brevetti fondamentali coprono i componenti lipidici dei vaccini **Moderna** e **Pfizer-BioNTech**.

E **Arbutus BioPharma**, una azienda canadese chiede il risarcimento dei danni a **Moderna** per presunta violazione di un brevetto che copre **LNP** comprendenti determinati rapporti di lipidi. Ma è improbabile che queste controversie sulla proprietà intellettuale abbiano un effetto rilevante sull'innovazione **LNP**:ci sono troppi soldi in gioco.



A chi legge

Molti dati sono del report di Elie Dolgin [Science](#), Vol 376, Issue 6594.

Riferimenti

- Patel S et al. **Naturally-occurring cholesterol analogues in lipid nanoparticles induce polymorphic shape and enhance intracellular delivery of mRNA.** *Nat Commun.* 2020 Feb 20;11(1):983.
- Carrasco MJ et al. **Ionization and structural properties of mRNA lipid nanoparticles influence expression in intramuscular and intravascular administration.** *Commun Biol.* 2021 Aug 11;4(1):956.
- Tahtinen S et al. **IL-1 and IL-1ra are key regulators of the inflammatory response to RNA vaccines.** *Nat Immunol.* 2022 Apr;23(4):532-542.

Un anno fa... Baedeker/Replay del 17 Maggio 2021

Semaforo verde (giallo?) ai test salivari rapidi

La saliva è un biofluido la cui origine anatomica e la cui posizione è di particolare rilevanza strategica per la trasmissione e il monitoraggio di COVID-19. Paradossalmente la saliva può essere considerata come nemico (una modalità comune di trasmissione virale tramite goccioline salivari e potenzialmente aerosol) sia come amico (come strumento diagnostico non invasivo per il rilevamento virale e la sorveglianza dello stato immunitario) nella lotta contro COVID-19 . (Han P 2020). Poiché la saliva può ospitare diversi virus tra cui SARSCoV-2, la possibilità di trasmissione di virus attraverso la saliva, in particolare quelli che causano infezioni respiratorie, è inevitabile. Va

tuttavia ricordato che non solo la saliva offre una nicchia ecologica per la colonizzazione e lo sviluppo di microrganismi orali, ma impedisce anche la crescita eccessiva di particolari patogeni come i fattori virali.(Baghizadeh Fini M 2020). SARS-CoV-2 si diffonde principalmente con tosse, starnuti, inalazione di goccioline e contatto, rendendo la saliva una potenziale via di trasmissione per COVID-19. (Li Y 2020). La saliva orofaringea posteriore va distinta dalla saliva orale, poiché la prima fa parte delle secrezioni respiratorie, mentre la seconda è prodotta dalle ghiandole salivari, che si trovano al di fuori delle vie respiratorie. La saliva può essere analizzata mediante test standard (rRT-PCR) o rapidi di biologia molecolare (rRT-PCR diretta senza estrazione), sebbene, in ambiente ospedaliero, queste procedure possano essere eseguite solo in aggiunta ai tamponi rinofaringei per ridurre al minimo l'incidenza di falsi risultati negativi. Al contrario, il ruolo promettente della saliva nella diagnosi dell'infezione da SARS-CoV-2 è evidenziato dall'emergere di tecnologie point-of-care e, cosa più importante, di dispositivi point-of-need. In effetti, questi dispositivi possono essere utilizzati direttamente nei luoghi di lavoro, aeroporti, scuole, cinema e centri commerciali.

Un esempio è il Rapid Salivary Test, recentemente descritto, un test dell'antigene basato sul test a flusso laterale, che rileva la presenza del virus identificando la proteina spike nella saliva entro pochi minuti. Vedi Sezione NEWS: Cosa significa veramente scoprire di essere sars-cov-2 “positivo”
A partire dal 15 aprile 2020, la Food and Drug Administration statunitense ha concesso l'autorizzazione all'uso di emergenza per un primo test della saliva per la diagnosi di infezione da coronavirus 2 della sindrome respiratoria acuta grave, il dispositivo sviluppato dal laboratorio RUCDR Infinite Biologics, Rutgers University. Una caratteristica chiave che distingue il test basato sulla saliva dai tamponi nasofaringei o orofaringei (faringei) è che questo kit consente l'autoraccolta e può evitare che gli operatori sanitari siano a rischio durante la raccolta di campioni rinofaringei o orofaringei, preservando così l'equipaggiamento di protezione personale per l'uso in cura del paziente piuttosto che campionamento e analisi. Di conseguenza, test più ampi rispetto agli attuali metodi di tamponi nasali o faringei aumenteranno significativamente il numero di persone che effettuano lo screening, portando a un controllo più efficace della diffusione di COVID-19. Tuttavia, è necessario un confronto del test basato sulla saliva con l'attuale test del tampone per capire cosa e come possiamo trarre vantaggio da questo test di nuova concezione. (Hung KF 2020). Una prima risposta possiamo averla da una minuziosa “analisi delle meta analisi” disponibili attualmente.

Ad oggi ho personalmente selezionato tre meta analisi che hanno utilizzato criteri differenti ed originali

(per continuare vai alla stesura integrale)