

SARS-CoV-2 e la nuova era dei vaccini

Parte I: Introduzione sulle tipologie dei vaccini e sui loro meccanismi di azione

Chiara Puricelli^{1,2}, Benedetta Carnaghi², Umberto Dianzani^{1,2}, Roberta Rolla^{1,2}

¹Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara

²Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara

ABSTRACT

SARS-CoV-2 and the new era of vaccines

Part I: Introduction to the available vaccine platforms and their mechanism of action.

The introduction of vaccination programs aiming at inducing an active immune response against pathogens dates back to the first experimental approaches at the end of the 18th century and, since then, has represented a turning point in public health measures to contrast infections. The scientific improvements of the last few years in the field of molecular biology, immunology and genetic engineering have allowed to design new vaccines able to solve, at least in part, the hurdles of conventional vaccine platforms. From the first vaccines based on the inoculation of the whole microorganism, the scientific research has gone in the direction of platforms able to carry only a few or even a single antigenic component of the pathogen, ranging from subunit vaccines to those based on mRNA or DNA. This achievement has made vaccines easier and quicker to develop and, above all, much safer, and it has involved scientific fields that extend far beyond the attempt to fight infectious diseases, such as cancer research. The purpose of this review is to present an overview of the currently available vaccine platforms, their mechanism of action, and the advantages and pitfalls behind each approach.

Parole chiave: vaccini a DNA, vaccini a mRNA, SARS-CoV-2

INTRODUZIONE

L'immunologia moderna si è sviluppata dal successo ottenuto dal vaccino di Jenner contro il vaiolo alla fine del '700 e dal lavoro sistematico sviluppato circa un secolo dopo da Pasteur su numerosi agenti infettivi, partendo dal colera dei polli. Il più grande trionfo è stata l'eradicazione del vaiolo annunciata dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1979 (1).

Le vaccinazioni rappresentano il principale strumento di sanità pubblica per la prevenzione ed il controllo delle malattie infettive e l'intervento medico a basso costo maggiormente efficace nel ridurre il carico di malattie infettive e morte nel mondo. Negli ultimi 100 anni l'aspettativa di vita è notevolmente aumentata, passando da una media di 40 anni ad una di 80 anni. Alla

base di questo cambiamento vi è indubbiamente il contributo dei vaccini (2). Essi, infatti, rappresentano una misura di prevenzione non solo per il singolo, ma per tutta la comunità, in quanto l'immunizzazione di un elevato numero di persone contro uno specifico agente patogeno (detta immunità di gregge) impedisce al microorganismo di trasmettersi, fino alla sua scomparsa definitiva, se l'unico ospite è l'uomo.

Le basi immunologiche della vaccinazione

Le prime linee di difesa contro le infezioni sono rappresentate da barriere fisiche e chimiche come le proteine antimicrobiche secrete a livello delle superfici delle mucose. I microrganismi che riescono a superare queste difese entrano in contatto con cellule e molecole

Corrispondenza a: Chiara Puricelli, Laboratorio di Biochimica Clinica, Azienda Ospedaliero Universitaria "Maggiore della Carità" di Novara; Università degli Studi del Piemonte Orientale "Amedeo Avogadro", Dipartimento di Scienze della Salute, Novara.
E-mail chiarap92@alice.it

Ricevuto: 26.07.2021

Revisionato: 10.09.2021

Accettato: 15.09.2021

Publicato on-line: 01.10.2021

DOI: 10.19186/BC_2021.064

dell'ospite che organizzano una risposta immunitaria innata immediata. I macrofagi che si trovano nei tessuti, per esempio, riconoscono batteri e virus tramite recettori che legano molecole comuni a molti patogeni dette "spettri molecolari associati ai patogeni" (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMP). Tra questi, i Toll-Like Receptors (TLR) costituiscono la famiglia più importante. Il legame a tali recettori stimola il macrofago a fagocitare e degradare il microrganismo e a secernere citochine e chemochine (citochine chemotattiche), che trasmettono importanti segnali ad altre cellule immunitarie, attivando in questo modo il processo di infiammazione. Tra le principali citochine che vengono rilasciate dai macrofagi, il fattore di necrosi tumorale (TNF- α), l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 6 (IL-6) contribuiscono alla difesa dell'ospite in vari modi, quali l'innalzamento della temperatura corporea: a temperature più elevate, infatti, la replicazione di virus e batteri è meno efficiente. Inoltre, le citochine hanno un ruolo fondamentale nel modulare la risposta di fase acuta a livello epatico che permette la produzione di numerose proteine difensive dell'immunità innata. Gli interferoni (INF- α e INF- β) sono invece proteine antivirali, che inducono resistenza alla replicazione virale in tutte le cellule e potenziano l'azione delle cellule Natural Killer (NK), che a loro volta attaccano quelle infettate da virus. L'infiammazione locale e la fagocitosi dei batteri, infine, vedono coinvolte anche le proteine del complemento (1).

Nella maggior parte dei casi, i meccanismi sopra descritti portano all'uccisione degli agenti patogeni ed al conseguente contenimento dell'invasione microbica. Tuttavia, quando questi meccanismi risultano insufficienti, entrano in gioco i linfociti, che avviano la risposta immunitaria adattativa o specifica. I linfociti B maturano nel midollo osseo e sono la fonte degli anticorpi circolanti. Essi riconoscono un'ampia varietà di antigeni grazie al legame con recettori proteici specializzati, le immunoglobuline (Ig), inizialmente espresse come recettori di membrana, ma in seguito prodotte in forma solubile dopo l'attivazione del linfocita e la sua differenziazione in plasmacellula. I linfociti T maturano nel timo e riconoscono gli antigeni, prevalentemente proteici, presentati dalle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (Major Histocompatibility Complex, MHC) sulle cellule infettate o sulle cellule presentanti l'antigene (Antigen Presenting Cells, APC), grazie al recettore dei linfociti T (T-Cell-Receptor, TCR). Le APC captano l'antigene e lo suddividono in piccoli peptidi di 10-20 aminoacidi (processazione dell'antigene). Ciascun peptide è quindi associato a una molecola MHC che è espressa sulla membrana della APC in modo da poter presentare il peptide al linfocita T (1).

L'attivazione del linfocita T richiede sempre che l'antigene sia riconosciuto in un contesto infiammatorio. Sono quindi necessari segnali co-stimolatori che, associati all'interazione tra il TCR e l'antigene, inducono l'attivazione del linfocita T e la sua differenziazione prevalentemente in linfocita T helper CD4+, in grado di

sostenere e potenziare l'attività dell'immunità innata e adattativa, e in linfocita T citotossico CD8+, che riconosce e uccide le cellule infettate. La via di co-stimolazione meglio caratterizzata coinvolge la molecola di membrana CD28, che lega le molecole B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86) espresse dalle APC attivate nel corso dell'infiammazione. A loro volta i linfociti T attivati potranno trasmettere segnali co-stimolatori ai linfociti B permettendo la loro attivazione in seguito al riconoscimento dell'antigene tramite le Ig di membrana (1).

Una volta che l'agente infettivo è stato eliminato, una piccola popolazione di cellule specializzate, i linfociti di memoria, formati durante la risposta immunitaria adattativa, è in grado di persistere in assenza dell'antigene che li ha indotti in origine. La persistenza di queste popolazioni clonali di linfociti di memoria conferisce all'organismo la capacità di eliminare con estrema efficacia e rapidità una eventuale seconda infezione da parte dello stesso microrganismo patogeno. Questa protezione è una conseguenza della memoria immunologica ed è il meccanismo principale su cui si basa l'efficacia della vaccinazione. Lo scopo della vaccinazione è, infatti, la generazione di un'immunità contro un determinato patogeno che duri a lungo e sia protettiva grazie alla persistenza di un adeguato titolo anticorpale e alla produzione di cellule di memoria (1).

LA CLASSIFICAZIONE DEI VACCINI

In base alla tipologia della componente attiva, i vaccini possono essere classificati in tre gruppi principali: i vaccini tradizionali, costituiti da microrganismi interi, i vaccini costituiti da macromolecole purificate e i vaccini di nuova generazione. I vaccini costituiti da microrganismi interi possono contenere l'agente patogeno vivo attenuato, con ridotta patogenicità, oppure il microrganismo inattivato o ucciso.

Vaccini vivi attenuati

Sono generalmente prodotti da virus piuttosto che da batteri in quanto i virus contengono meno geni e l'attenuazione può essere controllata in modo più efficace (3). Solitamente, l'attenuazione del virus si ottiene facendolo crescere in colture di cellule non umane e, nel corso della selezione, la loro capacità di proliferare nelle cellule umane viene notevolmente ridotta. L'attenuazione può essere ottenuta più rapidamente con l'uso di tecniche del DNA ricombinante: se si può identificare un gene del virus necessario per la virulenza, ma non per la crescita o l'immunogenicità, questo gene può essere mutato ripetutamente o eliminato dal genoma. Poiché l'agente patogeno attenuato presenta gli stessi antigeni dell'agente patogeno originale, individui sani sviluppano risposte immunitarie paragonabili a quelle indotte dall'infezione naturale. Di conseguenza, questi vaccini inducono robuste risposte anticorpali e cellule-mediate e spesso conferiscono un'immunità a lungo termine dopo solo una o due dosi (3).

I vaccini attenuati presentano, tuttavia, alcune limitazioni. Una prima limitazione è il possibile sviluppo di retromutazioni che facciano riacquistare a questi ceppi la patogenicità. Inoltre la loro attenuazione può essere insufficiente per soggetti portatori di immunodeficienza, nei quali possono indurre infezioni simili a quelle del ceppo virulento (1).

Esempi di vaccini vivi attenuati attualmente autorizzati sono i vaccini contenenti i virus di morbillo, rosolia, parotite, varicella, febbre gialla, rotavirus, il vaccino antinfluenzale spray nasale, quello contenente il micobatterio della tubercolosi e il vaccino orale contro la poliomielite (Oral Polio Vaccine, OPV), sviluppato da Albert Sabin e ancora in uso in alcuni paesi in via di sviluppo (4-7).

Vaccini inattivati o uccisi

Vengono prodotti inattivando preparati di microrganismi interi usando perlopiù sostanze chimiche quali la formaldeide o altri agenti chelanti (3). Queste sostanze producono legami crociati tra le macromolecole, inattivando il patogeno ma senza alterare la sua struttura antigenica, in modo che il sistema immunitario possa comunque riconoscerlo ed eliminarlo. I vantaggi di questo approccio vaccinale rispetto a quello basato sull'attenuazione sono la stabilità e il sistema di conservazione. Tuttavia, questi vaccini possono essere meno efficaci in quanto inducono una risposta immunitaria di minore complessità e intensità.

Tra i vaccini inattivati ad oggi approvati, di particolare interesse sono quelli contenenti i virus di epatite A, il vaccino anti-poliomielite di Salk (Inactivated Polio Vaccine, IPV), il vaccino antinfluenzale definito "split" o "a virus frammentato" e il vaccino a cellule intere contro la pertosse, peraltro non più in uso da diversi anni e sostituito dal vaccino acellulare (4-6,8).

Vaccini costituiti da macromolecole purificate

Per la produzione di questi vaccini vengono utilizzate singole molecole del patogeno, quali tossoidi (o anatossine) e molecole di superficie. I vaccini ad anatossine/tossoidi sono costituiti da esotossine rilasciate dal microrganismo che svolgono un ruolo chiave nella sua patogenicità. Questa tipologia di vaccini viene realizzata detossificando la tossina mediante sostanze chimiche come la formaldeide. Le tossine inattivate non sono più patogene ma mantengono la capacità di indurre anticorpi neutralizzanti la tossina stessa (3). Esempi classici sono rappresentati dai vaccini contro la difterite e il tetano, la pertosse (acellulare), la meningite e il vaccino antinfluenzale definito "a subunità" (4). Gli antigeni purificati possono anche essere ottenuti con la tecnologia del DNA ricombinante, come nel caso del vaccino per l'epatite B.

L'espressione da parte di alcuni batteri di polisaccaridi di superficie con proprietà antigeniche, come nel caso di *Staphylococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* o *Neisseria meningitidis*, ha

inoltre permesso di sviluppare vaccini contenenti queste macromolecole in grado di indurre una risposta immunitaria. Il loro principale svantaggio è il fatto che gli antigeni polisaccaridici inducono una risposta adattativa piuttosto debole, prevalentemente mediata da IgM e quindi indipendente dai linfociti T. Le conseguenze sono una più breve durata della protezione garantita dal vaccino e una minore efficacia nei bambini al di sotto dei due anni, il cui sistema immunitario è ancora in fase di maturazione, soprattutto per quanto riguarda le risposte anticorpali T-indipendenti. Per questo motivo sono stati sviluppati i vaccini coniugati, in cui un carrier proteico come i tossoidi di *Corynebacterium diphtheriae* o *Clostridium tetani* veicolano il polisaccaride, inducendo una risposta anticorpale T-dipendente e aumentando l'immunogenicità del vaccino. Esempi di questa tipologia sono i vaccini anti-meningococco C, l'anti-pneumococcico 13-valente e quello contro *Haemophilus influenzae* (3,9).

Tra le forme più moderne dei vaccini a macromolecole purificate si trovano i vaccini a subunità proteica ricombinante. In questi ultimi, porzioni di DNA che codificano per un determinato antigene del patogeno vengono inserite in una cellula, di solito batterica, di lievito, di insetto o di mammifero, permettendo l'espressione della molecola di interesse, che verrà in seguito purificata.

Nel caso di antigeni virali, questa tecnica consente anche di creare vere e proprie particelle simili a un virus (Virus-Like Particles, VLP), formate da un guscio di antigeni virali privo del genoma al suo interno. Le VLP vengono prodotte *in vitro* e assomigliano al virus, ma sono prive del materiale genetico virale, quindi sono sicure e permettono di indurre una buona risposta immunitaria (10). Questa tecnologia è stata sviluppata per i vaccini contro l'epatite B, contro il meningococco B e contro il papillomavirus umano (4,11).

La recente evoluzione di tecnologie d'avanguardia e delle discipline "omiche" ha permesso lo sviluppo della cosiddetta "reverse vaccinology" che, grazie al supporto della bioinformatica, consente l'identificazione *in silico* di regioni genomiche del patogeno che rappresentano potenziali antigeni per lo sviluppo di un vaccino. Questo approccio ha permesso di superare le difficoltà nella prevenzione dell'infezione da meningococco B, caratterizzato da un'ampia variabilità dei suoi antigeni polisaccaridici e dalla loro somiglianza ad alcuni antigeni umani, con il rischio di reazioni crociate e autoimmuni (3,12).

Vaccini ricombinanti vivi, polivalenti, a DNA nudo

Grazie alla disponibilità di tecnologie innovative, queste tipologie di vaccini sono state sviluppate per poter fronteggiare in tempi brevi gravi epidemie.

I vaccini ricombinanti vivi sono basati sull'utilizzo di un microrganismo (virus o batterio) che funge da vettore per far esprimere geni di un patogeno diverso. Vettori virali derivati da retrovirus, Virus Herpes Simplex,

Adenovirus o Poxvirus sono stati sviluppati per la vaccinazione contro un'ampia gamma di patogeni (3). I vaccini a DNA nudo si basano sulla possibilità di far produrre direttamente alle cellule dell'individuo gli antigeni contro i quali si vuole indurre una risposta immunitaria trattando il soggetto direttamente con plasmidi di espressione.

Vaccini a DNA o a RNA messaggero

La vaccinazione a DNA o a RNA messaggero (mRNA) induce prevalentemente la produzione di anticorpi ma può permettere anche lo sviluppo dell'immunità cellulare mediata da linfociti T citotossici. Le piattaforme a base di acidi nucleici sono risultate alternative estremamente promettenti agli approcci vaccinali convenzionali. I vaccini a DNA e i vaccini a mRNA, infatti, oltre ad essere in grado di innescare l'immunità umorale e quella cellulare, presentano una produzione potenzialmente rapida ed economica.

Vaccini a DNA

I vaccini a DNA sono stati sperimentati con successo in modelli animali fin dall'inizio degli anni '90 con l'obiettivo di prevenire e trattare non solo malattie infettive e cancro con una vaccinazione classica, ma anche malattie autoimmuni e allergiche con una vaccinazione "inversa" o "tollerogena", mirata a bloccare la risposta immunitaria patologica che causa queste malattie (13). Alcuni di essi sono stati approvati dalla Food and Drug Administration (FDA) per uso veterinario (14). Al momento non sono stati ancora approvati vaccini a DNA per l'utilizzo nell'uomo, tuttavia, con l'emergere della pandemia da SARS-CoV-2, diversi vaccini a DNA sono attualmente in fase di sperimentazione clinica.

Questa tipologia di vaccini è costituita da plasmidi ingegnerizzati in modo tale da trasportare geni che codificano per uno o più antigeni di un determinato agente infettivo. L'espressione del gene di interesse è controllata da un promotore, spesso derivante da virus come il Cytomegalovirus (CMV) o il virus SV40 che, in generale, sono in grado di determinare una elevata espressione genica (15). Una volta all'interno delle cellule bersaglio (miociti, cheratinociti o APC come le cellule dendritiche), il plasmide è trascritto e tradotto con produzione nel citoplasma di antigeni non-self, che vengono processati e presentati ai linfociti oppure rilasciati in forma secreta o associati a vescicole extracellulari, quali esosomi o corpi apoptotici (14). Oltre a questa risposta immunitaria cellulare, viene indotta una risposta immunitaria umorale in seguito al riconoscimento dell'antigene da parte dei linfociti B tramite le Ig di membrana e alla co-stimolazione dei linfociti B da parte dei linfociti T helper CD4+ (Figura 1). I vaccini a DNA sono potenzialmente in grado di fornire un'immunità contemporaneamente contro patogeni differenti, in quanto i plasmidi possono essere ingegnerizzati in modo tale da trasportare geni codificanti antigeni appartenenti a ceppi diversi di uno

stesso patogeno (15).

La semplice produzione dei plasmidi offre a questi vaccini numerosi vantaggi rispetto ai vaccini convenzionali costituiti da microrganismi interi o da proteine. Innanzitutto, dal punto di vista della sicurezza, l'amplificazione degli acidi nucleici evita la necessità di manipolare direttamente agenti patogeni pericolosi. Inoltre il DNA plasmidico è stabile a temperatura ambiente e questo ne consente una facile conservazione. Infine, questi vaccini non comportano alcun rischio di reversione della patogenicità e la loro produzione industriale è relativamente poco costosa. D'altra parte, però, presentano due problematiche rilevanti. Da un lato non è possibile controllare la durata di espressione del plasmide, che può durare settimane o mesi, con il rischio teorico che la risposta vaccinale induca danni nel tessuto che viene a esprimere gli antigeni vaccinali e possibilmente anche malattie autoimmuni. Dall'altro lato esiste il rischio che il plasmide si integri nel DNA della cellula ospite causando mutazioni con conseguenze anche gravi, come descritto in alcuni casi di terapia genica nel passato (16,17). Questi rischi potenziali hanno frenato fino a oggi l'uso di questi vaccini nell'uomo, nonostante i positivi risultati ottenuti nell'animale, e hanno invece promosso lo sviluppo dei vaccini a mRNA.

Vaccini a mRNA

Sebbene i vaccini a mRNA siano stati testati per la prima volta all'inizio degli anni '90, il loro studio è rimasto in un primo momento limitato a causa delle preoccupazioni riguardanti la scarsa stabilità della molecola. Nel 1995 Ross et al. hanno dimostrato che la stabilità dell'mRNA poteva essere potenziata e migliorata (18). Da allora, gli studi su questa tipologia di vaccinazione si sono moltiplicati esponenzialmente. Negli ultimi anni, infatti, importanti investimenti tecnologici e di ricerca hanno permesso all'mRNA di diventare un promettente strumento terapeutico e di profilassi. Prima di dicembre 2020, nessun vaccino a base di mRNA era stato approvato per l'uso sull'essere umano, nonostante molti fossero gli studi clinici in corso, soprattutto in ambito oncologico (19). La pandemia di COVID-19 ha però stimolato la ricerca in questo campo, accelerando notevolmente le tempistiche dei tradizionali iter di sviluppo di un vaccino.

L'mRNA è una molecola a singolo filamento deputata a trasferire le informazioni genetiche, tramite il processo di trascrizione, dal DNA nucleare al citoplasma, dove verranno tradotte grazie ai ribosomi portando alla sintesi di proteine. È possibile classificare i vaccini a mRNA in due principali categorie: i vaccini a mRNA convenzionali e i vaccini a mRNA auto-amplificante (self-amplifying mRNA, SAM). Entrambi utilizzano il meccanismo di traduzione della cellula ospite per produrre l'antigene di interesse e innescare così una risposta immunitaria.

I vaccini a mRNA convenzionali sono costituiti da una molecola di mRNA non replicante (non-replicating mRNA, NMR), concettualmente simile alle molecole di

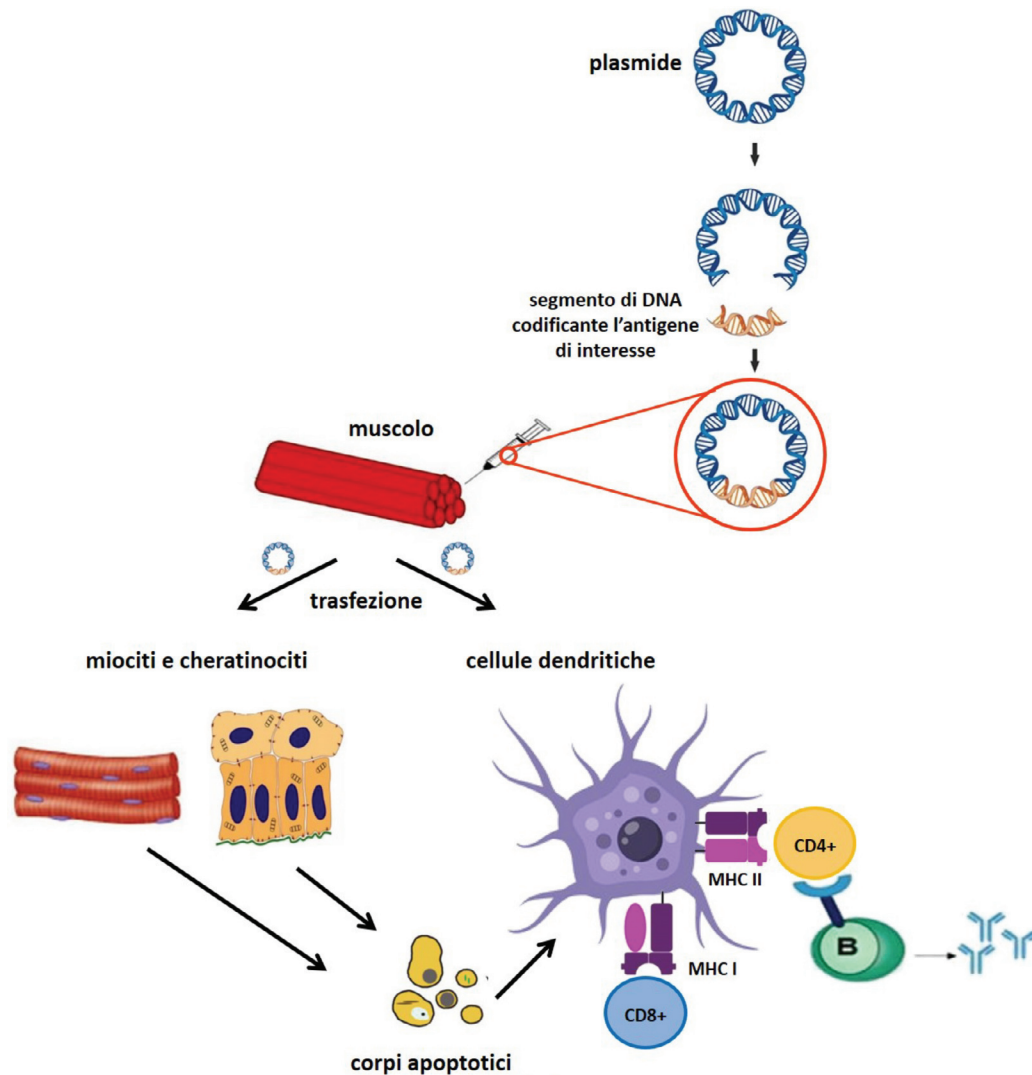


Figura 1

Meccanismo di azione dei vaccini a DNA.

Il segmento di DNA codificante l'antigene di interesse viene inserito all'interno di un plasmide che, dopo l'iniezione intramuscolare del vaccino, penetra nelle cellule (miociti, cheratinociti, cellule dendritiche) e, sfruttando il loro processo di trascrizione, porta alla sintesi della proteina antigenica da parte delle cellule stesse. Le cellule dendritiche processano ulteriormente la proteina e la presentano infine alle cellule dell'immunità adattativa come i linfociti T CD4+ e CD8+, stimolando una risposta umorale e cellulo-mediata. Gli antigeni espressi a partire dal plasmide possono raggiungere le cellule dendritiche anche indirettamente, attraverso corpi apoptotici o vescicole extracellulari rilasciati dalle altre cellule trasfettate.

CD, cluster di differenziazione; DNA, acido desossiribonucleico; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità.

mRNA della cellula ospite, che codifica solo per l'antigene di interesse. I vaccini a mRNA auto-amplificante, invece, contengono un costrutto che codifica non solo per l'antigene, ma anche per componenti replicative aggiuntive in grado di dirigere l'amplificazione dell'mRNA intracellulare (19,20). I vaccini costituiti da mRNA auto-amplificante esprimono livelli più elevati di proteine e persistono più a lungo rispetto all'mRNA non replicante (10). Possono essere sviluppati e prodotti in tempi rapidi e con costi limitati, soprattutto grazie alle elevate rese delle reazioni di

trascrizione *in vitro* (IVT).

Il meccanismo d'azione di questi vaccini è molto simile a quello dei vaccini a DNA, ma, rispetto a quest'ultimo, non comporta alcun rischio di integrazione nel genoma dell'ospite. Infatti, la molecola di mRNA viene tradotta direttamente nel citoplasma delle cellule e successivamente viene degradata per cui l'espressione dell'antigene è transitoria. Questa caratteristica riduce i possibili danni, immunologici e non, dovuti ad un'espressione protratta dell'antigene o degli adiuvanti e permette di evitare un'eccessiva stimolazione dei linfociti che potrebbe addirittura inibire la risposta immunitaria

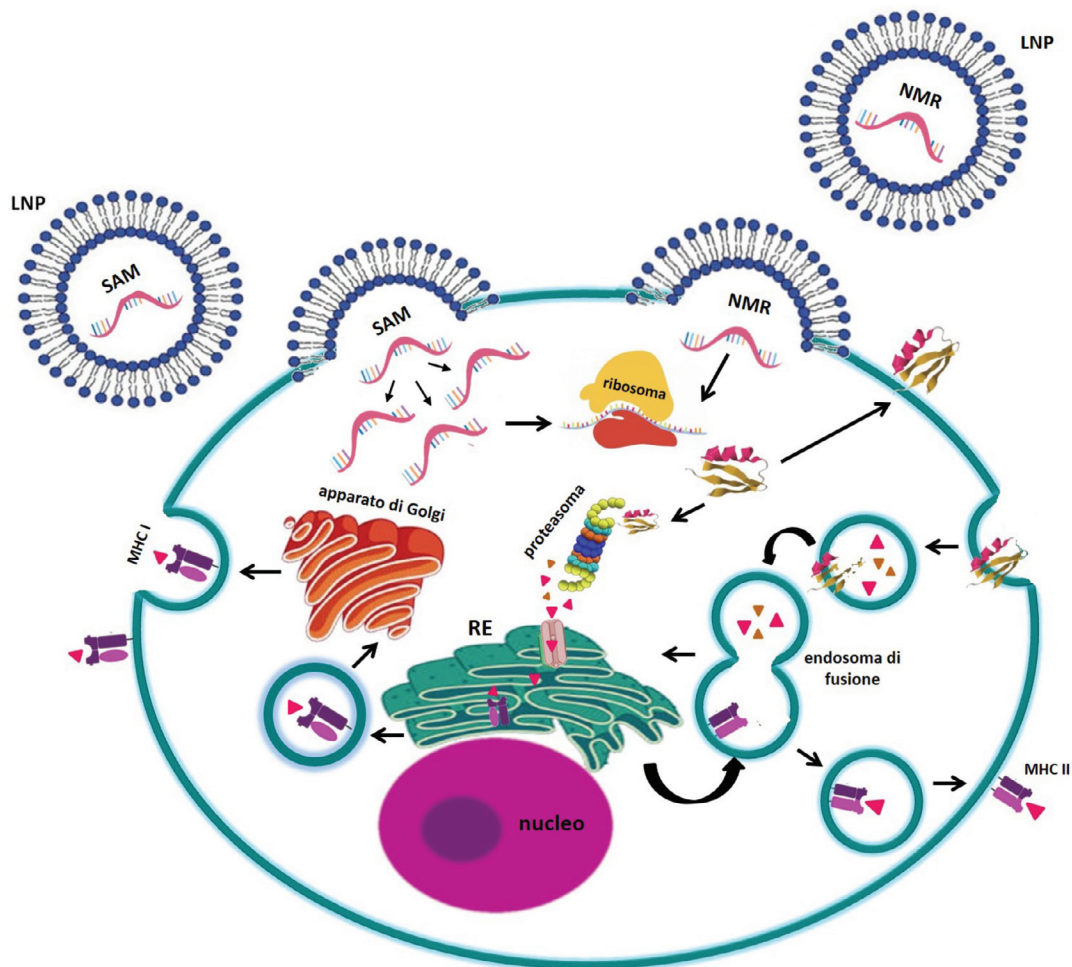


Figura 2

Meccanismo di azione dei vaccini a mRNA.

Rappresentazione delle due principali categorie di mRNA utilizzate nello sviluppo dei vaccini: l'mRNA non replicante e l'mRNA auto-amplificante. In questa figura le molecole di mRNA vengono somministrate complessate con nanoparticelle lipidiche. Dopo la fusione con la membrana plasmatica, l'mRNA viene rilasciato all'interno della cellula. Il SAM va incontro ad auto-amplificazione prima di interagire con i ribosomi e con l'RNA di trasferimento, mentre il NMR sfrutta direttamente il sistema di trascrizione della cellula. In seguito alla sintesi della proteina, questa verrà ulteriormente processata per essere infine esposta sulla superficie cellulare attraverso i complessi maggiori di istocompatibilità (MHC I e MHC II) per la presentazione dell'antigene alle cellule del sistema immunitario.

LNP, nano particella lipidica; MHC, complesso maggiore di istocompatibilità; mRNA, RNA messaggero; NMR, mRNA non replicante; RE, reticolo endoplasmatico; SAM, mRNA auto-amplificante.

(21) (Figura 2).

Per una migliore efficacia vaccinale, è spesso richiesto un sistema che veicoli nel tessuto la molecola di mRNA in maniera ottimale. I trasportatori a base di lipidi o polimeri, ad esempio, permettono di migliorare la captazione cellulare della molecola di RNA. In particolare, la metodologia più utilizzata nello sviluppo di vaccini a mRNA è basata sull'utilizzo di nanoparticelle lipidiche (LNP). Le LNP sono minuscole sfere lipidiche, di circa 100 nm, che possono incapsulare le molecole di RNA proteggendole dalla degradazione enzimatica e

favorendo la loro veicolazione nel citosol cellulare. Solitamente le LNP sono costituite da quattro componenti: un lipide cationico ionizzabile, che promuove l'autoassemblaggio in particelle delle dimensioni di un virus e consente il rilascio endosomiale dell'mRNA, polietilenglicole (PEG), che aumenta l'emivita della formulazione, colesterolo, come agente stabilizzante, e fosfolipidi. L'entità e la durata della produzione di proteine, innescata dai vaccini mRNA che utilizzano LNP, possono essere controllate variando la via di somministrazione del vaccino. È stato dimostrato

che l'iniezione intramuscolare e quella intradermica di mRNA-LNP assicurano un'espressione proteica più consistente rispetto alla somministrazione endovenosa (19).

Infine la maggior parte dei vaccini a mRNA richiede una rigorosa gestione della catena del freddo per quanto riguarda la loro conservazione ed il loro trasporto. Questa caratteristica rappresenta un ostacolo soprattutto nei paesi a scarso sviluppo tecnologico. A tal proposito, l'ottimizzazione della formulazione di vaccini a mRNA ha portato alla formulazione di vaccini termostabili. Un esempio è stato riportato da uno studio di Jones et al., in cui veniva utilizzata una formulazione liofilizzata con trealosio: l'mRNA così trattato è risultato stabile per almeno 10 mesi alla temperatura di 4 °C e in grado di indurre la produzione di alti livelli di proteine e l'innescare di un'immunità altamente efficace e di lunga durata (22).

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Murphy KM, Weaver C. *Janeway's immunobiology*. New York: Garland Science, 8^a ed. 2011.
- Rappuoli R, Santoni A, Mantovani A. Vaccines: an achievement of civilization, a human right, our health insurance for the future. *J Exp Med* 2019;216:7-9.
- Vetter V, Denizer G, Friedland LR, et al. Understanding modern-day vaccines: what you need to know. *Ann Med* 2018;50:110-120.
- Agenzia Italiana del Farmaco, <https://www.aifa.gov.it/> (ultimo accesso: giugno 2021).
- GPEI-Global Polio Eradication Initiative, <https://polioeradication.org/> (ultimo accesso: giugno 2021).
- World Health Organization. Polio vaccines: WHO position paper – March, 2016. *Wkly Epidemiol Rec* 2016;12:145-68.
- CDC, Live Attenuated Influenza Vaccine LAIV. The Nasal Spray Flu Vaccine. <https://www.cdc.gov/flu/prevent/nasalspray.htm> (ultimo accesso: giugno 2021).
- Fanget N. Pertussis: a tale of two vaccines. *Nature Milestones in vaccines*. Nature Publishing Group. 2020:S12.
- Zuccotti GV. *Manuale di Pediatria - La Pratica Clinica*. Bologna: Esculapio. 2^a ed. 2016.
- Tregoning JS, Brown ES, Cheeseman HM, et al. Vaccines for COVID-19. *Clin Exp Immunol* 2020;202:162-92.
- Cheng L, Wang Y, Du J. Human papillomavirus vaccines: An updated review. *Vaccines* 2020;8:1-15.
- Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: A decade of reverse vaccinology. *Clin Microbiol Infect* 2012;8:109-16.
- Cappellano G, Comi C, Chiocchetti A, et al. Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease. *Int J Mol Sci* 2019;20:204-19.
- Hobernik D, Bros M. DNA vaccines - How far from clinical use? *Int J Mol Sci*. 2018;19:3605.
- Lee J, Arun Kumar S, Jhan YY, et al. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater* 2018;80:31-47.
- Ura T, Okuda K, Shimada M. Developments in Viral Vector-Based Vaccines. *Vaccines* 2014;2:624-41.
- Myhr AI. DNA vaccines: Regulatory considerations and safety aspects. *Curr Issues Mol Biol* 2017;2:79-88.
- Ross J. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev* 1995;59:423-50.
- Pardi N, Hogan MJ, Porter FW, et al. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nat Rev Drug Discov* 2018;17:261-79.
- Jackson NAC, Kester KE, Casimiro D, et al. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *NPJ Vaccines* 2020;5:1-6.
- Iavarone C, O'hagan DT, Yu D, et al. Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Rev Vaccines* 2017;16:871-81.
- Jones KL, Drane D, Gowans EJ. Long-term storage of DNA-free RNA for use in vaccine studies. *Biotechniques* 2007;43:675-81.