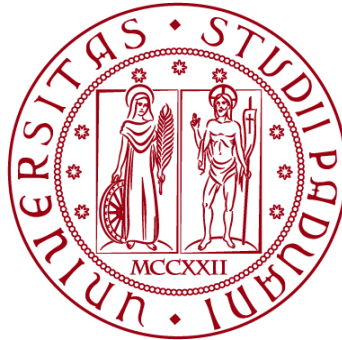


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**SISTEMI DI *DELIVERY* NEI VACCINI A mRNA: EVOLUZIONE
E PROSPETTIVE**

**Tutor: Prof. Emanuele Papini
Dipartimento di Scienze Biomediche
Università di Padova**

Laureanda: Alice Gaia Winnicki

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

| | |
|---|-----------|
| ABSTRACT | 1 |
| CAPITOLO 1 – STATO DELL’ARTE | 3 |
| 1.1 Terapie a mRNA: evoluzione e applicazioni | 3 |
| 1.2 I vantaggi dell’mRNA e sue ottimizzazioni | 4 |
| 1.3 Sistemi di <i>delivery</i> | 7 |
| CAPITOLO 2 – APPROCCIO SPERIMENTALE | 10 |
| 2.1 Introduzione | 10 |
| 2.2 Studio esemplificativo..... | 11 |
| 2.2.1 La malattia | 11 |
| 2.2.2 Il modello murino di OTCD | 13 |
| 2.2.3 Tecnologia di <i>delivery</i> | 13 |
| 2.2.4 Esperimenti e risultati..... | 15 |
| 2.2.5 Discussione..... | 22 |
| CAPITOLO 3 – CONCLUSIONI | 24 |
| BIBLIOGRAFIA | 26 |

ABSTRACT

Lo scoppio della pandemia da SARS-CoV-2 ha rappresentato l'evento catalizzante il più rapido sviluppo di vaccini nella storia, con i vaccini a mRNA a farne da padrone. La tecnologia dell'mRNA, in realtà, nasce oltre vent'anni fa, ma prima del 2020 non aveva ancora raggiunto l'applicazione clinica: oltre alla prevenzione delle malattie infettive, questa tecnica sembra avere il potenziale per trattare anche patologie neoplastiche e genetiche.

Nel presente articolo verrà inizialmente analizzata l'evoluzione della tecnologia dell'mRNA che ha portato agli attuali vaccini, con particolare attenzione al *design* dell'mRNA e ai sistemi di *delivery* della molecola terapeutica. Successivamente, verrà messo in evidenza il potenziale della terapia a mRNA per il trattamento di malattie croniche di origine genetica e non, in particolare di malattie metaboliche monogeniche rare, patologie tipicamente considerate incurabili in quanto prive di efficaci opzioni terapeutiche. A titolo esemplificativo, verrà presentato un esempio di approccio sperimentale preclinico per il trattamento del deficit di ornitina transcarbamilasi (OTCD) in un modello murino della malattia sfruttando una particolare tecnologia di *delivery* dell'mRNA chiamata *Hybrid mRNA Technology* (HMT).

CAPITOLO 1 – STATO DELL'ARTE

1.1 Terapie a mRNA: evoluzione e applicazioni

Dopo la sintesi del primo mRNA sintetico all'inizio degli anni '80, questa molecola è stata largamente studiata come potenziale agente terapeutico per una vasta gamma di patologie. Nonostante la pubblicazione dei primi esperimenti promettenti negli ultimi anni '80, l'RNA è stata considerata per molti anni una molecola troppo instabile e inadatta per una concreta applicazione terapeutica. La ricerca in tale ambito venne tuttavia portata avanti dalla biologa ungherese Katalin Karikò, l'attuale vicepresidente dell'azienda BioNTech, che iniziò a lavorare poi insieme all'immunologo americano Drew Weissman. Insieme, questi due scienziati sono attualmente considerati i pionieri dei vaccini a mRNA. Entrambi vedevano questa molecola come il futuro di tutte le applicazioni profilattiche e terapeutiche: Karikò era interessata all'utilizzo della tecnologia dell'mRNA per il trattamento della fibrosi cistica e dell'ictus, mentre il principale interesse di Weissman era quello di sviluppare un vaccino per il trattamento e la prevenzione dell'AIDS causata da HIV-1 [1].

I primi vaccini a mRNA vennero sviluppati contro i virus dell'influenza con genoma a *single-stranded* RNA, ma successivamente la stessa tecnologia è stata testata in ambito preclinico per la prevenzione o il trattamento di altre malattie infettive e soprattutto per l'immunoterapia del cancro, che divenne il filone di ricerca più battuto [1].

Con lo scoppio della pandemia da Covid-19 alla fine del 2019, la ricerca e i notevoli avanzamenti metodologici che erano stati ottenuti nel campo della tecnologia dell'mRNA per il trattamento dei tumori sono stati indirizzati verso lo sviluppo di un vaccino contro SARS-CoV-2. La necessità impellente di prevenire la diffusione del virus a livello mondiale è stato perciò l'evento catalizzante il più rapido sviluppo di vaccini nella storia, portando il vaccino a mRNA alla sua prima applicazione clinica nel 2020 [2].

La pandemia da Covid-19, quindi, se da un lato ha monopolizzato tutte le risorse nell'applicazione della tecnologia dell'mRNA per contrastare SARS-CoV-2, dall'altro ha permesso la messa a punto di varie ottimizzazioni per superare le limitazioni associate alla convenzionale terapia genica, permettendo la loro applicazione in un ampio spettro di malattie [3].

Infatti, oltre ai due filoni principali di applicazione della tecnologia dell'mRNA, ovvero le malattie infettive e il cancro, non deve essere sottovalutato il potenziale di questa tecnologia nella prevenzione e nel trattamento anche di disordini genetici (tra cui le malattie metaboliche rare) e malattie croniche. In questi casi, l'mRNA viene utilizzato nel cosiddetto *protein replacement*, ovvero l'mRNA terapeutico codifica per una proteina la cui assenza o down-regolazione è

responsabile della malattia, la quale può essere associata a difetti genetici e non genetici [3,4].

Alcuni esempi di disordini genetici per i quali sono in corso studi clinici e preclinici per il trattamento con mRNA modificato sintetico sono: l'emofilia B, un disordine della coagulazione dovuto all'assenza del fattore IX della coagulazione; la malattia di Fabry, causata da un deficit dell'enzima α -galattosidasi A; la fibrosi cistica, provocata da un difetto genetico nella regione codificante il canale ionico CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*); la sindrome di William-Beuren, dovuta ad una microdelezione nel cromosoma 7q11.23, che include il gene codificante l'elastina. Infine, sono comprese tutta una serie di malattie metaboliche genetiche rare, quali: l'acidemia propionica (PA), causata da una deficienza dell'enzima mitocondriale propionil-CoA carbossilasi; l'acidemia metilmalonica (MMA), dovuta ad una deficienza della metilmalonil-CoA-mutasi (MUT); la porfiria acuta intermittente (AIP), risultante da un deficit della porfobilinogeno deaminasi; il deficit di ornitina transcarbamilasi (OTCD), un enzima chiave del ciclo dell'urea [4].

Altri studi clinici e preclinici sono in corso per il trattamento di malattie autoimmuni come il diabete autoimmune, per il trattamento di malattie cardiovascolari come lo scompenso cardiaco, la restenosi aterosclerotica, la riperfusione post-ischemica e l'infarto miocardico, ma anche per la terapia di disordini muscolo-scheletrici come l'osteoartrite e difetti del tendine d'Achille e della fibrosi di fegato e polmoni [3].

1.2 I vantaggi dell'mRNA e sue ottimizzazioni

I vaccini a mRNA e in generale i vaccini basati su acidi nucleici sono considerati i vaccini di terza generazione, sviluppati a seguito dell'era dei vaccini a virus attenuati/inattivati e dei vaccini a subunità, definiti rispettivamente di prima e seconda generazione [5]. L'obiettivo dei vaccini a mRNA è quello di trasferire l'mRNA alle cellule in modo tale che sia l'organismo stesso in cui viene somministrato ad esprimere e produrre l'antigene codificato dall'RNA, inducendo una risposta immunitaria sia umorale che cellulo-mediata [5,6].

I vaccini ad acidi nucleici si suddividono in vaccini a mRNA e vaccini a DNA plasmidico e posseggono entrambi un elevato potenziale di sviluppo [5]. Tuttavia, l'mRNA possiede diversi vantaggi rispetto al DNA come molecola terapeutica: innanzitutto, è più efficace in quanto necessita semplicemente di entrare nel citoplasma dove è presente l'apparato traduzionale, al contrario del DNA che richiede di entrare nel nucleo [6]; l'mRNA è più sicuro poiché non comporta il rischio di integrazione genomica [7] e infine è più facile e veloce da produrre grazie al suo *design* flessibile, permettendo la messa a punto di un processo di produzione standardizzato su larga scala [2,6]. Inoltre, a differenza dei vaccini di prima e seconda generazione, il processo di produzione è *cell-free* [7] e l'mRNA è più preciso, perché esprimerà solo uno specifico antigene che indurrà a sua volta una risposta immunitaria specifica [6]. In più, l'espressione dell'antigene sarà

transiente dato che l'mRNA verrà degradato da processi cellulari entro un massimo di 2-3 giorni [6].

Esistono, tuttavia, delle problematiche collegate alla molecola di mRNA, ovvero: la sua bassa stabilità [5], l'elevata suscettibilità alla degradazione enzimatica da parte delle RNasi abbondanti nell'ambiente extracellulare, livelli di *uptake* cellulare di RNA nudo estremamente bassi e infine la sua intrinseca elevata immunogenicità [7]. Quest'ultima proprietà è dovuta alla capacità di *sensing* delle molecole di RNA a singolo e doppio filamento da parte dei recettori PRR¹ citoplasmatici ed endosomali dell'immunità innata. In particolare, quando l'RNA viene riconosciuto dai *Toll-like Receptors* (TLRs) o dai *RIG-I-like Receptors* (RLRs), questi attivano una via di trasduzione del segnale che porta i fattori di trascrizione NFκB e IRF3/IRF7 a traslocare nel nucleo e ad indurre l'espressione dei geni codificanti per gli interferoni di tipo I (IFN-α e IFN-β), insieme a citochine pro-infiammatorie come TNF-α, IL-6 e IL-12. Una volta secreti dalla cellula, gli interferoni si legheranno ai propri recettori sulla superficie delle cellule adiacenti, attivando la via di trasduzione del segnale mediata da JAK/STAT, che a sua volta attiverà l'espressione di più di 300 ISGs (*Interferon-Stimulated Genes*) che indurranno lo stato antivirale. Tra gli ISGs troviamo anche il gene codificante per la protein chinasi PKR, la quale fosforilando il fattore di inizio della traduzione eIF2α provoca una down-regolazione della traduzione. In questo modo, quindi, la traduzione dell'mRNA terapeutico verrebbe inibita e di conseguenza anche la sintesi dell'antigene immunogeno [7].

Tutti questi ostacoli possono però essere superati tramite l'ingegnerizzazione della molecola di mRNA (Figura 1). La molecola terapeutica viene prodotta tramite trascrizione *in vitro* (IVT, *in vitro transcription*) da una molecola di DNA plasmidico linearizzata codificante l'antigene di interesse, dando luogo ad una molecola di mRNA costituita da 5 parti principali: il 5'-cap, il 5'-UTR, la regione codificante l'antigene (ORF, *Open Reading Frame*), il 3'-UTR e la coda di poli(A) al 3' [2,8].

La stabilità dell'mRNA è strettamente collegata al 5'-cap [5]. Infatti, il cap protegge l'mRNA dall'attacco delle esonucleasi, previene il *sensing* da parte dell'immunità innata e stimola l'inizio della traduzione reclutando il fattore di inizio della traduzione eucariotico eIF4E [8]. Esistono 3 tipi di cap: il 5'-cap naturale eucariotico viene chiamato cap-0 e consiste in una 7-metilguanosina invertita legata al primo nucleotide dell'mRNA tramite un legame 5'-5' trifosfato; sono stati poi identificati altri due cap chiamati cap-1 e cap-2 che contengono ulteriori gruppi metili nel secondo o nel terzo ribonucleotide. Cap-1 e cap-2 vengono preferiti nel *design* della molecola di mRNA in quanto sono meno immunogenici di cap-0 [7].

¹ *Pattern Recognition Receptors*, ovvero recettori espressi dalle cellule dell'immunità innata che riconoscono pattern molecolari conservati tra i patogeni.

Anche le regioni UTR (*untranslated regions*), d'altra parte, giocano un ruolo fondamentale nella stabilità dell'mRNA, nella regolazione del suo esporto dal nucleo, nella regolazione dell'efficienza di traduzione e nella localizzazione subcellulare [8]. Diversi studi condotti allo scopo di migliorare la stabilità e prolungare l'emivita dell'mRNA hanno dimostrato che l'introduzione del 3'UTR dell' α -globina aumenta la stabilità della molecola, mentre l'introduzione degli UTR della β -globina al 3' (due copie testa-coda) e al 5' (una copia) aumenta l'efficienza di traduzione [5,8,9].

Per quanto riguarda la regione codificante (ORF), anche se non è così modificabile come lo sono le regioni non codificanti del trascritto, può essere ottimizzata tramite la cosiddetta *codon optimization*, ovvero per aumentare l'espressione proteica vengono sostituiti nella sequenza i codoni poco utilizzati con dei codoni più frequenti codificanti lo stesso amminoacido o con codoni (sempre sinonimi) che presentano una maggiore quantità di tRNA cellulari [2,9]. Anche un arricchimento nel contenuto di GC ha dimostrato di migliorare la traduzione e la stabilità dell'mRNA [9]. Inoltre, l'introduzione di nucleotidi modificati nella regione codificante dell'mRNA è considerato l'aspetto più rilevante che ha permesso l'avanzamento del campo delle terapie a mRNA [9]. Infatti, tutti gli mRNA endogeni contengono dei nucleotidi modificati e per questo motivo l'immunità innata si è evoluta per riconoscere RNA non modificati, segno distintivo di un'avvenuta infezione virale [2]. Questi *single-stranded* RNA virali vengono riconosciuti tramite alcuni tipi di recettori PRR come TLR-3, TLR-7, TLR-8 e RIG-I e dato che in particolare i TLR-7 e -8 si legano a regioni ricche in GU del trascritto, negli mRNA terapeutici vengono incluse uridine modificate oppure viene diminuito il contenuto in uridina [2]. I più frequenti nucleotidi modificati che vengono introdotti nella regione codificante per diminuirne l'immunogenicità sono la pseudouridina (Ψ), N1-metilpseudouridina (N1m Ψ), 2-tiouridina (s2U), 5-metilcitidina (m5C), 5-metiluridina (m5U) e N6-metiladenosina (m6A) [5,9]. La modificazione nucleotidica ha dimostrato anche di aumentare la stabilità della molecola e il tasso di traduzione [9].

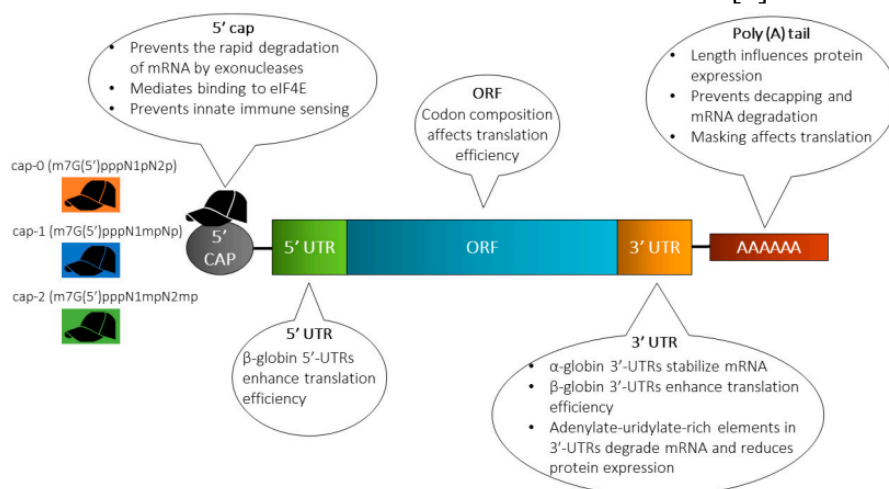


Figura 1. Struttura dell'IVT (*in vitro transcribed*) mRNA e principali modificazioni chimiche apportate.
Fonte: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>

Infine, la lunghezza della coda di poli(A) influenza l'efficienza di traduzione in quanto è necessaria una coda adeguatamente lunga per riuscire a circolarizzare l'mRNA tramite il legame delle PABPs (*PolyA Binding Proteins*) con il cap. È stato osservato che l'incremento della lunghezza della coda di poli(A) dell'IVT mRNA fino a 120 basi aumenta notevolmente il tasso di traduzione, mentre al di sopra di questo valore non si nota più alcun incremento. Inoltre, la coda di poli(A) tramite il legame al cap previene il *decapping* e quindi la degradazione dell'mRNA [8].

1.3 Sistemi di *delivery*

Come descritto nella precedente sezione, il *design* dell'mRNA ha consentito di superare tutta una serie di importanti limitazioni imposte dalla molecola stessa. Tuttavia, rimangono ancora delle problematiche da affrontare: l'mRNA nudo, una volta iniettato, ha un'emivita molto breve nel plasma data la sua elevata predisposizione alla degradazione enzimatica [8]. Inoltre, la sua carica negativa e le sue dimensioni relativamente grandi (300-5000 kDa) rendono difficile il passaggio dell'mRNA attraverso la membrana plasmatica cellulare (un doppio strato fosfolipidico, anch'esso carico negativamente) per raggiungere il citosol [5,6]. A dimostrazione di questo, la maggior parte delle cellule mostra livelli di *uptake* di mRNA nudo praticamente insignificanti [8].

Per queste ragioni, sono stati proposti nel tempo diversi sistemi di *delivery* che mirano ad aumentare la stabilità dell'mRNA *in vivo* dopo la somministrazione, a proteggerlo dall'attacco enzimatico, a facilitarne l'*uptake* cellulare, a mascherare la sua carica negativa, ma anche ad aumentare la risposta immune, la biocompatibilità e la biosicurezza [5,7,8].

Il *delivery* dell'mRNA può essere mediato da vettori virali e non-virali [5]. A seguito verrà presentata l'evoluzione dei sistemi di *delivery* non virali nel tempo, fino ad arrivare alle attuali nanoparticelle lipidiche utilizzate nei vaccini contro SARS-CoV-2, considerate al momento l'opzione tecnologica più all'avanguardia [5,6].

Il primo sistema di *delivery* dell'mRNA sviluppato all'inizio degli anni 2000 è la protamina, un insieme di piccole proteine cationiche ad elevato contenuto di arginina e lisina che grazie alla loro carica positiva formano un complesso con l'mRNA carico negativamente [7,10]. Questo complesso protamina-mRNA aumentava l'efficienza di trasfezione rispetto all'mRNA nudo, tuttavia inibiva in parte l'espressione proteica: per questo motivo, successivamente si è pensato di iniettare non solo il complesso mRNA-protamina (circa 250-350 nm) ma anche una miscela di mRNA libero (circa 50 nm) che permetteva di superare questo blocco della traduzione [7]. Questo approccio è stato utilizzato da CureVac per lo sviluppo di un vaccino a mRNA contro l'influenza A (2012) e contro la rabbia (2016) [10]. Durante i *clinical trial*, però, si registrarono alti tassi di reazioni

avverse, con un 97% di reazioni al sito di iniezione e un 78% di eventi avversi sistemici [7].

In seguito sono state sviluppate le nanoemulsioni cationiche (CNEs), ottenute combinando il lipide cationico DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilammonio propano) con un adiuvante chiamato MF59 contenente squalene, sorbitano trioleato e polisorbato 80 in una soluzione di citrato a pH 6.5 [7]. L'elemento essenziale di questo sistema è il lipide cationico DOTAP che grazie alle sue cariche positive è in grado di formare un complesso con l'mRNA carico negativamente. L'adiuvante MF59 è stato largamente studiato per lo sviluppo di un vaccino contro l'influenza durante la pandemia di influenza H1N1 nel 2009: questa molecola è risultata sicura e ben tollerata da bambini, adulti e anziani. Lo squalene di cui è composto, infatti, è naturalmente presente nell'uomo in quanto precursore del colesterolo, di conseguenza risulta sicuro, biocompatibile e biodegradabile. Le CNEs hanno dimensioni di circa 90-130 nm di diametro e aiutano non solo a veicolare l'mRNA ma anche a proteggerlo dall'attacco delle ribonucleasi [10].

Basandosi sullo stesso concetto, un altro gruppo ha creato poi i cosiddetti *Nanostructured Lipid Carriers* (NLCs), un sistema che è un ibrido tra le CNEs e le nanoparticelle lipidiche. In particolare, essi sono composti da una fase liquida oleosa come lo squalene e da una fase lipidica solida costituita da un trigliceride saturo. Questo sistema è stato utilizzato nel 2018 in uno studio preclinico, ottenendo nel topo titoli di anticorpi neutralizzanti protettivi contro un antigene immunogeno dello Zika virus [7].

Esiste poi la categoria dei sistemi di *delivery* polimerici e in particolare i polimeri cationici sono stati largamente testati negli ultimi decenni. Questi polimeri carichi positivamente vengono mescolati in eccesso con l'mRNA (carico negativamente) per formare dei complessi tenuti assieme da legami elettrostatici [7]. Alcuni esempi di questi sistemi sono la polietilammina (PEI), poli(L-lisina), DEAE-dextrano, chitosano, poli(β -ammino esteri) (PBAE) [7]. Nonostante questo sistema mostri una discreta efficacia *in vivo*, non è così avanzato nel *delivery* dell'acido nucleico come lo sono invece le nanoparticelle lipidiche [7]. Inoltre, il loro potenziale è compromesso dalla tossicità delle molecole polimeriche cationiche e dall'elevato indice di polidispersione (PDI) del complesso, ovvero una bassa uniformità di distribuzione dei pesi molecolari nel polimero [10].

Per quanto riguarda i sistemi di *delivery* basati su lipidi, bisogna ricordare che il primo metodo sviluppato nel 1987 per veicolare l'mRNA era un DOTAP (lipide cationico) quaternizzato e combinato con un DOPE (dioleoil-fosfatidiletanolammina) ionizzabile e fusogenico², un sistema che veniva utilizzato per la trasfezione del DNA. Nonostante la loro efficacia *in vitro*, questi

² Dopo l'*uptake* cellulare, all'interno dell'endosoma il DOPE viene protonato nell'ambiente acido, formando coppia ionica con fosfolipidi endosomali che destabilizzano la membrana e facilitano così il rilascio dell'mRNA dall'endosoma.

grandi complessi venivano rapidamente eliminati dalla circolazione, dando inoltre segni di tossicità [7].

Il precursore delle attuali nanoparticelle lipidiche (LNPs) è stato il cosiddetto *stabilized plasmid-lipid particle* (SPLP), costituito dalla combinazione di DOPE ionizzabile e fusogenico con un lipide cationico quaternizzato (DODAC, dioctadecil-dimetilammonio cloruro) che lega elettrostaticamente e circonda l'acido nucleico, il tutto ricoperto da PEG (polietilenglicole) idrofilico per stabilizzare la struttura nel mezzo acquoso e per limitare l'interazione con proteine e cellule dell'organismo a seguito della somministrazione [7]. Gli SPLPs sono stati poi ulteriormente migliorati dando origine agli *Stabilized Nucleic Acid Lipid Particles* (SNALPs) per il *delivery* di siRNA [7]. Questi sistemi, successivamente ottimizzati, hanno la stessa struttura delle attuali nanoparticelle lipidiche (LNPs) per il *delivery* dell'mRNA.

Come si può vedere dalla Figura 2, le LNPs (20-200 nm) sono costituite da quattro principali lipidi: un lipide ionizzabile nella forma sia carica positivamente che neutra, un fosfolipide (lipide zwitterionico) saturo come il DSPC a formare il doppio strato, colesterolo e un lipide legato al PEG [7,10].

Le LNPs incorporano un numero di copie di mRNA compreso tra 1 e 10 che vengono legate dai lipidi ionizzabili carichi positivamente che occupano la *core* della particella. I fosfolipidi come il DSPC costituiscono il doppio strato lipidico, con i lipidi PEG-iliati a costituire la superficie della particella e il colesterolo distribuito tra il doppio strato per stabilizzare la struttura. I lipidi ionizzabili neutri e carichi possono essere distribuiti non solo nel *core* ma anche lungo tutto il doppio strato lipidico [7,10].

I lipidi cationici ionizzabili sono quindi necessari per incapsulare e formare un complesso con l'mRNA tramite interazioni elettrostatiche, ma sono anche essenziali per un efficiente rilascio della molecola terapeutica nel citoplasma. Infatti, questi lipidi sono ingegnerizzati in modo tale da avere una pK_a^3 ottimale (idealmente compresa in un range tra 6 e 7) per il legame all'mRNA e il successivo rilascio dall'endosoma: modificando opportunamente questo parametro si fa in modo che a valori di pH maggiori della pK_a , quindi nella circolazione sanguigna, il lipide rimanga neutro, mentre a valori di pH inferiori alla pK_a , in particolare nell'ambiente endosomale ($pH \sim 6.5$), il lipide diventi

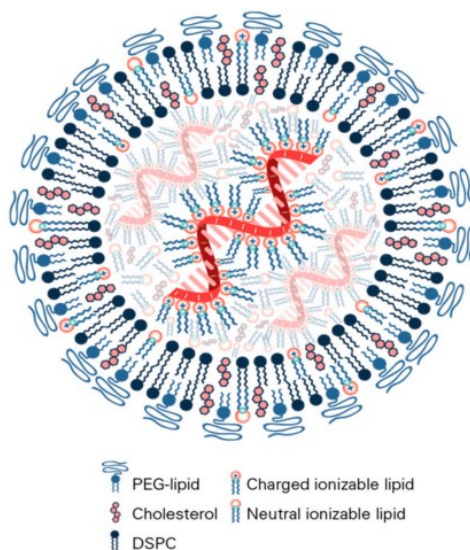


Figura 2. Struttura del complesso mRNA-nanoparticella lipidica.

Fonte: <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>

³ K_a = costante di dissociazione acida. $pK_a = -\log K_a$

protonato in modo da destabilizzare la membrana endosomale, facilitare la sua fusione e il rilascio dell'mRNA intatto nel citosol [10].

I fosfolipidi sono solitamente neutri e servono a conferire stabilità al doppio strato lipidico, giocando anche un ruolo nella biodistribuzione delle LNPs e nella fusione con la membrana endosomale durante l'*endosomal escape* [10]. Il colesterolo è un lipide neutro che incrementa la stabilità del doppio strato aumentandone la rigidità, prevenendo così la perdita della molecola terapeutica contenuta all'interno [10].

Infine, i lipidi legati al PEG posizionati sulla superficie della nanoparticella garantiscono stabilità colloidale al sistema, schermano eventuali cariche residue presenti sulla superficie e prevengono così l'interazione con proteine presenti nel sangue quali opsonine e cellule dell'immunità. In questo modo si riduce l'eliminazione delle LNPs dalla circolazione tramite il sistema reticolo-endoteliale, permettendo loro di rimanere in circolo più a lungo [10].

CAPITOLO 2 – APPROCCIO SPERIMENTALE

2.1 Introduzione

Come già discusso nella sezione 1.1, oltre al trattamento delle malattie infettive e del cancro, sta emergendo una nuova applicazione della tecnologia dell'mRNA per la terapia di malattie croniche di origine genetica e non. Nel campo dei disordini genetici mendeliani, l'mRNA viene utilizzato per la supplementazione di proteine non espresse, down-espresse o non funzionali attraverso una tecnica regolata e tessuto-specifica che viene chiamata "*protein replacement therapy*". Questo tipo di terapia potrebbe rappresentare una soluzione in particolare per il trattamento di malattie metaboliche genetiche rare in quanto attualmente mancano di efficaci opzioni terapeutiche [11].

Nella terapia del *protein replacement* il fegato è il principale target dell'mRNA data la sua funzione biologica nella sintesi di una grande varietà di macromolecole: questa proprietà può quindi essere sfruttata per over-esprimere anche proteine eterologhe. In alcuni casi per esplicare la sua funzione terapeutica la proteina dovrà rimanere negli epatociti; in altri casi, invece, le proteine dovranno essere secrete dal fegato per andare a svolgere la propria funzione in altri organi (la secrezione viene ottenuta attraverso l'inclusione di un peptide segnale nella sequenza della proteina). Il fegato può perciò essere visto come una sorta di 'fabbrica' di proteine per le terapie sistemiche che utilizzano l'mRNA, mentre rappresenta il vero e proprio target per le terapie a mRNA sviluppate per il trattamento di malattie metaboliche monogeniche [11].

Rispetto alla convenzionale terapia genica, un aspetto da considerare riguardo alla terapia basata su mRNA è che per definizione l'attività di questa molecola è transiente, non porta cioè ad una modificazione stabile del genoma. Questa espressione transiente, da una parte rappresenta un vantaggio in quanto previene il

rischio di genotossicità associato alla terapia genica, ma dall'altra rappresenta un potenziale svantaggio perché in questo modo diventano necessarie somministrazioni ripetute per il trattamento delle malattie croniche. Il trattamento cronico con l'mRNA mostra quindi la necessità di mantenere nel tempo livelli adeguati di proteina terapeutica, aspetto che si sta cercando di ottimizzare per ridurre al minimo la frequenza delle somministrazioni. Anche la diminuzione dell'immunogenicità dell'mRNA tramite un preciso *design* della molecola stessa è necessaria per consentire la ripetuta somministrazione evitando di stimolare eccessivamente la risposta immunitaria [11].

2.2 Studio esemplificativo

Di seguito viene riportato un esempio di approccio sperimentale per la terapia a mRNA di una malattia metabolica monogenica rara, il deficit di ornitina transcarbamilasi (OTCD, *ornithine transcarbamylase deficiency*). In questo studio condotto da Prieve *et al.*, “*Targeted mRNA therapy for ornithine transcarbamylase deficiency*” [12], viene descritto un nuovo sistema di *delivery* dell'mRNA basato su due tipi di nanoparticelle per effettuare la *intracellular enzyme replacement therapy* (i-ERT) utilizzando un modello murino di OTCD.

Il sistema di *delivery* dell'mRNA che è stato messo a punto dal gruppo di ricerca viene chiamato *Hybrid mRNA Technology delivery system* (HMT) e consiste di due componenti: una nanoparticella lipidica inerte che racchiude e protegge l'mRNA dalle esonucleasi del sangue, veicolando il complesso passivamente fino al fegato; una micella polimerica che targetta specificatamente gli epatociti e permette il rilascio dell'mRNA dall'endosoma. Questo sistema risulta molto efficace in quanto mostra elevati livelli di sintesi di ornitina transcarbamilasi (OTC) umana codificata dall'mRNA in modo tessuto-specifico (nel fegato), portando alla normalizzazione dei livelli di ammonio plasmatico e di acido orotico nelle urine, due prodotti del catabolismo che tipicamente si accumulano nei pazienti affetti da OTCD. Inoltre, il modello murino trattato con mRNA/HMT mostra una sopravvivenza prolungata.

L'HMT rappresenta quindi un metodo unico tra i sistemi non virali di *delivery* dell'mRNA, permettendo una somministrazione ripetuta e sistemica per il trattamento di disordini metabolici mendeliani.

2.2.1 La malattia

Il deficit di ornitina transcarbamilasi (OTCD, MIM 311250) è una malattia X-*linked* ed è il più frequente disordine congenito del ciclo dell'urea con una prevalenza di circa 6 affetti ogni 100 000 individui [11]. Come si può vedere dalla Figura 3, la patologia è causata dalla mancanza di un enzima chiave del ciclo dell'urea, l'ornitina transcarbamilasi (OTC), prevalentemente espressa nel fegato. Quest'organo è il principale responsabile della detossificazione dell'ammonio (un sottoprodotto del metabolismo proteico) e l'OTC mitocondriale ha il compito di catalizzare l'incorporazione del carbamil fosfato (coinvolto nella liberazione

dell'eccesso di azoto nel corpo) nel ciclo dell'urea [11]. Se questa funzione viene a mancare, i livelli di ammonio nel sangue aumentano notevolmente (iperammonemia), portando potenzialmente a danno neurologico, coma e addirittura morte [12]. Come conseguenza dell'assenza di OTC, i pazienti affetti da OTCD mostrano anche elevati livelli di acido orotico nelle urine [12].

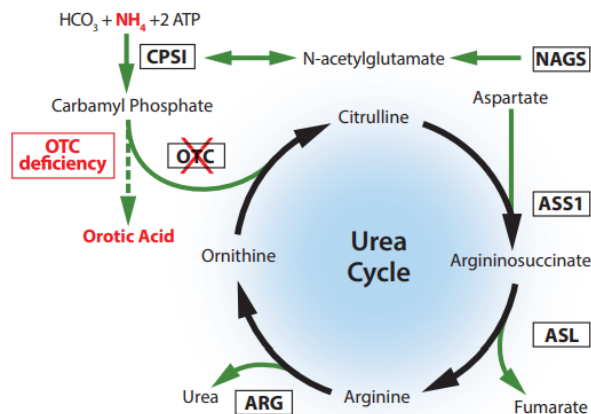


Figura 3. Schema del ciclo dell'urea nel deficit di OTC. I metaboliti che si accumulano in questa condizione patologica sono riportati in rosso. Le sigle riportate nei riquadri si riferiscono agli enzimi coinvolti: ARG, arginasi; ASL, argininosuccinato liasi; ASS1, argininosuccinato sintasi; CPSI, carbamylfosfato sintetasi; NAGS, N-acetilglutammato sintetasi. Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.jymthe.2017.12.024>

L'OTCD fa parte dei disordini metabolici ereditari (IMDs, *inherited metabolic disorders*), tipicamente causati da difetti in un singolo gene. Come per tutte le IMDs, solo limitate opzioni terapeutiche sono disponibili, tra cui una dieta ipoproteica da seguire per tutta la vita, la supplementazione di arginina e citrullina e gli *ammonia scavengers*⁴. Tutti questi trattamenti, tuttavia, non vanno ad agire sulla causa che sta alla base della malattia. Al contrario, le terapie basate su acidi nucleici rappresentano una promettente opzione terapeutica per le IMDs, come l'OTCD, in quanto sostituiscono l'enzima mancante o difettivo nella cellula affetta, portando alla 'correzione' della patologia [12].

A questo scopo, Prieve *et al.* [12] hanno sviluppato un sistema di *delivery* dell'mRNA per il trattamento delle IMDs. L'mRNA, infatti, come già accennato nelle precedenti sezioni, possiede diversi vantaggi rispetto al DNA plasmidico ma anche rispetto ai vettori virali: l'mRNA necessita di entrare solo nel citoplasma, non comporta il rischio di mutagenesi inserzionale e scongiura gli effetti avversi frequentemente associati ai metodi di *delivery* virali, come ad esempio l'epatite immuno-mediata. L'mRNA, inoltre, permette anche un controllo fine della farmacocinetica e del dosaggio, dal momento che non porta a cambiamenti irreversibili alla cellula o al genoma [12].

L'approccio che viene utilizzato è quindi quello dell'*intracellular enzyme replacement therapy* (i-ERT): al contrario della convenzionale ERT basata sulla veicolazione direttamente della proteina terapeutica, l'i-ERT veicola all'interno della cellula un mRNA sintetico che sfrutterà quindi la macchina traduzionale e post-traduzionale della cellula stessa per la sintesi della proteina terapeutica. Questo permette di evitare le complicazioni tipicamente associate alla somministrazione di proteine ricombinanti quali l'induzione di alti livelli di

⁴ Farmaci a base di sostanze quali sodio benzoato o sodio fenilacetato che aiutano il corpo a liberarsi dell'ammonio in quanto metabolita tossico.

anticorpi e la conseguente necessità di una lenta infusione della proteina terapeutica per più di 4 ore [12].

2.2.2 Il modello murino di OTCD

Per costruire un modello animale che riproducesse la malattia i ricercatori sono partiti da un modello murino chiamato *Otc^{spf-ash}* che possiede una mutazione R129H che causa uno splicing non efficiente, risultando in un'attività enzimatica residua dell'OTC pari al 5-10%. Allo scopo di creare un modello clinicamente rilevante che assomigliasse alla condizione umana, è stata poi indotta l'iperammonemia utilizzando un vettore virale adenoassociato (AAV) codificante

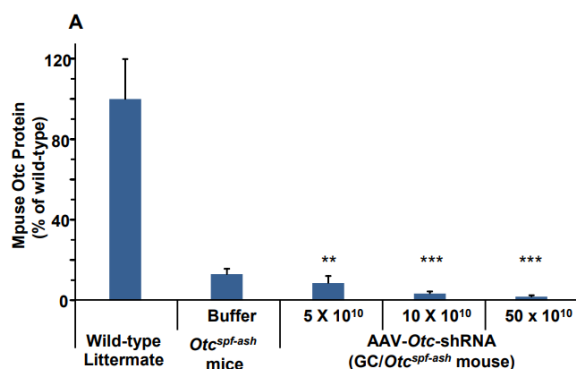


Figura 4. Sviluppo del modello murino di OTCD. Topi *Otc^{spf-ash}* sono stati trattati con un numero di copie di vettore (GC, genome copies) AAV- *Otc* shRNA pari a 5, 10 o 50 x 10¹⁰. I livelli di proteina *Otc* murina mostrano un knock-down dose-dipendente con dosi crescenti di vettore AAV in topi *Otc^{spf-ash}* in confronto ai topi di controllo trattati con buffer. Fonte: Supplemental Information, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

un *Otc* short hairpin RNA (shRNA) per effettuare un knock-down dell'OTC residua nel topo (Figura 4).

Come risultato, l'iperammonemia si sviluppa in pochi giorni e gli animali non trattati muoiono.

I biomarcatori che verranno considerati nel monitoraggio del modello murino di OTCD sono incrementi nei livelli di ammonio plasmatico e acido orotico nelle urine, nonché riduzioni nel peso corporeo e nel tasso di sopravvivenza.

2.2.3 Tecnologia di delivery

Il sistema di *delivery* sviluppato dal gruppo di ricerca prende il nome di HMT, ovvero *Hybrid mRNA Technology* e comprende due elementi (Figura 5A): una nanoparticella lipidica (LNP) inerte che protegge l'mRNA dall'attacco delle ribonucleasi presenti nel sangue e che trasporta passivamente l'acido nucleico fino al fegato, dove può penetrare attraverso l'endotelio discontinuo grazie alle dimensioni e alla carica del complesso; una micella polimerica che permette un indirizzamento specifico verso il fegato e facilita il rilascio dell'mRNA dall'endosoma al citoplasma.

La nanoparticella lipidica è composta da quattro lipidi principali: il lipide cationico DOTAP, il lipide anionico CHEMS (colesteril emisuccinato) sensibile al pH, colesterolo e un lipide PEG-ilato. Per un *uptake* cellulare efficace nel fegato la dimensione della LNP deve essere inferiore a 100 nm.

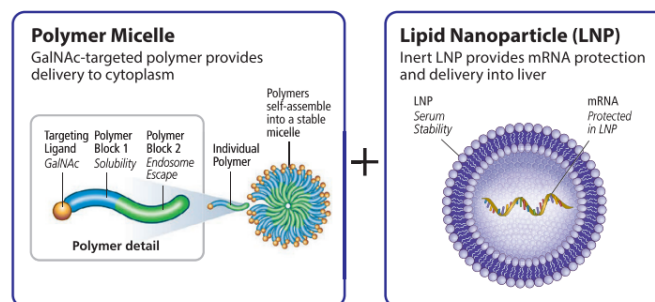
La micella polimerica è derivata da una famiglia di polimeri utilizzati come trasportatori dei siRNA e possiede infatti delle proprietà chimiche sensibili al pH che mediano l'incremento della permeabilità di membrana dell'endosoma grazie al suo ambiente acido. Il singolo polimero che costituisce la micella possiede tre

domini funzionali: il primo è composto da N-acetilgalattosamina (GalNAc) e permette il targeting specifico al fegato dato che GalNAc è un ligando del recettore ASGPR (recettore dell'asialo-glicoproteina), abbondantemente espresso negli epatociti; il secondo dominio è composto da un blocco di polimero idrofilico che consente di mantenere la solubilità della micella; il terzo dominio, invece, è un blocco polimerico costituito da MBA (butil metacrilato, un monomero idrofobico), PAA (acido 2-propilacrilico, un monomero di acido carbossilico) e DMAEMA (2-(dimetilamino)etil metacrilato, un monomero di ammina terziaria). Quest'ultimo dominio è responsabile dell'*endosomal escape*, ovvero consente il rilascio dell'mRNA dall'endosoma in maniera dipendente dal pH. La micella polimerica, infatti, non è attiva a pH fisiologico e perciò non necessita di alcun mascheramento per prevenire destabilizzazioni di membrana premature.

Inoltre, proprio grazie alla composizione a due blocchi del singolo polimero, un blocco idrofilico seguito da un blocco idrofobico, i polimeri tendono spontaneamente a formare delle micelle della dimensione di circa 16 nm.

Per la somministrazione *in vivo* dell'HMT, il complesso mRNA-LNP e le micelle polimeriche sono preparate separatamente in soluzione e vengono mescolate appena prima della somministrazione endovenosa (e.v.) (Figura 5B).

A Hybrid mRNA Technology Delivery System (HMT)



B

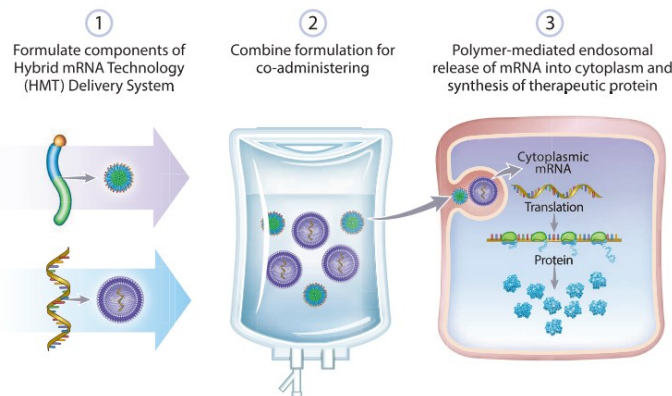


Figura 5. (A) Componenti principali del sistema di delivery HMT (Hybrid mRNA Technology): micella polimerica e nanoparticella lipidica (LNP). (B) Protocollo schematico di somministrazione *in vivo* e rilascio dell'mRNA dall'endosoma al citoplasma degli epatociti per la sintesi proteica.

Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

2.2.4 Esperimenti e risultati

Tramite diversi test è stato messo in evidenza che il complesso mRNA-LNP e la micella polimerica si distribuiscono indipendentemente l'uno dall'altro nel fegato, ma per un'espressione efficace dell'mRNA sono necessari entrambi gli elementi.

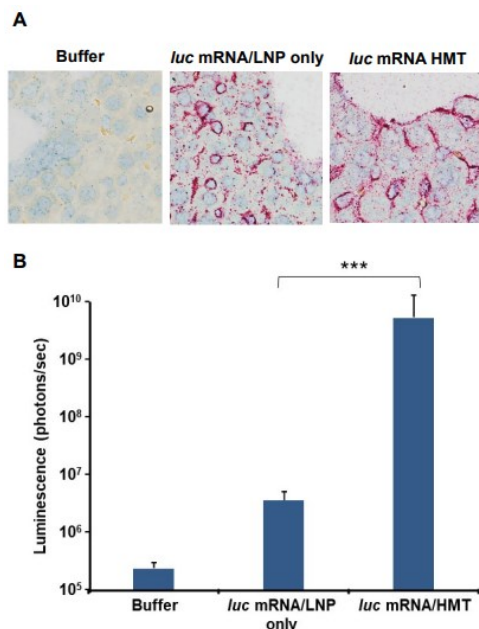


Figura 6. Per un'efficiente espressione dell'HMT mRNA nel topo sono necessari sia la LNP sia la particella polimerica. (A) L'ibridazione *in situ* mostra una localizzazione simile del *luc* mRNA (indicato dai punti rossi) in sezioni di fegato raccolti 1 ora dopo l'iniezione di 1 mg/kg di *luc* mRNA/LNP (pannello centrale) oppure di 1 mg/kg di *luc* mRNA/HMT (con 50 mg/kg di polimero; pannello di destra). (B) Luminescenza misurata 6 ore dopo l'iniezione di 1 mg/kg di *luc* mRNA/LNP con (*luc* mRNA/HMT) o senza (*luc* mRNA/LNP) 50 mg/kg di polimero. Fonte: Supplemental Information, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

A sostegno invece del fatto che è necessaria sia l'LNP sia la micella polimerica per un'efficace espressione dell'mRNA, la Figura 6B mostra come l'aggiunta del polimero al complesso *luc* mRNA/LNP risulta in un aumento nell'attività della luciferasi (luminescenza) nel fegato di circa 2000 volte. Quindi l'aggiunta del polimero provoca un incremento esponenziale nell'espressione dell'mRNA nel fegato.

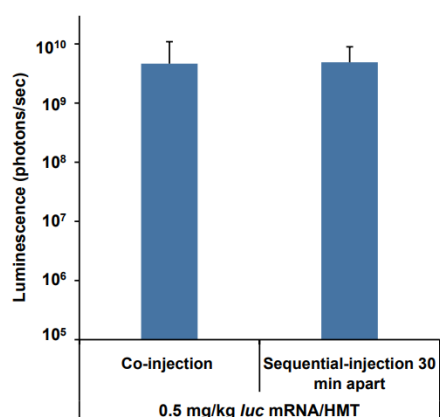


Figura 7. L'espressione dell'HMT mRNA è simile nel caso di una co-iniezione o di due iniezioni sequenziali di mRNA/LNP + polimero. La luminescenza è stata misurata 6 ore dopo la co-iniezione di 0.5 mg/kg di *luc* mRNA/LNP con 45 mg/kg di polimero oppure dell'iniezione sequenziale di *luc* mRNA/LNP seguita da 45 mg/kg di polimero 30 minuti dopo in topi CD1. Fonte: Supplemental Information, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Per dimostrare la specificità di targeting della micella polimerica e l'espressione fegato-specifica della formulazione HMT, i ricercatori hanno somministrato in bolo ai topi per via e.v. l'intera formulazione *luc* mRNA/HMT oppure uno dei due polimeri di controllo disponibili (un polimero che ha come target il mannosio e un

polimero non targettato) insieme al complesso *luc* mRNA/LNP. La luminescenza, esito dell'attività della luciferasi e quindi indice di espressione dell'mRNA, è stata misurata 6 ore dopo la somministrazione. L'*imaging* della luminescenza è stato condotto sia *in vivo* (Figura 8A e 8C) sia *ex vivo* in diversi tipi di tessuti (Figura 8B). Insieme questi risultati mostrano che l'espressione dell'mRNA risulta 5 logaritmi superiore al trattamento con buffer solo nei topi trattati con l'intera formulazione HMT, con un'espressione di *luc* mRNA/HMT circa 2000 volte maggiore rispetto ad entrambe le formulazioni con polimero di controllo (Figura 8C). Inoltre, dalla Figura 8B si nota come l'espressione sia limitata esclusivamente al fegato, senza riscontro di segnali di luminescenza in milza, utero/ovaio, reni, polmoni, cuore e pancreas. Anche l'immagine di immunofluorescenza (Figura 8D) per il rilevamento dell'attività della luciferasi in tessuto epatico mostra l'espressione del *luc* mRNA/HMT in cellule con la tipica morfologia esagonale degli epatociti.

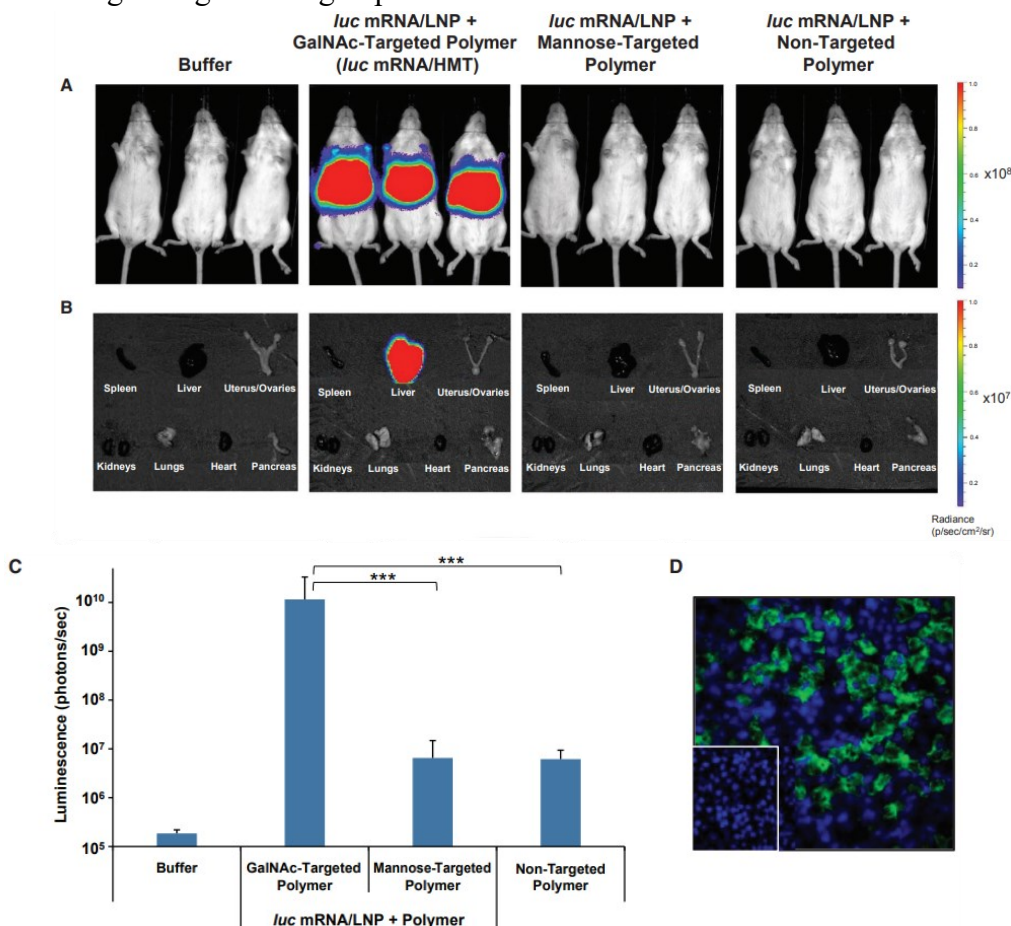


Figura 8. Espressione fegato-specifica di *luc* mRNA/MHT (A-C) Luminescenza *in vivo* (A e C) ed *ex vivo* (B) misurata 6 ore dopo l'iniezione di buffer o *luc* mRNA/HMT oppure *luc* mRNA/LNP con un polimero targettato verso il mannosio o non targettato (tutti con 0.5 mg/kg di mRNA e 25 mg/kg di polimero). (D) Rilevamento della luciferasi tramite immunofluorescenza in tessuto epatico murino raccolto 6 ore dopo una singola iniezione di *luc* mRNA/HMT (1 mg/kg di mRNA, 75 mg/kg di polimero). Per rilevare la proteina luciferasi (in verde) è stato utilizzato un anticorpo anti-luciferasi di coniglio insieme ad una IgG anti-coniglio di asino coniugata con il colorante fluorescente Alexa Fluor 488. Le cellule sono state colorate con il colorante di contrasto DAPI (in blu).

Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

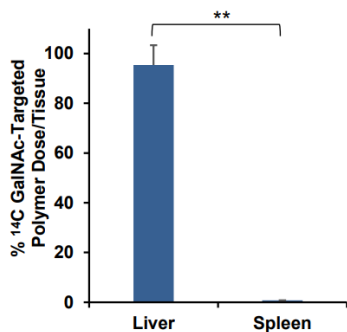


Figura 9. Assorbimento specifico nel fegato del polimero GalNAc. Il polimero è stato marcato con ¹⁴C ed è stato quantificato in fegato e milza tramite il "liquid scintillation" counting due ore a seguito dell'iniezione con 15 mg/kg di polimero in topi CD1. Fonte: Supplemental Information, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Per confermare ulteriormente la specificità verso il fegato del polimero GalNAc, successivamente è stato condotto uno studio tramite il *liquid scintillation counting*, una tecnica che misura l'attività radioattiva di un campione di materiale mescolandolo con uno scintillatore⁵ liquido e contando poi le emissioni di fotoni. La Figura 9 mostra come, dopo 2 ore dalla somministrazione, oltre il 95% del polimero GalNAc

marcato con l'isotopo radioattivo ¹⁴C risulta essere espresso nel fegato.

Per determinare la dose ottimale di somministrazione, è stata valutata l'espressione di mRNA a seguito dell'inoculazione di dosi crescenti di *luc* mRNA/LNP (0.5, 1 e 5 mg/kg) con 30 mg/kg fissi di polimero e a seguito della somministrazione di dosi crescenti di polimero (10, 20, 25 e 30 mg/kg) con 0.5 mg/kg fissi di *luc* mRNA/LNP. È stato osservato un incremento dose-dipendente nell'attività della luciferasi sia aumentando i livelli di mRNA (Figura 10A) sia aumentando i livelli di polimero (Figura 10B), anche se in quest'ultimo caso si può notare che la luminescenza tende ad andare a *plateau* tra 25 e 30 mg/kg di polimero. Inoltre, l'espressione della luciferasi può essere rilevata a partire da 30 minuti dopo l'iniezione e lo rimane fino a 96 ore (Figura 10C e 10D). La Figura 10E, invece, mostra che livelli alti e costanti di espressione vengono mantenuti anche in un regime di somministrazione multi-dose con una iniezione e.v. alla settimana per un totale di 12 settimane. Questo suggerisce l'assenza dell'induzione di anticorpi neutralizzanti che altrimenti sarebbero andati ad intaccare i livelli di espressione.

⁵ Un materiale in grado di emettere impulsi di luce se attraversato da fotoni ad alta energia o da particelle cariche.

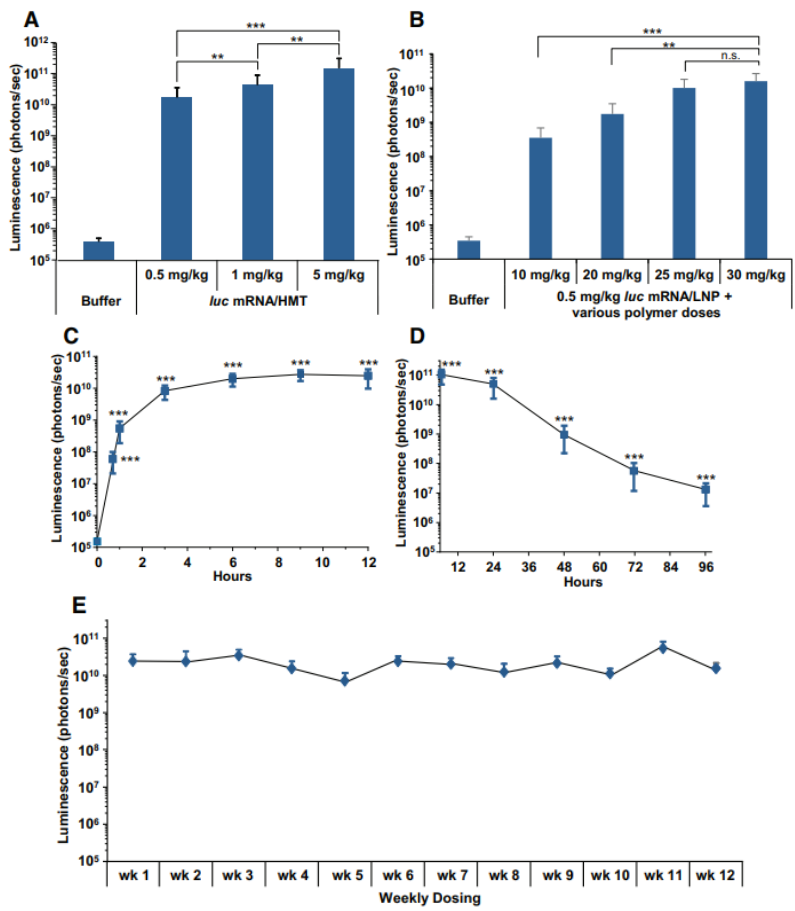


Figura 10. Ottimizzazione della dose di *luc* mRNA/HMT. (A) Luminescenza in vivo misurata 6 ore dopo la somministrazione di dosi crescenti di *luc* mRNA/LNP (0.5, 1.0 o 5.0 mg/kg) con 30 mg/kg di polimero. (B) Luminescenza in vivo misurata a seguito della somministrazione di dosi crescenti di polimero (10, 20, 25 e 30 mg/kg) con 0.5 mg/kg di *luc* mRNA/LNP. (C e D) Andamento nel tempo della luminescenza in vivo a seguito di una singola iniezione di *luc* mRNA/HMT (1 mg/kg di mRNA + 45 mg/kg di polimero). (E) Luminescenza misurata 6 ore dopo ogni dose settimanale di *luc* mRNA/HMT (0.5 mg/kg di mRNA + 30 mg/kg di polimero) per un totale di 12 settimane. Non si sono riscontrate differenze significative tra i gruppi ad ogni dose settimanale rispetto alla prima dose somministrata. Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Oltre alle analisi di espressione, sono stati valutati anche possibili effetti collaterali dovuti alla somministrazione della formulazione andando a misurare i livelli di ALT (alanina transaminasi) nel siero e di citochine come CXCL10. I risultati indicano che non ci sono stati incrementi nei livelli di ALT (Figura 11) 24 ore dopo la somministrazione di una singola dose di *luc* mRNA/HMT ai dosaggi più comunemente utilizzati nello studio (0.5 e 1 mg/kg), mentre un lieve ma non significativo incremento è stato registrato a dosi più elevate (5 mg/kg). Allo stesso modo non sono stati registrati significativi aumenti di CXCL10 a distanza di 3 ore dalla somministrazione di una singola dose di *luc* mRNA/HMT.

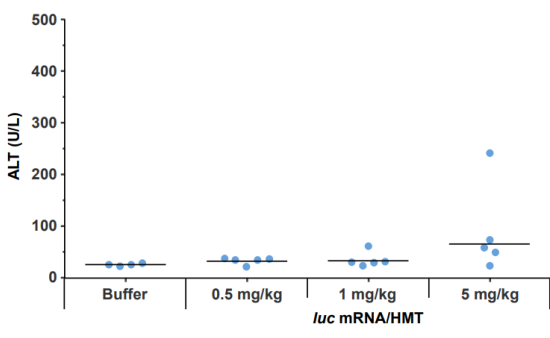


Figura 11. I livelli di ALT sierica sono stati misurati 24 ore dopo la somministrazione di una singola dose di *luc* mRNA/HMT (0.5, 1.0 o 5.0 mg/kg di mRNA + 30 mg/kg di polimero). Non si evidenziano differenze significative tra i gruppi. Fonte: Supplemental Information, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Prima di testare l'efficacia del trattamento, il gruppo di ricerca ha misurato l'espressione di OTC umana e i suoi livelli di attività enzimatica a seguito di una singola iniezione in bolo di hOTC (human OTC) mRNA/HMT in topi *Otc^{spf-ash}* non trattati con il vettore AAV-*Otc* shRNA e sono stati comparati con topi CD1 trattati e non trattati con la stessa formulazione. Inizialmente è stato condotto un Western blot (Figura 12A) per rilevare i livelli di hOTC a 2, 4, 7 e 10 giorni dopo il trattamento di topi *Otc^{spf-ash}*: nei campioni 1-3 non ci sono livelli di proteina rilevabile dato che i topi sono stati iniettati solo con buffer; i campioni 3-15 mostrano invece che livelli elevati di hOTC possono essere rilevati fino a 10 giorni dopo l'iniezione. A seguito del trattamento con una singola dose di hOTC mRNA/HMT di topi *Otc^{spf-ash}*, questi raggiungono un picco di attività enzimatica dell'OTC che risulta essere il 14% rispetto ai topi CD1 normali (Figura 12B). Con lo stesso trattamento, invece, topi CD1 normali raggiungono un picco di attività enzimatica che corrisponde al 200% rispetto alla normale attività dell'OTC di topi CD1 non trattati (Figura 12C).

L'espressione di hOTC è stata valutata anche tramite analisi di immunofluorescenza (Figura 12D) in campioni di fegato di topi *Otc^{spf-ash}* trattati con hOTC mRNA/HMT (pannello 1 e 2), di topi *Otc^{spf-ash}* trattati con buffer (pannello 3) e di topi wild-type non trattati (pannello 4). Dai pannelli 1 e 2 emerge una grande quantità di epatociti positivi per la proteina hOTC (in verde), mentre non sono evidenziabili cellule positive per hOTC nelle sezioni di topi *Otc^{spf-ash}* trattati con buffer o di topi wild-type. Nel pannello 1 con ingrandimento 40× il segnale positivo di presenza della proteina hOTC visibile in verde appare punteggiato e citosolico, suggerendo la localizzazione mitocondriale della proteina. Inoltre, dal pannello 2 non si nota una differenza di distribuzione tra la regione della vena centrale (C) e le regioni delle triadi portal (P). Per effettuare una quantificazione, dalla Figura 12E si evince che circa l'80% degli epatociti di topi *Otc^{spf-ash}* trattati con hOTC mRNA/HMT risultano positivi per la proteina hOTC.

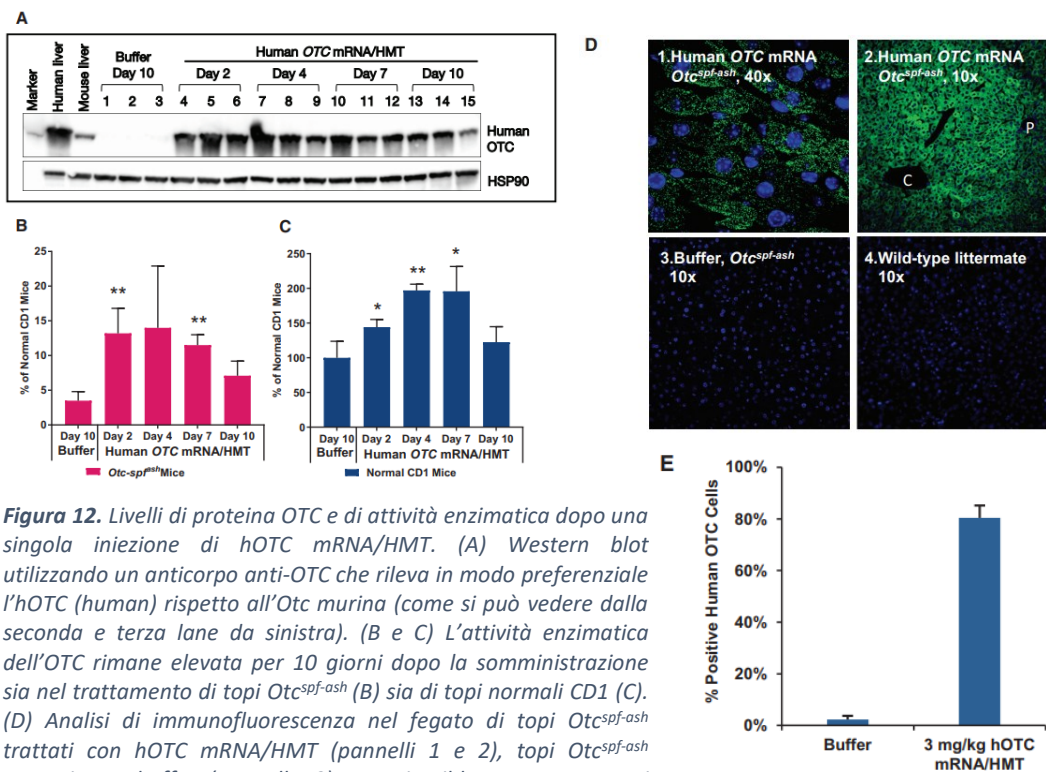


Figura 12. Livelli di proteina OTC e di attività enzimatica dopo una singola iniezione di hOTC mRNA/HMT. (A) Western blot utilizzando un anticorpo anti-OTC che rileva in modo preferenziale l'hOTC (human) rispetto all'Otc murina (come si può vedere dalla seconda e terza lane da sinistra). (B e C) L'attività enzimatica dell'OTC rimane elevata per 10 giorni dopo la somministrazione sia nel trattamento di topi *Otc^{spf-ash}* (B) sia di topi normali CD1 (C). (D) Analisi di immunofluorescenza nel fegato di topi *Otc^{spf-ash}* trattati con hOTC mRNA/HMT (pannelli 1 e 2), topi *Otc^{spf-ash}* trattati con buffer (pannello 3) e topi wild-type non trattati (pannello 4). Per rilevare la proteina hOTC (in verde) è stato utilizzato un anticorpo monoclonale murino anti-OTC specifico per l'uomo, insieme ad una IgG anti-topo di asino coniugata con Alexa Fluor 546. Le cellule sono state colorate con il colorante di contrasto DAPI (blu). (E) quantificazione delle cellule positive per l'hOTC.

Successivamente è stata valutata l'efficacia del trattamento in un regime di somministrazione multi-dose nel modello murino di OTCD. Esemplari maschi di topi *Otc^{spf-ash}* sono stati iniettati con il vettore AAV-*Otc* shRNA al giorno 0, mentre la formulazione hOTC mRNA/HMT, la formulazione di controllo mRNA/HMT o il buffer sono stati somministrati 1 o 2 volte a settimana a partire dal giorno 4. Il dosaggio è stato effettuato per 35 giorni, dopo i quali la metà dei topi (n=6) trattati due volte a settimana con la formulazione hOTC mRNA/HMT sono stati mantenuti per determinare i tassi di sopravvivenza, mentre l'altra metà (n=6) è stata sacrificata al giorno 37 per stimare i livelli rimanenti di proteina hOTC e *Otc* mRNA allo scopo di valutare se il knockdown operato dal vettore virale continuasse a persistere. Gli animali trattati con buffer o formulazione di controllo non sono sopravvissuti fino al giorno 35; dopo questo giorno i topi trattati con la formulazione hOTC mRNA/HMT 1 volta a settimana sono stati sacrificati.

Le analisi dei livelli di ammonio plasmatico e acido orotico nelle urine mostrano una normalizzazione con entrambi i regimi di somministrazione (Figura 13A e 13B) della formulazione hOTC mRNA/HMT se comparati con i topi trattati con buffer o formulazione di controllo.

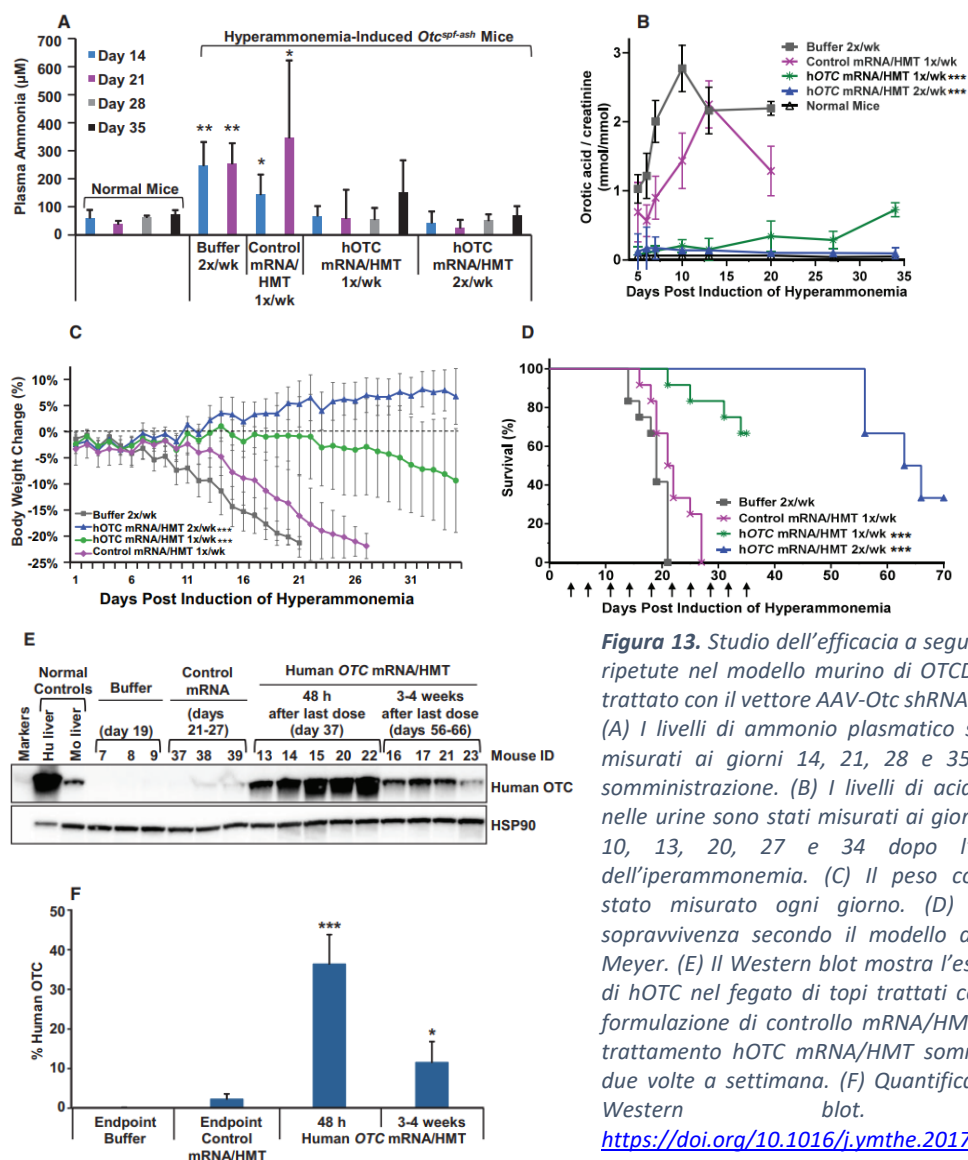


Figura 13. Studio dell'efficacia a seguito di dosi ripetute nel modello murino di OTCD *Otc*^{spf-ash} trattato con il vettore AAV-*Otc* shRNA.

(A) I livelli di ammonio plasmatico sono stati misurati ai giorni 14, 21, 28 e 35 dopo la somministrazione. (B) I livelli di acido orotico nelle urine sono stati misurati ai giorni 5, 6, 7, 10, 13, 20, 27 e 34 dopo l'induzione dell'iperammonemia. (C) Il peso corporeo è stato misurato ogni giorno. (D) Curva di sopravvivenza secondo il modello di Kaplan-Meier. (E) Il Western blot mostra l'espressione di hOTC nel fegato di topi trattati con buffer, formulazione di controllo mRNA/HMT e con il trattamento hOTC mRNA/HMT somministrato due volte a settimana. (F) Quantificazione del Western blot. Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Dalla Figura 13B si nota che il gruppo trattato con la formulazione hOTC mRNA/HMT 1 volta a settimana comincia a mostrare un incremento dei livelli di acido orotico nelle urine dal giorno 20, mentre dalla Figura 13C si osserva che lo stesso gruppo comincia anche a perdere peso dal giorno 23. Al contrario, dalle stesse immagini si può vedere che il gruppo trattato 2 volte a settimana mantiene livelli di acido orotico praticamente comparabili ai topi normali per tutti i 35 giorni e in più mostra un aumento nel peso corporeo rispetto al gruppo di controllo. Questi risultati dimostrano sia l'efficacia che la tollerabilità di questo regime di somministrazione a 2 dosi a settimana.

Analizzando il tasso di sopravvivenza (Figura 13D), si vede come gli animali trattati una volta a settimana cominciano a morire dal giorno 21, mentre tutti i topi trattati due volte a settimana sopravvivono al periodo di trattamento di 35 giorni e addirittura i 6 topi che vengono mantenuti vivi dello stesso gruppo sopravvivono altre 3 settimane dopo la fine della terapia.

Per analizzare i livelli di espressione della proteina hOTC nel fegato, come già accennato, 6 topi del regime a due dosi di somministrazione sono stati sacrificati 48 ore dopo la fine della terapia: tramite Western blot e sua successiva quantificazione si rileva che questi topi hanno una quantità di proteina OTC pari a circa il 35% in confronto ad un tessuto epatico umano normale. Le analisi condotte 3-4 settimane dopo mostrano una percentuale di proteina rispetto al normale pari a circa il 12% (Figura 13E e 13F). Grazie a questi risultati si può stimare un'emivita della proteina OTC di circa 12 giorni.

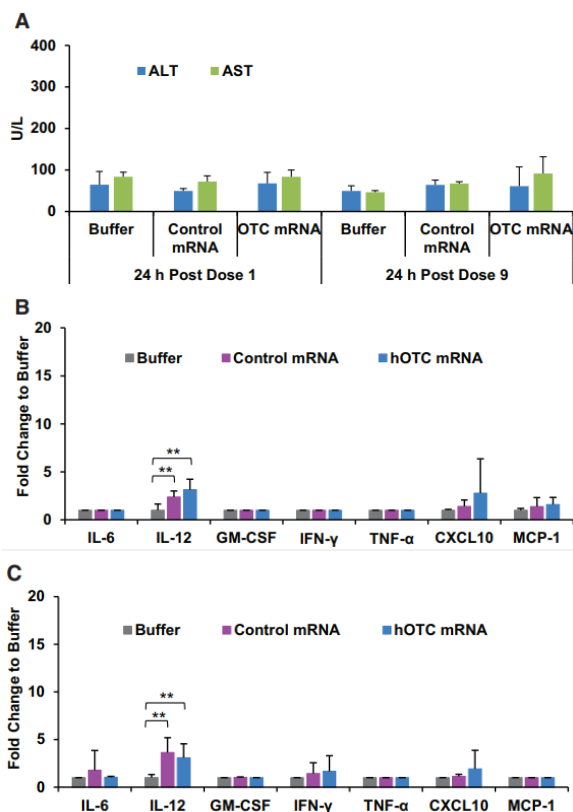


Figura 14. Analisi della sicurezza del regime di somministrazione a dosi ripetute in topi *Otc^{spf-ash}*. (A) I livelli di ALT e AST sono stati misurati 24 ore dopo la prima e la nona dose (somministrata 2 volte a settimana) di buffer o mRNA/HMT. I livelli di citochine sono stati misurati dopo 3 (B) o 24 ore (C) la nona dose di buffer o mRNA/HMT.

Fonte: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>

Infine, è stato testato il profilo di sicurezza della formulazione di hOTC mRNA/HMT in uno studio a somministrazione multipla in esemplari maschi di topi *Otc^{spf-ash}* non trattati con il vettore AAV-*Otc* shRNA. La formulazione hOTC mRNA/HMT, quella di controllo o il buffer sono state somministrate 2 volte a settimana per 4 settimane, per un totale di 9 dosi amministrate. La Figura 14A mostra livelli normalizzati di ALT e AST (aspartato aminotrasferasi) 24 ore dopo la prima dose e 24 ore dopo l'ultima dose. Sono stati poi analizzati anche i livelli di alcune citochine a 3 e 24 ore di distanza dalla nona dose (rispettivamente Figura 14B e 14C): non sono stati osservati aumenti nei livelli di IL-6, IFN-γ, TNF-α, GM-CSF o MCP-1; sono stati invece osservati lievi aumenti (ma inferiori a 5 volte) nei livelli di IL-12 e CXCL10.

Inoltre, l'istopatologia degli organi interni (fegato, cuore, polmoni, rene, milza) condotta 48 ore dopo la somministrazione della nona dose di hOTC mRNA/HMT non mostra segni patologici significativi in nessuno dei tessuti degli animali trattati se messi a confronto con gli stessi tessuti trattati con buffer e formulazione di controllo.

2.2.5 Discussione

In questo studio preclinico Prieve *et al.* [12] hanno dimostrato come la somministrazione di hOTC mRNA/HMT nel modello murino di OTCD non solo

riduce i livelli di ammonio plasmatico ma porta anche ad un significativo incremento nella sopravvivenza.

La somministrazione di una dose singola della formulazione hOTC mRNA/HMT in topi *Otc^{spf-ash}* ha portato all'espressione diffusa della proteina mitocondriale hOTC in tutto il parenchima epatico (Figura 12D) e ad un aumento nell'attività enzimatica dell'OTC fino a 10 giorni dopo l'iniezione (Figura 12B). Un dato interessante è che sono stati osservati risultati più promettenti in topi *Otc^{spf-ash}* infettati con AAV-*Otc* shRNA trattati con due dosi a settimana di hOTC mRNA/HMT rispetto alla singola dose a settimana: è infatti stata riscontrata una migliore normalizzazione dei livelli di ammonio plasmatico e acido orotico nelle urine (Figura 13A e 13B); inoltre, è stato l'unico gruppo a sopravvivere ai 35 giorni del periodo di somministrazione (Figura 13D) e addirittura per ulteriori 3-6 settimane dopo l'ultima dose. Probabilmente il motivo per cui il regime a due dosi a settimana risulta quello necessario per una prolungata efficacia terapeutica nei topi *Otc^{spf-ash}* è che questi animali mostrano un'espressione ridotta di mRNA esogeno (circa 8 volte inferiore) rispetto ai topi normali: solo la doppia somministrazione a settimana risulta quindi efficace nell'indurre degli adeguati livelli di espressione di hOTC terapeutico.

Come potenziale trattamento terapeutico, tuttavia, sarebbe preferibile una minore frequenza di somministrazione e questo risulta verosimilmente raggiungibile basandosi sia sull'incremento del 200% dell'attività dell'OTC a seguito della singola somministrazione in topi normali (Figura 12C), sia sul fatto che l'emivita della proteina è stata stimata essere di circa 12 giorni (accumulo di hOTC pari al 35% del normale 48 ore dopo l'ultima dose, pari al 12% del normale 3-4 settimane dopo; Figura 13F), un tempo lungo che permetterebbe anche una singola somministrazione al mese.

Tutti questi dati, insieme al rapido esordio di espressione e alla buona tollerabilità a dosi ripetute (non sono stati infatti riscontrati segni di infiammazione o tossicità epatica nei topi trattati; Figura 14), suggeriscono l'applicabilità clinica della procedura.

Questo studio è stata la prima dimostrazione di una terapia a mRNA somministrata in modo sistemico e ripetuto per la correzione dell'OTCD in un modello clinicamente rilevante. È stata anche la prima dimostrazione dell'efficacia di un sistema di *delivery* non virale per l'OTC mRNA in un modello che riproduce la malattia. Sono stati condotti, infatti, molti studi che hanno mostrato come anche un vettore AAV può essere sfruttato per il *delivery* dell'OTC mRNA ad un modello murino di OTCD: dato che questi vettori inducono un'espressione a lungo termine e non transiente (al contrario dei sistemi non virali) del transgene, sono stati osservati livelli maggiori di proteina e di attività enzimatica. Tuttavia, questo tipo di approccio suscita diverse preoccupazioni: innanzitutto, in pazienti pediatriche di OTCD l'espressione non è duratura in quanto nella terapia genica che sfrutta vettori non integrativi come

quelli derivati da AAV, questi vengono persi nel fegato vista l'elevata proliferazione degli epatociti in sviluppo. Inoltre, i vettori AAV sono suscettibili alla presenza di anticorpi neutralizzanti preesistenti che possono indurre risposte mediate da linfociti T citotossici: questi limitano l'efficacia terapeutica e possono anche provocare l'aumento delle transaminasi epatiche, potenzialmente causando insufficienza epatica. Infine, i vettori AAV sono noti nell'indurre l'epatite immuno-mediata.

Altri sistemi di *delivery* non virali sono disponibili per questo tipo di terapia a mRNA e la maggior parte delle alternative si basano sulle LNPs ionizzabili. Ciononostante, al contrario del sistema HMT sviluppato da Prieve *et al.* [12] che grazie alla micella polimerica è diretto in modo altamente specifico verso gli epatociti, con rilevata espressione proteica solamente nel fegato (Figura 8B), le LNPs ionizzabili portano ad un'espressione che è prevalente nel fegato ma è rilevabile anche nella milza e pancreas. Inoltre, questo sistema, al contrario della tecnologia HMT, porta anche all'induzione di una risposta infiammatoria importante con un incremento di circa 150 volte di IL-12 e di circa 20 volte di TNF- α .

In conclusione, perciò, la tecnologia HMT rappresenta un'opzione interessante per la terapia a mRNA del deficit di ornitina transcarbamilasi, così come per altre IMDs severe che sono classicamente carenti di terapie efficaci. Anche se la maggior parte delle IMDs sono rare, l'incidenza totale ammonta a 1 affetto ogni 5000 nati, con conseguenze devastanti non solo per i pazienti ma anche per le famiglie. L'incidenza dell'OTCD è stimata essere 1 ogni 50-80 mila nati, ma la malattia potrebbe verosimilmente essere sotto-diagnosticata dato che i disordini del ciclo dell'urea spesso non sono diagnosticati oppure i pazienti pediatrici muoiono prima di una diagnosi.

Oltre alle diete ipoproteiche e agli *ammonia scavengers*, in queste condizioni viene adottato il trapianto di fegato, procedura che però richiede una terapia immunosoppressiva da seguire poi per tutta la vita. L'approccio della sostituzione enzimatica intracellulare (i-ERT) tramite l'mRNA codificante l'enzima mancante permetterebbe, invece, di ristabilire la normale fisiologia cellulare, con il potenziale di correggere la patologia o per lo meno di ritardare o addirittura evitare il trapianto di fegato.

CAPITOLO 3 – CONCLUSIONI

Nonostante gli studi sull'utilizzo dell'RNA messaggero come molecola terapeutica siano in corso da oltre vent'anni, la pandemia da Covid-19 è riuscita a rivelare al mondo il potenziale di questa tecnologia, attirando su di sé molto interesse e investimenti da parte di un gran numero di aziende biotech. I vaccini contro SARS-CoV-2 sono stati i primi farmaci basati sull'mRNA approvati per

l'uso clinico e sicuramente non saranno gli ultimi: moltissime applicazioni sono possibili, dalle infezioni virali, al cancro, alle malattie autoimmuni, fino ad arrivare alle malattie croniche genetiche e non. I rapidi avanzamenti nel campo di questa tecnologia ottenuti nel 2020 hanno accelerato la ricerca nell'utilizzo della terapia a mRNA per il trattamento di malattie metaboliche ereditarie, in cui mutazioni genetiche determinano la mancata espressione di enzimi essenziali nei processi metabolici, con conseguenze invalidanti e spesso fatali. Una molecola sintetica di mRNA adeguatamente progettata può istruire le cellule dell'organismo stesso a produrre la proteina mancante o sostituire una proteina difettosa, costituendo un vero e proprio farmaco.

Al contrario dei tradizionali vaccini e della convenzionale terapia genica, anche se da un lato i pazienti dovrebbero ripetere le somministrazioni periodicamente, dall'altro si eviterebbero i rischi associati alla terapia genica quali il rischio di genotossicità legato all'accumulo del prodotto del transgene che viene espresso in maniera costante ed il rischio di mutagenesi inserzionale. La terapia a mRNA può essere sospesa in qualsiasi momento in caso di effetti avversi e la molecola viene rapidamente degradata proprio per la sua caratteristica espressione transiente. Inoltre, il dosaggio può essere modulato per raggiungere la giusta efficacia. Per di più, esiste anche la possibilità di combinare in un singolo trattamento diverse molecole di mRNA: questo approccio è già stato testato in studi preclinici per implementare la risposta immunitaria in strategie di vaccinazione contro malattie infettive, ma potrebbe essere applicato anche per il trattamento di disordini multi-genici che non sono approcciabili con le tecnologie attuali [11].

Sono necessari ancora molti studi, ma la versatilità della piattaforma rende possibile la messa a punto di nuovi farmaci semplicemente modificando la sequenza dell'RNA, con un processo di produzione molto flessibile, rapido e a basso costo. La terapia a mRNA ha quindi le potenzialità per cambiare l'evoluzione clinica di molte malattie che fino ad oggi erano considerate sostanzialmente incurabili.

Attualmente diversi *clinical trial* sono in atto per valutare l'efficacia di terapie a mRNA sviluppate da Moderna, AstraZeneca e Translate Bio per il trattamento della PA, MMA, OTCD, fibrosi cistica e addirittura dello scompenso cardiaco e delle ulcere associate al diabete di tipo II [4].

BIBLIOGRAFIA

1. Karam M, Daoud G. "*mRNA vaccines: Past, present, future*". Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 30 giugno 2022;17(4):491-522 doi: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2022.05.003>
2. Chaudhary N, Weissman D, Whitehead KA. "*mRNA vaccines for infectious diseases: principles, delivery and clinical translation*." Nat Rev Drug Discov. novembre 2021;20(11):817–38. doi: <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00283-5>
3. Elkhalfifa D, Rayan M, Negmeldin AT, Elhissi A, Khalil A. "*Chemically modified mRNA beyond COVID-19: Potential preventive and therapeutic applications for targeting chronic diseases*." Biomed Pharmacother. gennaio 2022;145:112385. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112385>
4. Gómez-Aguado I, Rodríguez-Castejón J, Vicente-Pascual M, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ, Del Pozo-Rodríguez A. "*Nanomedicines to Deliver mRNA: State of the Art and Future Perspectives*." Nanomaterials (Basel). 20 febbraio 2020;10(2):E364. doi: <https://doi.org/10.3390/nano10020364>
5. Liu T, Liang Y, Huang L. "*Development and Delivery Systems of mRNA Vaccines*." Front Bioeng Biotechnol. 2021;9:718753. doi: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.718753>
6. Rosa SS, Prazeres DMF, Azevedo AM, Marques MPC. "*mRNA vaccines manufacturing: Challenges and bottlenecks*." Vaccine. 15 aprile 2021;39(16):2190–200. doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.03.038>
7. Buschmann MD, Carrasco MJ, Alishetty S, Paige M, Alameh MG, Weissman D. "*Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines*." Vaccines (Basel). 19 gennaio 2021;9(1):65. doi: <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>
8. Wadhwa A, Aljabbari A, Lokras A, Foged C, Thakur A. "*Opportunities and Challenges in the Delivery of mRNA-based Vaccines*." Pharmaceutics. 28 gennaio 2020;12(2):E102. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020102>
9. Kon E, Elia U, Peer D. "*Principles for designing an optimal mRNA lipid nanoparticle vaccine*." Current Opinion in Biotechnology. 1 febbraio 2022;73:329–36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.09.016>
10. Ramachandran S, Satapathy SR, Dutta T. "*Delivery Strategies for mRNA Vaccines*." Pharmaceut Med. febbraio 2022;36(1):11–20. doi: <https://doi.org/10.1007/s40290-021-00417-5>
11. Berraondo P, Martini PGV, Avila MA, Fontanellas A. "*Messenger RNA therapy for rare genetic metabolic diseases*." Gut. luglio 2019;68(7):1323–30. doi: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318269>

12. Prieve MG, Harvie P, Monahan SD, Roy D, Li AG, Blevins TL, et al. "*Targeted mRNA Therapy for Ornithine Transcarbamylase Deficiency.*" *Mol Ther.* 7 marzo 2018;26(3):801–13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.12.024>