



Capire la farmacologia dei vaccini COVID-19 a mRNA: stiamo giocando a dadi con la spike?

Marco Cosentino^{1,*} and Franca Marino¹

¹ Center for Research in Medical Pharmacology, University of Insubria, Varese, Italy

* Correspondence: marco.cosentino@uninsubria.it; Tel.: +39 0332 217401

Riassunto: I vaccini a mRNA per la malattia da coronavirus-19 (COVID-19) sono il fondamento delle campagne di vaccinazione di massa nella maggior parte dei paesi occidentali. Tuttavia, le condizioni di emergenza in cui si è verificato il loro sviluppo hanno reso impossibile caratterizzarne appieno gli effetti e il meccanismo d'azione. Qui riassumiamo e discutiamo le prove disponibili che indicano che i vaccini a mRNA COVID-19 sono dei farmaci e non dei vaccini convenzionali, poiché non contengono antigeni ma un mRNA attivo della proteina S di SARS-CoV-2, che rappresenta allo stesso tempo un principio attivo di per sé e un profarmaco, che in seguito alla traduzione intracellulare provoca la produzione endogena della proteina S di SARS-CoV-2. Sia l'mRNA della proteina S derivato dal vaccino che la proteina S risultante mostrano una farmacologia complessa e vanno incontro a una distribuzione sistemica. Definire i vaccini a mRNA COVID-19 come farmaci ha implicazioni dirette per la loro valutazione farmacodinamica, farmacocinetica, clinica e della sicurezza post-marketing. Solo un'accurata caratterizzazione dei vaccini a mRNA COVID-19 come farmaci garantirà un uso sicuro, razionale e individualizzato di questi prodotti.

Keywords: COVID-19; mRNA vaccines; SARS-CoV-2; spike protein; pharmacology; safety; adverse effects; pharmacodynamics; pharmacokinetics.

Citation: Cosentino, M.; Marino, F. Understanding the pharmacology of COVID-19 RNA vaccines: playing dice with the spike?. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduzione

Nella maggior parte dei paesi occidentali, le campagne di vaccinazione di massa contro la malattia da Coronavirus-19 (COVID-19) in corso dalla fine del 2020 si basano su due vaccini a mRNA contro SARS-CoV-2 (BioNTech/Pfizer BNT162b2 e Moderna mRNA-1273) [1,2]. Entrambi i prodotti contengono mRNA che codificano per la proteina spike (S) di SARS-CoV-2, che è essenziale nel legame del virus alle cellule ospiti che esprimono il corrispondente recettore, rappresentato dall'enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2). Questi prodotti sono stati presentati fin dall'inizio come intrinsecamente sicuri, poiché si riteneva che, analogamente ai vaccini convenzionali, dopo l'iniezione intramuscolare la maggior parte della dose sarebbe rimasta nel muscolo e il resto sarebbe stato drenato attraverso il sistema linfatico, venendo infine catturato da cellule presentanti l'antigene e cellule B e subendo infine una completa eliminazione in poche decine di ore al massimo [3,4]. Su questa base, il pubblico è stato esplicitamente rassicurato da blog influenti (vedi ad esempio [5]) e da pagine web istituzionali accademiche (vedi ad esempio [6]) che questi prodotti non sarebbero andati incontro ad alcuna distribuzione sistemica rilevante e che la proteina S risultante sarebbe rimasta attaccata alla superficie delle cellule e non sarebbe stata rilasciata nel flusso sanguigno e nei tessuti, per incontrare i recettori ACE2 e alla fine indurre danni d'organo. Passo dopo passo, tuttavia, è diventato chiaro che non era così.

2. Evidenze a favore della biodistribuzione sistemica della proteina S indotta dai vaccini COVID-19 nei soggetti vaccinati

Uno studio pubblicato a maggio 2021 ha documentato per la prima volta la circolazione della proteina S indotta dal vaccino nel sangue di 11 soggetti su 13 già un giorno dopo l'iniezione del vaccino Moderna COVID-19, fino a 150 pg/mL e per circa due settimane dopo l'iniezione [7]. Immediatamente, è stato osservato che tali concentrazioni erano di diversi ordini di grandezza inferiori a quelle necessarie per legare i recettori ACE2 e che comunque dopo due settimane non era rilevabile traccia della proteina nel sangue. Subito dopo, tuttavia, è stato pubblicato un rapporto che descrive il caso di una donna affetta da trombocitopenia indotta dal vaccino Moderna COVID-19 e con livelli di proteina S indotti dal vaccino di 10 ng/mL nel plasma 10 giorni dopo la vaccinazione [8], quindi quasi 100 volte superiori a quelle riportate in precedenza [7], il che suggerisce un'eccessiva produzione di proteina S indotta dal vaccino come determinante della tossicità del vaccino medesimo. Nel frattempo, sia l'mRNA del vaccino che la proteina S indotta dal vaccino sono stati identificati nei linfonodi ascellari fino a 60 giorni dopo la seconda dose di entrambi i vaccini Moderna o BioNTech/Pfizer COVID-19 [9], dimostrando così che la produzione endogena della proteina S dopo la vaccinazione può verificarsi per molto più tempo di quanto si pensasse. La proteina S è stata finora identificata in biopsie endomiocardiche di pazienti con miocardite post-vaccino fino a quasi due mesi dopo la vaccinazione COVID-19 [10], in monociti circolanti di pazienti con sintomi simili a sequele post-acute di tipo COVID-19 (PASC) a seguito di vaccini COVID-19 [11], nei cheratinociti vescicolari e nelle cellule endoteliali del derma in un paziente che presentava lesioni cutanee persistenti dovute alla riattivazione del virus varicella zoster (VZV) oltre tre mesi dopo la vaccinazione COVID-19 [12], e l'mRNA della proteina S era presente nei muscoli deltoide e quadricipite destro di una donna con miosite un mese dopo l'iniezione del vaccino mRNA BioNTech/Pfizer COVID-19 nel muscolo deltoide sinistro [13]. Nel complesso, le prove supportano fortemente il possibile legame tra l'espressione inappropriata della proteina S in tessuti sensibili e il successivo danno tissutale.

3. Effetti avversi dopo vaccinazione COVID-19: troppa proteina S, per troppo tempo e/o nel posto sbagliato?

Una revisione completa della letteratura ha recentemente discusso il ruolo della proteina S indotta dai vaccini a mRNA COVID-19 negli effetti avversi dopo la vaccinazione [14] e per parte nostra abbiamo dimostrato che la produzione della proteina S indotta dai vaccini a mRNA COVID-19 potrebbe essere paragonabile a alla produzione stimata durante l'infezione da SARS-CoV-2 [15]. La presente pubblicazione ora identifica, sviluppa e discute le implicazioni del ruolo della proteina S negli effetti avversi a seguito di vaccinazione e indica gli approcci farmacologici più appropriati per una migliore caratterizzazione di questi vaccini, con l'obiettivo di fornire una guida utile al loro uso razionale e individualizzato. In effetti, sulla base di queste premesse, una spiegazione importante degli effetti avversi a seguito della vaccinazione COVID-19 potrebbe benissimo essere che i vaccini a mRNA inducano in determinati individui un'eccessiva produzione di proteina S, per troppo tempo e/o in tessuti e organi inappropriati, e questo evento è al momento imprevedibile, dal momento che la biodistribuzione sistemica e l'eliminazione dei vaccini a mRNA COVID-19 finora non sono mai stati considerati un problema, e di conseguenza la questione non è mai stata studiata come avrebbe effettivamente meritato. Sorprendentemente, l'inadeguata comprensione di come orientare solo verso specifici organi e cellule l'espressione proteica indotta da questi prodotti è ben riconosciuta come uno dei principali limiti della terapia genica con mRNA [16], tuttavia per i vaccini a mRNA è stata finora ignorata.

4. I vaccini a mRNA COVID-19 sono farmaci e non vaccini convenzionali

In altre parole, considerare i vaccini a mRNA COVID-19 alla stregua di semplici vaccini convenzionali è stato un grave malinteso, poiché hanno caratteristiche del tutto distinte e peculiari e in modi specifici riflettono meglio i prodotti farmaceutici e dovrebbero quindi essere considerati come tali. I vaccini a mRNA COVID-19 contengono mRNA attivo della proteina S di SARS-CoV-2, che rappresenta allo stesso tempo un profarmaco e un principio attivo. Per quanto possa suonare anticonvenzionale definire il contenuto di un vaccino come un profarmaco, la definizione si applica senza dubbio a questi prodotti, non convenzionali anche in generale, data la loro concezione del tutto innovativa, che ha addirittura richiesto un aggiornamento del significato della parola "vaccino" sui vocabolari (vedi ad esempio il dizionario Merriam-Webster [17]). In quanto tali, questi prodotti necessitano urgentemente di un'adeguata concettualizzazione. I vaccini convenzionali contengono uno o più antigeni, che rappresentano il loro componente attivo e che a loro volta esercitano il loro effetto agendo su bersagli endogeni (le cellule del sistema immunitario). Al contrario, i vaccini mRNA contengono una molecola (l'mRNA) che non è in grado di innescare alcuna risposta immunitaria anti-SARS-CoV-2 a meno che non sia tradotta dal metabolismo cellulare endogeno in una parte attiva che è la proteina S virale. In altri termini, gli mRNA contenuti nei vaccini soddisfano pienamente la definizione di "profarmaco" come riportato ad esempio nel Dizionario Merriam-Webster: "una sostanza farmacologicamente inattiva che si converte nell'organismo (come per azione enzimatica) in una sostanza farmacologicamente attiva" [18], che è il caso dell'mRNA derivato dal vaccino, convertito in proteina S attiva dai ribosomi attraverso la loro attività catalitica della peptidiltransferasi che lega insieme gli amminoacidi portando alla sintesi proteica. Secondo la classificazione convenzionale dei profarmaci [19], i vaccini a mRNA COVID-19 potrebbero essere classificati come profarmaci di tipo I poiché subiscono una conversione intracellulare. La localizzazione tissutale in cui avviene la conversione è tuttavia incerta, poiché il meccanismo catalitico che porta alla sintesi proteica è comune a tutte le cellule di tutti i tessuti e organi, con la notevole eccezione degli eritrociti, che non hanno ribosomi, ma comprese per esempio le piastrine, che mantengono la capacità di sintetizzare le proteine grazie a un piccolo pool di ribosomi ereditati dai loro precursori megacariociti [20]. La traduzione dell'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2 in proteina S attiva potrebbe quindi, in linea di principio, avvenire in qualsiasi parte del corpo, come suggerito anche dalla capacità delle formulazioni di mRNA di nanoparticelle lipidiche di entrambi i preparati BioNTech/Pfizer e Moderna di raggiungere praticamente qualsiasi organo e tessuto negli studi preclinici di biodistribuzione nei roditori [1,2].

I profarmaci mancano dell'attività farmacologica delle loro parti attive; tuttavia possono contribuire al profilo generale di sicurezza e tossicità del prodotto farmaceutico, pertanto la loro valutazione è solitamente inclusa nella valutazione complessiva dei nuovi preparati [19].

4.1 Farmacologia dell'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2

L'mRNA della proteina SARS-CoV-2 S contenuto nei vaccini mRNA COVID-19 ha una farmacologia complessa. L'argomento è stato recentemente oggetto di un'eccellente revisione della letteratura incentrata sulla possibilità che i vaccini a mRNA alla fine alterino i genomi delle cellule umane attraverso la retroposizione e l'integrazione [21]. L'autore conclude sollecitando esperimenti che affrontino specificamente il problema di sicurezza legato alla possibile integrazione nel genoma [21]. In effetti, è stata recentemente descritta l'integrazione di copie del DNA di sequenze di SARS-CoV-2 nel genoma delle cellule umane infette e sono state rilevate trascrizioni chimeriche in tessuti derivati da pazienti [22], una scoperta che ha sollevato polemiche e dibattiti accesi [22] 23-25]. Peraltro, recentemente è stato pubblicato un caso clinico che mostra la persistenza dell'RNA e di antigeni di SARS-CoV-2 nell'appendice, nella pelle e nei tessuti del seno di due pazienti che hanno mostrato sintomi di "long COVID-19" 163 e 426 giorni dopo l'insorgenza dei

sintomi [26] . Di notevole interesse il fatto che la trascrizione inversa intracellulare del vaccino a mRNA BioNTech/Pfizer COVID-19 sia stata mostrata *in vitro* nella linea cellulare di fegato umano Huh7 [27], sebbene la sua rilevanza sia ancora in attesa di essere valutata in modelli *in vivo* [28]. Tuttavia, la questione merita un'attenta considerazione alla luce, ad esempio, della presenza dell'mRNA del vaccino e della proteina S indotta dal vaccino nei linfonodi ascellari fino a 60 giorni dopo entrambi i vaccini mRNA-1273 o BNT162b2 COVID-19 [9] così come della presenza della proteina S nei monociti circolanti di soggetti vaccinati con sintomi simil-PASC molti mesi dopo la vaccinazione [11].

4.2 Farmacologia della proteina S

La traduzione dell'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2 contenuto nei vaccini a mRNA COVID-19 provoca la produzione endogena di proteina S. I principali bersagli molecolari della proteina S sono elencati nella Tabella 1.

Tabella 1. Bersagli molecolari della proteina S di SARS-CoV-2.

Bersaglio	Concentrazioni attive	Bibliografia
ACE2 ¹	1.58-120 nM (K _D ²)	[29,30]
CD147	185 nM (K _D ²)	[31]
TLR4 ³	300 nM (K _D ²)	[32]
TLR2 ⁴	500 ng/ml (6.5 nM) ⁵	[33]
ERα ⁶	9.7 nM (K _D ²)	[34]

¹ enzima di conversione dell'angiotensina 2; ² K_D = costante di dissociazione all'equilibrio, una costante che misura la propensione del complesso ligando/bersaglio legato a dissociarsi a ligando libero e bersaglio e corrisponde alla concentrazione di ligando necessaria per legare il 50% del bersaglio disponibile; ³ recettore toll-like 4; ⁴ recettore toll-like 2; ⁵ concentrazione attiva negli esperimenti funzionali; ⁶ recettore alfa degli estrogeni.

4.2.1. Enzima di conversione dell'angiotensina 2 (ACE2)

L'ACE2 è una peptidasi che metabolizza il peptide vasocostrittore angiotensina II trasformandolo nel peptide vasodilatatore angiotensina (1-7). ACE2 esiste sia in forma solubile che in forma legata alla membrana, quest'ultima espressa in molti organi tra cui il tratto gastrointestinale, il rene e il cuore. L'ingresso intracellulare di SARS-CoV dipende dal legame della proteina S con ACE2 [35]. Il legame della proteina S indotta dal vaccino all'ACE2 come potenziale fattore scatenante per l'aggregazione piastrinica, la trombosi e l'infiammazione, nonché per l'ipertensione e altre malattie cardiovascolari è stato oggetto di approfondite revisioni [36,37].

4.2.2. CD147

CD147 è una glicoproteina transmembrana della superfamiglia delle immunoglobuline che è stato suggerito possa mediare l'ingresso di SARS-CoV-2 nelle cellule ospiti mediante endocitosi [31]. L'interazione della proteina S di SARS-CoV-2 con CD147 altera la funzione dei periciti cardiaci umani attraverso la stimolazione della fosforilazione/attivazione della chinasi 1/2 regolata dal segnale extracellulare (ERK1/2), e rappresenta così un potenziale meccanismo aggiuntivo di danno microvascolare indotto dalla proteina S [38]. La proteina S compromette la funzione dei periciti cardiaci alla concentrazione di 1 microg/ml, quindi in un intervallo di concentrazione nanomolare, in accordo con l'affinità riportata della proteina S per CD147 (Tabella 1). Durante il COVID-19, l'interazione proteina S-CD147 pare essere coinvolta nel danno ai cardiomiociti [39] così come nell'alterazione della morfologia degli eritrociti con conseguente sindrome da iperviscosità [40] e anemia emolitica [41], e forse anche nei processi neurodegenerativi [42]. La rilevanza di questi risultati per la sicurezza della proteina S indotta dal vaccino non è mai stata finora considerata.

4.2.3. TLR

I recettori toll-like (TLR) sono un gruppo di proteine transmembrana, appartenenti alla famiglia dei recettori di riconoscimento dei profili microbici, che riconoscono specifici profili molecolari associati ai patogeni e avviano cascate intracellulari di segnalazione che portano alla secrezione di interferone di tipo I, citochine infiammatorie e chemochine [43]. Diversi TLR possono essere implicati nel COVID-19 e negli effetti dei vaccini COVID-19, tuttavia le prove più solide indicano al momento TLR4 e TLR2 come TLR maggiormente coinvolti.

Studi di docking molecolare hanno documentato che il trimero della proteina S si lega direttamente a TLR4 [32]. Il legame tra proteina S e TLR4 attiva i segnali dipendenti da TLR4, con conseguente aumento dell'espressione di membrana di ACE2 e potenziamento dell'ingresso di SARS-CoV-2, nonché un potenziamento diretto della risposta iperinfiammatoria coinvolta nel danno polmonare, nella miocardite e nel danno multi-organo [44].

TLR2 è stato implicato nell'aumento della produzione di citochine e chemochine infiammatorie nei macrofagi umani e di topo e nelle cellule epiteliali polmonari dopo l'esposizione *in vitro* alla proteina S [33]. Di particolare rilievo, le cellule epiteliali che esprimono la proteina S intracellulare sono non-infiammatorie, ma provocano una risposta infiammatoria nei macrofagi quando vengono co-coltivate con questi ultimi. Il coinvolgimento di TLR2 è indicato in questi esperimenti dall'attivazione della via NF- κ B e dalla mancanza di risposta alla proteina S nei macrofagi carenti di Tlr2 [33].

Il ruolo del legame della proteina S con TLR4 o TLR2 negli effetti dei vaccini COVID-19 non è mai stato studiato, tuttavia esiste almeno uno studio preliminare che mostra che la vaccinazione di soggetti sani con il vaccino BioNTech/Pfizer COVID-19 mRNA ha ridotto la risposta delle cellule immunitarie innate ai ligandi TLR4 e TLR7/8, aumentando le risposte delle citochine indotte da miceti [45]. Eventuali implicazioni cliniche di questi risultati sono attualmente sconosciute.

4.2.4. ER α

Utilizzando una metodologia standard di microarray proteico e analisi cinetiche di risonanza plasmonica di superficie, è stato recentemente documentato che la proteina S di SARS-CoV-2 si lega con il recettore alfa degli estrogeni ad alta affinità (ER α) [34]. Lo studio, attualmente disponibile come pre-print in bioRxiv e in PubMed Central, include anche esperimenti *in vitro* in linee cellulari coltivate. Di particolare rilevanza, la proteina S alla concentrazione di 10 ng/ml (circa 0,13 nM) aumenta la proliferazione della linea cellulare di carcinoma mammario MCF-7 attraverso l'attivazione di ER come suggerito dalla capacità del raloxifene, un potente e selettivo modulatore dei ER, di bloccare questo effetto [34]. La rilevanza clinica dell'interazione proteina S-ER α è suggerita da esperimenti *post mortem* nei tessuti polmonari di roditori e umani infettati da SARS-CoV-2 che mostrano una maggiore espressione di ER α e colocalizzazione della proteina S con ER α nei macrofagi alveolari [34]. La possibilità che la proteina S di SARS-CoV-2 sia dotata di proprietà simili agli estrogeni fornisce nuovi indizi per l'interpretazione delle irregolarità mestruali comunemente osservate dopo la vaccinazione COVID-19 [46]. D'altra parte, i composti estrogenici sono fattori consolidati nell'inizio e nella progressione del cancro al seno [47], quindi l'elevata affinità della proteina S per ER α dovrebbe incoraggiare indagini approfondite su qualsiasi possibile influenza dell'infezione da SARS-CoV-2 come così come della vaccinazione COVID-19 sul cancro al seno.

4.2.5. La proteina S di SARS-CoV-2 da sola modifica direttamente la funzionalità di cellule umane

La proteina S di SARS-CoV-2 esercita effetti diretti sulle cellule umane anche in assenza di altri componenti virali [48]. Ad esempio, il trattamento delle cellule muscolari lisce dell'arteria polmonare umana o delle cellule endoteliali con la subunità S1 della proteina S di SARS-CoV-2 S alla concentrazione di 10 ng/ml (0,13 nM) attiva i segnali della crescita cellulare, un effetto coerente con l'ispessimento della parete vascolare polmonare

che si riscontra in pazienti deceduti per COVID-19 [49]. Un altro studio ha mostrato che la trasfezione transitoria della linea cellulare epiteliale alveolare di polmone umano A549 o della linea cellulare epiteliale di fegato umano Huh7.5 con la proteina S di SARS-CoV-2 provoca una maggiore attivazione dei fattori di trascrizione proinfiammatori NF- κ B e AP-1, e delle protein chinasi attivate dal mitogeno p38 e ERK, con conseguente aumento del rilascio di interleuchina (IL)-6, attraverso la regolazione negativa dell'espressione della proteina ACE2 e la successiva attivazione dei recettori dell'angiotensina II di tipo 1 [50]. Linee cellulari transfettate transitoriamente con la proteina S di SARS-CoV-2 rispecchiano le conseguenze della produzione endogena indotta dal vaccino della proteina S, mentre esperimenti *in vitro* con la proteina SARS-CoV-2 S rispecchiano i possibili effetti della proteina S libere nel plasma e nei fluidi extracellulari.

In sintesi, sia l'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2 che la stessa proteina S mostrano un profilo farmacologico complesso con potenziali problemi tossicologici. Nessuno di questi aspetti, però, è stato preso in considerazione negli studi che hanno portato all'autorizzazione all'immissione in commercio dei vaccini a mRNA COVID-19 [1,2], proprio perché, prima di tutto dal punto di vista normativo e regolatorio, questi prodotti sono stati trattati come vaccini convenzionali.

5. I vaccini a mRNA COVID-19 come prodotti farmaceutici: implicazioni regolatorie

Definire la natura dei vaccini mRNA COVID-19, se vaccini convenzionali o farmaci, non è solo una questione di confronto di opinioni scientifiche. Le agenzie di regolamentazione (FDA, EMA, ecc. NdT) hanno definito a priori questi prodotti come vaccini convenzionali e, di conseguenza, hanno fatto riferimento alle linee guida applicabili sui prodotti vaccinali [51,52] quando si è trattato di valutare le domande di autorizzazione all'immissione in commercio dei vaccini COVID-19. Le linee guida sulla valutazione dei vaccini si concentrano ovviamente sulla loro capacità di stimolare il sistema immunitario, poiché sono destinate a trattare solo antigeni e preparati antigenici senza altri effetti prevedibili, mentre le linee guida sulla valutazione dei farmaci richiedono una valutazione globale della farmacodinamica, farmacocinetica e farmacologia clinica.

5.1 Valutazione preclinica

Secondo le linee guida dell'OMS sulla valutazione non clinica dei vaccini [51], "Uno studio farmacodinamico per un prodotto vaccinale viene generalmente condotto per valutare l'immunogenicità. Tuttavia, uno studio farmacodinamico può estendersi anche alla farmacologia di un adiuvante" (pagina 43), "Gli studi di tossicità dovrebbero affrontare il potenziale del prodotto di causare reazioni infiammatorie locali e possibili effetti sui linfonodi drenanti, tossicità sistemica e sul sistema immunitario" (pagina 47), "Normalmente non sono necessari studi di genotossicità per la formulazione finale del vaccino" (pagina 50) e "Studi farmacocinetici (ad es. per determinare le concentrazioni sieriche o tissutali dei componenti del vaccino) normalmente non lo sono necessari" (pagina 51).

Per confronto, le linee guida del Consiglio internazionale per l'armonizzazione dei requisiti tecnici per i prodotti farmaceutici per uso umano (ICH) riguardanti gli studi non clinici per la successiva conduzione di studi clinici sull'uomo e l'autorizzazione all'immissione in commercio di prodotti farmaceutici [53] raccomandano "studi farmacodinamici primari (in vivo e/ o in vitro) [...] destinati a studiare la modalità di azione e/o gli effetti di una sostanza in relazione al target terapeutico desiderato" nonché "studi di farmacologia di sicurezza [inclusa] la valutazione degli effetti sulla sistema cardiovascolare, nervoso centrale e respiratorio" (pag. 5). Sono inoltre necessari studi tossicocinetici e farmacocinetici (inclusi assorbimento, distribuzione, metabolismo ed escrezione), nonché sulla tossicità acuta e a dosi ripetute e gli studi di genotossicità sono obbligatori sia come saggi per la mutazione genica (per supportare lo sviluppo clinico a dose singola negli studi clinici) o anche saggi per il danno cromosomico in cellule di mammiferi (per studi di sviluppo clinico a dose multipla).

Il complesso profilo farmacologico sia dell'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2 contenuto nei vaccini COVID-19 che della risultante proteina S, insieme all'evidenza della loro biodistribuzione sistemica, si adatta meglio alla valutazione completa raccomandata per i prodotti farmaceutici, rispetto alla valutazione incentrata sulle sole proprietà immunogeniche richiesta per i vaccini convenzionali. Sfortunatamente, quest'ultimo approccio di valutazione è stato scelto come riferimento per i vaccini a mRNA COVID-19, come esplicitamente indicato nei rapporti di valutazione dell'EMA [1,2]. Di conseguenza, la valutazione preclinica di questi prodotti non ha incluso studi farmacodinamici secondari, studi farmacologici di sicurezza, studi farmacodinamici di interazione farmacologica, studi farmacocinetici o di biodistribuzione tradizionali e/o studi di genotossicità, e tutte queste omissioni sono definite accettabili/concordi con gli orientamenti del comitato EMA per i medicinali per uso umano (CHMP). In particolare, i rapporti di valutazione dell'EMA non menzionano mai alcuna delle proprietà farmacologiche e funzionali dell'mRNA della proteina SARS-CoV-2 S e/o della proteina S descritte sopra nella Sezione 4.

5.2 Valutazione clinica

Le Linee guida dell'OMS sulla valutazione clinica dei vaccini [52] sono coerenti con le linee guida non cliniche dell'OMS e trattano in primo luogo la valutazione dell'immunogenicità e della conseguente efficacia protettiva dei candidati vaccini. Una delle differenze più notevoli con le linee guida ICH per i prodotti farmaceutici è che *"la raccolta di dati sui test di laboratorio di routine (analisi ematologiche, chimiche e delle urine) non è necessaria in molti studi clinici sui vaccini"* (pagina 564). Infatti, i test clinici di laboratorio sono stati eseguiti solo nella piccola fase I dei programmi di sperimentazione, in cui sono state arruolate solo poche decine di partecipanti. Anche un campione così piccolo è stato peraltro sufficiente per identificare diverse alterazioni nei test di laboratorio: ad esempio, lo studio di fase I BioNTech/Pfizer ha registrato diminuzioni di grado 3 in una percentuale tra l'8,3% e il 33,3% dei partecipanti nella conta dei linfociti in ciascun gruppo di dosaggio, e neutropenia di grado 2 in altri due partecipanti [54]. Nonostante tali risultati, nessuna valutazione clinica di laboratorio è stata successivamente inclusa nello studio di fase III [55].

L'importanza delle valutazioni cliniche di laboratorio nella valutazione complessiva della sicurezza di qualsiasi nuovo farmaco è ben spiegata nelle linee guida ICH. Secondo il Common Technical Document (CTD) Efficacy (M4E) [56], che descrive la struttura e il formato dei dati clinici in una nuova domanda di farmaci, la segnalazione dettagliata dei cambiamenti nei modelli dei test di laboratorio, tra cui *"ematologia, chimica clinica, analisi delle urine e altri dati, se del caso"*, sono cruciali per l'interpretazione degli eventi avversi osservati. In particolare, il CTD raccomanda chiaramente di considerare *"risultati di laboratorio che riflettono effetti medici gravi effettivi o possibili"*, poiché *"l'esame di quali soggetti presentano anomalie estreme dei valori di laboratorio ("outliers") può essere utile per identificare sottogruppi di individui tutti coloro che sono particolarmente a rischio di determinati eventi avversi"* (sezione 2.7.4.2.1 Analisi degli eventi avversi).

Esistono studi spontanei che suggeriscono l'utilità dei test di laboratorio dopo la vaccinazione per caratterizzare meglio gli effetti indotti dai vaccini COVID-19, e anche per identificare soggetti potenzialmente a rischio per lo sviluppo di reazioni avverse clinicamente rilevanti. Ad esempio, uno studio su 281 soggetti vaccinati, di cui 143 vaccinati con il vaccino BioNTech/Pfizer, ha mostrato che il 6,8% (5,6% di coloro che hanno ricevuto il vaccino BioN-Tech/Pfizer) è risultato positivo agli anticorpi anti-PF4/polianione post-vaccinazione [57]. Gli anticorpi anti-PF4/polianione sono associati alla trombocitopenia trombotica immunitaria indotta dal vaccino (VITT) e sebbene in questo studio i livelli anticorpali non siano mai stati sufficientemente alti da indurre l'aggregazione piastrinica, i soggetti con anticorpi anti-PF4/polianione potrebbero essere considerati un sottogruppo a rischio per VITT, e di conseguenza a questi potrebbe essere offerto un monitoraggio a lungo termine ed eventualmente un trattamento tempestivo in caso di problemi. Un altro studio, che ha preso in considerazione 566 pazienti seguiti in una clinica cardiologica per la valutazione del rischio cardiovascolare, ha documentato un aumento di vari marcatori

infiammatori noti per predire il rischio a 5 anni di sindromi coronariche acute a seguito di vaccini BioNTech/Pfizer o Moderna mRNA [58], suggerendo l'opportunità di valutare il valore predittivo di questi *marker* per l'identificazione di soggetti a rischio di eventi cardiovascolari. Come ulteriore esempio, sono stati trovati marcatori di attivazione piastrinica e aumento delle citochine pro-infiammatorie nel sangue di 50 pazienti che hanno manifestato sequele post-acute di sintomi simili a COVID-19 (PASC) in seguito ai vaccini SARS-CoV-2, ma non in 10 soggetti sani né in 35 soggetti vaccinati senza sintomi simil-PASC [11]. Merita considerazione la possibilità che questo profilo di test di laboratorio rappresenti un biomarcatore per uno specifico di eventi avversi a seguito della vaccinazione COVID-19.

La mancata inclusione delle valutazioni cliniche di laboratorio nella valutazione dei vaccini COVID-19 ha portato molti governi e istituzioni a considerare questa "assenza di prove come prova di assenza", e di conseguenza a sconsigliare di eseguire qualsiasi tipo di esame prima o dopo le vaccinazioni (e in alcuni casi anche a raccomandare di non farne proprio). Un esempio lampante in Italia è la posizione adottata dalla Federazione nazionale degli ordini dei medici chirurghi e dei dentisti (FNOMCeO) [59].

5.3 Valutazione della sicurezza post-commercializzazione

I vaccini COVID-19 a mRNA sono stati inclusi nell'elenco di monitoraggio aggiuntivo dell'EMA in quanto contengono nuove sostanze attive non contenute in nessun precedente medicinale autorizzato e sono approvati con un'autorizzazione all'immissione in commercio condizionata [1,2]. Tuttavia, sebbene i piani di gestione del rischio per questi prodotti includano alcuni studi specifici aggiuntivi, ad es. su miocardite/pericardite, sicurezza nei soggetti pediatrici e in gravidanza, la maggior parte della valutazione della sicurezza *post-marketing* si basa essenzialmente sulle attività relative alla ricezione e revisione delle segnalazioni individuali di eventi avversi spontaneamente inviate da medici, altri operatori sanitari nonché dai cittadini [60,61].

Questo approccio soffre di due limiti principali. Il primo è il noto *underreporting* (sottosegnalazione, NdT) che in tempi "normali" è stato stimato nell'ordine dell'82-98% di tutti gli eventi avversi, e ancora più alto per gli eventi gravi [62]. Nel caso dei vaccini COVID-19, tale sottostima può essere tuttavia ancora più drammatica ed estrema. Diamo un'occhiata all'ultimo rapporto italiano sulla sorveglianza dei vaccini COVID-19 [63], che riassume circa un anno e mezzo di monitoraggio. Apparentemente il rapporto include il 93% di segnalazioni spontanee e un ulteriore 7% di segnalazioni provenienti da studi non specificati di "farmacovigilanza attiva", forse gli studi aggiuntivi menzionati dall'EMA nei suoi piani di gestione del rischio sopra menzionati. La questione chiave è tuttavia che, mentre l'AIFA segnala circa 100 eventi avversi sospetti ogni 100.000 dosi somministrate, nello stesso periodo il sistema di sorveglianza attiva statunitense v-safe ha registrato circa 68.600 reazioni locali e 52.700 reazioni sistemiche ogni 100.000 dosi dopo la prima dose, e 71.700 reazioni locali e 70.800 reazioni sistemiche per 100.000 dosi dopo la seconda dose, che fa 70.300 per 100.000 reazioni locali e 61.750 per 100.000 reazioni sistemiche [64]. Prendendo i dati v-safe come riferimento, il sistema di segnalazione spontanea AIFA soffre di circa il 99,92% di sottosegnalazione, ovvero meno di 1 evento avverso su 1.000 segnalato al sistema. La sottosegnalazione è ancora maggiore in caso di eventi avversi gravi (vale a dire quegli eventi che richiedono un intervento per prevenire danni o menomazioni permanenti, comportano disabilità o danni permanenti, richiedono o prolungano il ricovero, provocano anomalie congenite/difetti congeniti, provocano la morte), poiché l'AIFA segnala 3,8 eventi gravi ogni 100.000 dosi e invece v-safe 17.700 per 100.000 dosi, ovvero 4.650 segnalazioni in v-safe per ogni segnalazione in AIFA. Così, nonostante il monitoraggio aggiuntivo dell'EMA, prendendo come riferimento l'Italia (e infatti un riferimento lo è, dato che è costantemente tra i Paesi con il più alto numero assoluto di segnalazioni relative ai vaccini COVID-19 incluse nel sistema EudraVigilance - <https://www.adrreports.eu/>), è probabile che nei sistemi di farmacovigilanza per questi prodotti manchino

più di 999 eventi avversi di qualsiasi gravità su mille e più di 4.998 eventi avversi gravi su cinquemila.

La sottostima nella sorveglianza *post-marketing* dei vaccini COVID-19 è tuttavia un problema minore rispetto alle conseguenze di considerare i vaccini COVID-19 come vaccini convenzionali e non come farmaci. Qualsiasi segnalazione spontanea di eventi avversi sospetti deve infatti essere sottoposta a una valutazione formale di causalità del caso, che si basa tuttavia su procedure profondamente diverse per i vaccini convenzionali e per i farmaci. Come affermato nelle linee guida dell'Osservatorio di Uppsala per la valutazione standardizzata della causalità per i farmaci, "*Poiché la farmacovigilanza è particolarmente interessata al rilevamento di reazioni avverse sconosciute e inaspettate, altri criteri come la conoscenza precedente e la probabilità statistica giocano un ruolo meno importante nel sistema*" [65] Al contrario, le linee guida dell'OMS per la valutazione della causalità di un evento avverso dopo l'immunizzazione (AEFI) affermano che "*due domande critiche nell'algoritmo di causalità dell'OMS rivisto, vale a dire: "Ci sono prove pubblicate letteratura sottoposta a revisione paritaria che questo vaccino può causare un tale evento se somministrato correttamente? e "In questo paziente, l'evento si è verificato entro una finestra di tempo plausibile dopo la somministrazione del vaccino?". È importante considerare i tassi di base per il verificarsi di un evento di interesse e quindi, dopo che una popolazione ha ricevuto il vaccino, determinare se il tasso osservato di quell'evento è superiore ai tassi di base*" [66]. Il confronto di queste due frasi introduttive mostra chiaramente come la valutazione di causalità per i farmaci miri espressamente a identificare eventuali reazioni avverse "*sconosciute e inaspettate*", e a tal fine si afferma chiaramente che "*conoscenze pregresse e probabilità statistica*" non sono questioni chiave. D'altra parte, la valutazione della causalità per i vaccini convenzionali considera "*le prove nella letteratura pubblicata sottoposta a revisione paritaria*" come un prerequisito e richiede che "*il tasso osservato di quell'evento sia superiore ai tassi di base*". Il prerequisito richiesto per i vaccini è una specie di *catch 22* (dal titolo di un romanzo (1961) dello scrittore statunitense J. Heller (1923–99)), ovvero un evento avverso potrebbe essere correlato ai vaccini a condizione che la letteratura scientifica pubblichi eventi simili legati al vaccino, cosa che tuttavia difficilmente si verificherà fino a quando la relazione non sarà riconosciuta. Infatti, in generale, le linee guida per la valutazione della causalità per i vaccini convenzionali sono state ampiamente criticate perché sin dall'inizio della valutazione raccomandano di considerare tutte le possibili "*altre cause*" che potrebbero spiegare l'evento avverso ed escludere quindi il ruolo del vaccino. Successivamente, anche se esisteva una plausibilità biologica e una compatibilità temporale per un'associazione causale tra il vaccino e l'evento, le linee guida chiedono di cercare ogni possibile evidenza che il vaccino non possa aver causato quell'evento. Le linee guida dell'OMS per i vaccini sono quindi molto rigide e tendono ad escludere i vaccini [67,68]. Le conseguenze di questo approccio metodologico saranno illustrate e discusse prendendo come esempio la miopericardite associata al vaccino COVID-19.

5.3.1. Le miopericarditi come casi di studio

Fino a giugno 2021, i *Centers for Disease Control and Prevention* degli Stati Uniti hanno ritenuto possibile l'associazione tra vaccini a mRNA COVID-19 e miocardite, tuttavia con un'incidenza di circa 0,5 casi ogni 100.000 sulla base di segnalazioni spontanee [69]. Ad agosto 2021, tuttavia, i dati di una rete di 40 ospedali a Washington, Oregon, Montana e Los Angeles County, California, hanno mostrato che gli accessi in pronto soccorso e i ricoveri con diagnosi di miocardite o pericardite dopo i vaccini COVID-19 erano almeno 1 caso ogni 100.000 vaccinato per miocardite e 1,8 per pericardite [70], fornendo così evidenza diretta della sottosegnalazione al sistema di farmacovigilanza del CDC, per quanto lo studio non ha comprendesse i casi verificatisi in contesti assistenziali esterni e i casi di miocardite o pericardite subclinica. Molti altri studi hanno successivamente affrontato il problema utilizzando grandi database sanitari e riportando cifre ancora più elevate [ad es. 71 e 72]. Alcuni studi hanno anche mirato a confrontare i vaccini COVID-19 e i rischi associati al COVID-19: un esempio importante si basa sui dati del database inglese

National Immunisation (NIMS) della vaccinazione COVID-19 [73]. Gli autori hanno collegato i dati del database NIMS, a livello di singolo paziente, ai dati nazionali per mortalità, ricoveri ospedalieri e infezione da SARS-CoV-2, rilevando ad esempio che nella popolazione generale il vaccino BioNTech/Pfizer, il vaccino Moderna e l'infezione da SARS-CoV-2 erano associati rispettivamente a 1, 16 e 40 miocarditi ogni 1.000.000 di persone esposte e che nelle persone di età inferiore ai 40 anni i casi in eccesso per 1.000.000 di persone esposte erano rispettivamente 5, 23 e 10 [73]. Di notevole importanza, tuttavia, è il fatto che la valutazione del rischio associato ai vaccini COVID-19 implica solitamente l'esclusione preliminare di persone con pregressa miopericardite nonché di persone con precedente COVID-19, in accordo implicito con le linee guida AEFI dell'OMS che favoriscono l'esistenza di cause alternative escludendo quindi qualsiasi ruolo per i vaccini [66], e in contrasto con le linee guida dell'Osservatorio di Uppsala per i farmaci, che considerano piuttosto malattie pregresse e/o comorbidità solo come potenziali concause [65]. In effetti, uno studio basato sui dati del National Health Data System (SNDS) francese, che copre oltre il 99% della popolazione francese, ha recentemente dimostrato che l'*odds ratio* per la miocardite o pericardite associata ai vaccini a mRNA COVID-19 era in media rispettivamente di 6,3 e 3,9 per le persone con una storia di infezione da SARS-CoV-2 nei 30 giorni precedenti e fino a 140 e 250 per quelle con una storia di miocardite o pericardite [74].

Un'altra conseguenza delle raccomandazioni fornite dalle linee guida AEFI dell'OMS è la necessità di identificare in anticipo una finestra temporale di aumento del rischio basata su un qualche tipo di plausibilità biologica [66]. Di solito, si prevede che la maggior parte delle reazioni avverse ai vaccini convenzionali si verifichi a causa di risposte infiammatorie e immunitarie eccessive o distorte, quindi le finestre temporali sono strette. Nella maggior parte degli studi sui vaccini COVID-19, compresi gli esempi discussi sopra, le finestre temporali sono generalmente fissate a due settimane dopo ciascuna dose o in alcuni casi a 4-6 settimane dopo il completamento del ciclo di vaccinazione. Una finestra temporale così ristretta è adottata anche da organismi regolatori, come ad esempio l'Agenzia italiana del farmaco (AIFA), che dichiara apertamente che una finestra temporale di appena due settimane vale anche per eventi gravi e fatali [75]. Una stima approssimativa delle conseguenze di questo approccio restrittivo è fornita da un recente studio nelle banche dati sanitarie nazionali del Dipartimento per gli affari dei veterani degli Stati Uniti che valuta la frequenza di una serie di eventi avversi gravi in un periodo di 38 settimane dopo i vaccini a mRNA COVID-19 [76]. I risultati mostrano il verificarsi di 1.512,9 eventi ogni 10.000 con il prodotto BioNTech/Pfizer e di 1.422,3 eventi ogni 10.000 con il prodotto Moderna, con un eccesso nel gruppo BioNTech/Pfizer di 10,9 ictus ischemici, 14,8 infarti del miocardio, 11,3 altri eventi tromboembolici, e 17,1 lesioni renali, per un totale di 53,1 eventi avversi gravi ogni 10.000 soggetti vaccinati, ovvero circa 1 su 200. Questi risultati sono in qualche modo in accordo con un'analisi secondaria degli eventi avversi gravi negli studi clinici di fase III randomizzati e controllati con placebo sui vaccini BioNTech/Pfizer e Moderna a mRNA COVID-19 negli adulti. I ricercatori si sono concentrati sugli eventi avversi di particolare interesse della Brighton Collaboration [77]. I vaccini BioNTech/Pfizer e Moderna a mRNA sono stati associati a un aumento assoluto del rischio di eventi avversi gravi di particolare interesse di 12,5 per 10.000, sulla base di un *follow up* mediano di circa 2 mesi, e - per confronto - con una riduzione del rischio di ricovero per COVID-19 rispetto al gruppo placebo di 2,3 (BioNTech/Pfizer) e 6,4 (Moderna) per 10.000 partecipanti [77].

In sintesi, fondare la valutazione della sicurezza *post-marketing* dei vaccini a mRNA COVID-19 solo su sistemi di segnalazione di eventi avversi spontanei è probabilmente affetto da un livello senza precedenti di sottosegnalazione. Inoltre, l'utilizzo delle linee guida AEFI dell'OMS per la valutazione della causalità delle segnalazioni porta probabilmente a trascurare gran parte delle informazioni rilevanti, principalmente a causa dell'imposizione di finestre temporali troppo ristrette dopo le vaccinazioni, nonché dell'atteggiamento esplicitamente rivolto a identificare precedenti malattie e/o comorbidità come

spiegazioni alternative piuttosto che come potenziali concause/fattori di rischio [66]. In particolare, per quanto riguarda le finestre temporali, come già discusso nella sezione 2, crescenti evidenze mostrano che la proteina S derivata dal vaccino persiste per diversi mesi dopo le vaccinazioni, soprattutto nei soggetti con eventi avversi conseguenti alla vaccinazione [8,11,12]. La presenza della proteina S derivata dal vaccino specificamente nelle biopsie endomiocardiche di pazienti con miocardite fino a quasi due mesi dopo la vaccinazione COVID-19 appare a tal proposito paradigmatica [10].

Infine, un recente studio che ricerca sistematicamente gli effetti cardiovascolari in 301 studenti, di età compresa tra 13 e 18 anni e che hanno ricevuto la seconda dose del vaccino BioNTech/Pfizer a mRNA COVID-19, fornisce un'eccellente evidenza di ciò che può essere ottenuto attraverso un approccio di monitoraggio intensivo della sicurezza: 7 partecipanti (2,3%) hanno mostrato almeno un biomarcatore cardiaco elevato o valutazioni di laboratorio positive, 1 partecipante aveva miopericardite, 2 partecipanti avevano sospetta pericardite e 4 partecipanti avevano sospetta miocardite subclinica [78]. Queste evidenze indicano che è quanto meno irrealistico confrontare la frequenza degli effetti avversi dopo la vaccinazione rispetto all'infezione da SARS-CoV-2 sulla base delle informazioni attualmente disponibili sui vaccini.

6. Conclusioni

La traduzione dell'mRNA vaccinale si verifica potenzialmente e, soprattutto, in modo imprevedibile in qualsiasi tessuto e organo, e si può facilmente ipotizzare che una produzione inappropriata nei tessuti vulnerabili possa rappresentare un importante fattore di rischio per il danno tissutale locale, che porta a miocardite, neuropatie centrali e periferiche, vasculopatie, miopatie, endocrinopatie e altre malattie, a seconda della localizzazione e della quantità di espressione della proteina S (o della distribuzione locale dalla circolazione generale). Inoltre, è noto che tessuti distinti differiscono ampiamente nell'efficienza della sintesi proteica, ma nessuno finora ha valutato se e in che misura ciò possa essere rilevante per l'efficacia e la sicurezza dei vaccini a mRNA [79]. Ad esempio, sono state sviluppate tecniche di marcatura metabolica per misurare la velocità della sintesi proteica nel muscolo umano in condizioni di alterata massa e funzione muscolare [80], e potrebbe essere interessante sviluppare approcci simili per prevedere la produzione di proteina S dopo la vaccinazione COVID-19. La conoscenza della biodistribuzione della proteina S indotta dal vaccino potrebbe anche essere di grande aiuto nella definizione del miglior regime vaccinale individuale, in termini di dose e di intervallo di tempo tra le dosi. Abbiamo recentemente stimato una probabile clearance (CL) della proteina S sulla base di dati sperimentali ottenuti con altri peptidi [15], tuttavia sarebbe facile misurare direttamente la CL della proteina S nell'uomo mediante approcci semplici e convenzionali già utilizzati per altri farmaci. Una conoscenza dettagliata della biodistribuzione e del destino della proteina S indotta dal vaccino nell'organismo consentirebbe l'integrazione della sua farmacocinetica e farmacodinamica, consentendo così la descrizione del decorso temporale dei suoi effetti in singoli soggetti, consentendo probabilmente ad es. l'individualizzazione della dose e della somministrazione nonché la tempestiva identificazione dei soggetti a rischio di effetti avversi maggiori. La farmacogenetica di meccanismi e bersagli sensibili come il meccanismo ribosomiale coinvolto nella traduzione dell'RNA in proteina S, nonché i polimorfismi del recettore ACE2 [81] dovrebbero essere incorporati nel modello.

Sfortunatamente, al momento non abbiamo quasi nessuna delle informazioni necessarie per affrontare e gestire tutti questi aspetti e per utilizzare i vaccini a mRNA COVID-19 in modo consapevole, mirato e razionale. Il presente documento è stato scritto con l'obiettivo di fornire una guida per definire una priorità dei vari studi necessari per questi prodotti, per valutarne il profilo farmaco-tossicologico, la loro biodistribuzione, la farmacologia clinica e la sicurezza, utilizzando approcci appropriati sviluppati per i farmaci. Abbiamo discusso del profilo farmacologico e funzionale dell'mRNA per la proteina S di SARS-CoV-2 contenuta nei vaccini e della proteina S derivata dal vaccino, tuttavia siamo

ben consapevoli che la valutazione farmacologica e clinica di questi farmaci deve tenere conto anche della loro preparazione farmaceutica, che si basa sull'incapsulamento dell'mRNA in nanoparticelle lipidiche (LNP) di nuova concezione. Le LNP probabilmente contribuiscono alla reattogenicità e all'immunogenicità di questi prodotti e il loro potenziale proinfiammatorio è motivo di preoccupazione [82]. Inoltre, le LNP sono cruciali per la stabilità dell'mRNA ed è notevole che la struttura dell'mRNA incapsulato nelle LNP rimanga in gran parte ancora da definire [83]. Se e in che misura tali incertezze influiscano sulla stabilità dell'mRNA e sulla qualità farmaceutica complessiva di questi prodotti è un'altra questione che deve essere affrontata per migliorarne l'uso [84,85].

Un'altra questione chiave con importanti implicazioni per la qualità e la sicurezza dei vaccini a mRNA COVID-19 riguarda l'autorizzazione dei cosiddetti vaccini "adattati" che dovrebbero proteggere dalle varianti emergenti di SARS-CoV-2 [86,87]. Tali prodotti sono stati autorizzati a seguito dei risultati di piccoli studi di immunogenicità incentrati sui livelli e sull'attività neutralizzante in vitro degli anticorpi circolanti dopo la vaccinazione [88]. Considerando tuttavia le questioni sopra discusse, riguardanti il profilo farmacologico dell'mRNA della proteina S di SARS-CoV-2 e dei prodotti farmaceutici risultanti, i rischi connessi al ritenere i prodotti sicuri in quanto "si tratta solo di un'altra sequenza di mRNA" dovrebbero essere evidenti.

In sintesi, abbiamo evidenziato le insidie di aver considerato finora i vaccini a mRNA COVID-19 solo come vaccini convenzionali e abbiamo indicato le valutazioni precliniche, cliniche e di sicurezza *post-marketing* che sono più urgenti. I vaccini a mRNA COVID-19 sono in realtà non vaccini convenzionali bensì farmaci, e di conseguenza la loro farmacocinetica e farmacodinamica, ed eventualmente anche la loro farmacogenetica, devono essere adeguatamente caratterizzate [89], per fornire un solido supporto di conoscenze per il loro uso razionale e mirato, interrompendo così il rischio di "giocare a dadi" con questi prodotti nella convinzione errata che lo stesso vaccino alla stessa dose faccia bene a tutti e che gli effetti avversi si verifichino per caso. Una valutazione corretta, rigorosa e completa dei vaccini a mRNA COVID-19 sarà di fondamentale importanza per rassicurare il pubblico sul loro uso sicuro ed efficace, contribuendo eventualmente anche a superare l'esitazione vaccinale.

Author Contributions: MC wrote the first draft of the manuscript, FM provided critical intellectual content for the final version of the manuscript. All authors had full access to the information described in the manuscript and approved its final version.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Ringraziamenti: Gli autori sono grati ai revisori anonimi che, attraverso la loro critica perspicace, hanno contribuito notevolmente a promuovere il migliore sviluppo di molte delle questioni discusse in questo articolo. Siamo inoltre debitori della Commissione Medico Scientifica Indipendente (CMSI - <https://cmsindipendente.it/>) ed in particolare del Dr. Alberto Donzelli per il confronto tra AIFA e sistema v-safe nella valutazione della sicurezza *post-marketing* dei vaccini a mRNA COVID-19 (sezione 5.3).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. European Medicines Agency. Comirnaty Assessment Report. 2020. EMA/707383/2020. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/comirnaty-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 8 September 2022).
2. European Medicines Agency. COVID-19 Vaccine Moderna Assessment Report. 2021. EMA/15689/2021. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/covid-19-vaccine-moderna-epar-public-assessment-report_en.pdf (accessed on 8 September 2022).

3. Lindsay, K.E., Bhosle, S.M., Zurla, C., Beyersdorf, J., Rogers, K.A., Vanover, D., Xiao, P., Araínga, M., Shirreff, L.M., Pitard, B., Baumhof, P., Villinger, F., Santangelo, P.J. Visualization of early events in mRNA vaccine delivery in non-human primates via PET-CT and near-infrared imaging. *Nat Biomed Eng* **2019**, *3*, 371-380. 607-609
4. Bahl, K., Senn, J.J., Yuzhakov, O., Bulychev, A., Brito, L.A., Hassett, K.J., Laska, M.E., Smith, M., Almarsson, Ö., Thompson, J., Ribeiro, A.M., Watson, M., Zaks, T., Ciaramella, G. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses. *Mol Ther* **2017**, *25*, 1316-1327. 610-612
5. Lowe D. Spike protein behaviour. Science blogs, published on 4 May 2021. Available online: <https://www.science.org/content/blog-post/spike-protein-behavior> (accessed on 8 September 2022). 613-614
6. Anonymous. How long do mRNA and spike proteins last in the body?. Nebraska Medicine, published on 2 July 2021. Available online: <https://www.nebraskamed.com/COVID/where-mrna-vaccines-and-spike-proteins-go> (accessed on 8 September 2022). 615-616
7. Ogata, A.F., Cheng, C.A., Desjardins, M., Senussi, Y., Sherman, A.C., Powell, M., Novack, L., Von, S., Li, X., Baden, L.R., Walt, D.R. Circulating Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Vaccine Antigen Detected in the Plasma of mRNA-1273 Vaccine Recipients. *Clin Infect Dis* **2022**, *74*, 715-718. 617-619
8. Appelbaum, J., Arnold, D.M., Kelton, J.G., Gernsheimer, T., Jevtic, S.D., Ivetic, N., Smith, J.W., Nazy, I. SARS-CoV-2 spike-dependent platelet activation in COVID-19 vaccine-induced thrombocytopenia. *Blood Adv* **2022**, *6*, 2250-2253. 620-621
9. Röltgen, K., Nielsen, S.C.A., Silva, O., Younes, S.F., Zaslavsky, M., Costales, C., Yang, F., Wirz, O.F., Solis, D., Hoh, R.A., Wang, A., Arunachalam, P.S., Colburg, D., Zhao, S., Haraguchi, E., Lee, A.S., Shah, M.M., Manohar, M., Chang, I., Gao, F., Mallajosyula, V., Li, C., Liu, J., Shoura, M.J., Sindher, S.B., Parsons, E., Dashdorj, N.J., Dashdorj, N.D., Monroe, R., Serrano, G.E., Beach, T.G., Chinthrajah, R.S., Charville, G.W., Wilbur, J.L., Wohlstadter, J.N., Davis, M.M., Pulendran, B., Troxell, M.L., Sigal, G.B., Natkunam, Y., Pinsky, B.A., Nadeau, K.C., Boyd, S.D. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. *Cell* **2022**, *185*, 1025-1040. 622-626
10. Baumeier, C., Aleshcheva, G., Harms, D., Gross, U., Hamm, C., Assmus, B., Westenfeld, R., Kelm, M., Rammos, S., Wenzel, P., Münzel, T., Elsässer, A., Gailani, M., Perings, C., Bourakkadi, A., Flesch, M., Kempf, T., Bauersachs, J., Escher, F., Schultheiss, H.P. Intramyocardial Inflammation after COVID-19 Vaccination: An Endomyocardial Biopsy-Proven Case Series. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, 6940. 628-631
11. Patterson, B.K., Francisco, E.B., Yogendra, R., Long, E., Pise, A., Beatyn, C., Osgood, E., Bream, J., Kreimer, M., Vander Heide, R., Guevara-Coto, J., Mora, R., Mora, J. SARS-CoV-2 S1 Protein Persistence in SARS-CoV-2 Negative Post-Vaccination Individuals with Long COVID/ PASC-Like Symptoms, 12 July 2022, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1844677/v1>] 632-635
12. Yamamoto, M., Kase, M., Sano, H., Kamijima, R., Sano, S. Persistent varicella zoster virus infection following mRNA COVID-19 vaccination was associated with the presence of encoded spike protein in the lesion. *J Cutan Immunol Allergy* **2022**, *00*, 1–6. <https://doi.org/10.1002/cia2.12278> 636-638
13. Magen, E., Mukherjee, S., Bhattacharya, M., Detroja, R., Merzon, E., Blum, I., Livoff, A., Shlapobersky, M., Baum, G., Talisman, R., Cherniavsky, E., Dori, A., Frenkel-Morgenstern, M. Clinical and Molecular Characterization of a Rare Case of BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine-Associated Myositis. *Vaccines* **2022**, *10*, 1135. 639-641
14. Trougakos, I.P., Terpos, E., Alexopoulos, H., Politou, M., Paraskevis, D., Scorilas, A., Kastiritis, E., Andreakos, E., Dimopoulos, M.A. Adverse effects of COVID-19 mRNA vaccines: the spike hypothesis. *Trends Mol Med* **2022**, *28*, 542-554. 642-643
15. Cosentino, M., Marino, F. The spike hypothesis in vaccine-induced adverse effects: questions and answers. *Trends Mol Med* **2022**, (in press). 644-645
16. Meyer, R.A., Neshat, S.Y., Green, J.J., Santos, J.L., Tuesca, A.D. Targeting strategies for mRNA delivery. *Materials Today Advances* **2022**, *14*, 100240. 646-647
17. Merriam-Webster Dictionary. Vaccine. Available online: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/vaccine> (accessed on 28 August 2022), and for comparison: Merriam-Webster Dictionary. Vaccine – screenshot taken on 18 January 2021 and saved by web.archive.org. Available online: <https://web.archive.org/web/20210118194713/https://www.merriam-webster.com/dictionary/vaccine> (accessed on 8 September 2022). 648-651
18. Merriam-Webster Dictionary. Prodrug. Available online: <https://www.merriam-webster.com/dictionary/prodrug> (accessed on 8 September 2022). 652-653
19. Wu, K.M., Farrelly, J.G. Regulatory perspectives of Type II prodrug development and time-dependent toxicity management: nonclinical Pharm/Tox analysis and the role of comparative toxicology. *Toxicology* **2007**, *236*, 1-6. 654-655
20. Mills, E.W., Green, R., Ingolia, N.T. Slowed decay of mRNAs enhances platelet specific translation. *Blood* **2017**, *129*, e38-e48. 656
21. Domazet-Lošo, T. mRNA Vaccines: Why Is the Biology of Retroposition Ignored? *Genes (Basel)* **2022**, *13*, 719. 657
22. Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M.I., Hughes, S.H., Young, R.A., Jaenisch, R. Reverse-transcribed SARS-CoV-2 RNA can integrate into the genome of cultured human cells and can be expressed in patient-derived tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2105968118. 658-660
23. Yan, B., Chakravorty, S., Mirabelli, C., Wang, L., Trujillo-Ochoa, J.L., Chauss, D., Kumar, D., Lionakis, M.S., Olson, M.R., Wobus, C.E., Afzali, B., Kazemian, M. Host-Virus Chimeric Events in SARS-CoV-2-Infected Cells Are Infrequent and Artifactual. *J Virol* **2021**, *95*, e0029421. 661-663
24. Parry, R., Gifford, R.J., Lytras, S., Ray, S.C., Coin, L.J.M. No evidence of SARS-CoV-2 reverse transcription and integration as the origin of chimeric transcripts in patient tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2109066118. 664-665

25. Zhang, L., Richards, A., Barrasa, M.I., Hughes, S.H., Young, R.A., Jaenisch, R. Reply to Briggs et al.: Genomic integration and expression of SARS-CoV-2 sequences can explain prolonged or recurrent viral RNA detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2021**, *118*, e2114995118. 666
26. Goh, D., Lim, J.C.T., Fernández, S.B., Craig, R.J., Edwards, S.G., Neo Zhen, W., Lee, J.N., Guerrero Caballero, S., Lau, M.C., Yeong Joe, P.S. Case report: Persistence of residual antigen and RNA of the SARS-CoV-2 virus in tissues of two patients with long COVID. *Front Immunol* **2022**, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.939989> 667
27. Aldén, M., Olofsson Falla, F., Yang, D., Barghouth, M., Luan, C., Rasmussen, M., De Marinis, Y. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr Issues Mol Biol* **2022**, *44*, 1115-1126. 668
28. Merchant, H.A. Comment on Aldén et al. Intracellular Reverse Transcription of Pfizer BioNTech COVID-19 mRNA Vaccine BNT162b2 In Vitro in Human Liver Cell Line. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2022**, *44*, 1115-1126. *Curr Issues Mol Biol* **2022**, *44*, 1661-1663. 669
29. Yang, J., Petitjean, S.J.L., Koehler, M., Zhang, Q., Dumitru, A.C., Chen, W., Derclaye, S., Vincent, S.P., Soumillion, P., Alsteens, D. Molecular interaction and inhibition of SARS-CoV-2 binding to the ACE2 receptor. *Nat Commun* **2020**, *11*, 4541. 670
30. Ozono, S., Zhang, Y., Ode, H., Sano, K., Tan, T.S., Imai, K., Miyoshi, K., Kishigami, S., Ueno, T., Iwatani, Y., Suzuki, T., Tokunaga, K. SARS-CoV-2 D614G spike mutation increases entry efficiency with enhanced ACE2-binding affinity. *Nat Commun* **2021**, *12*, 848. 671
31. Wang, K., Chen, W., Zhang, Z., Deng, Y., Lian, J.Q., Du, P., Wei, D., Zhang, Y., Sun, X.X., Gong, L., Yang, X., He, L., Zhang, L., Yang, Z., Geng, J.J., Chen, R., Zhang, H., Wang, B., Zhu, Y.M., Nan, G., Jiang, J.L., Li, L., Wu, J., Lin, P., Huang, W., Xie, L., Zheng, Z.H., Zhang, K., Miao, J.L., Cui, H.Y., Huang, M., Zhang, J., Fu, L., Yang, X.M., Zhao, Z., Sun, S., Gu, H., Wang, Z., Wang, C.F., Lu, Y., Liu, Y.Y., Wang, Q.Y., Bian, H., Zhu, P., Chen, Z.N. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. *Signal Transduct Target Ther* **2020**, *5*, 283. 672
32. Zhao Y, Kuang M, Li J, Zhu L, Jia Z, Guo X, Hu Y, Kong J, Yin H, Wang X, You F. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Res* **2021**, *31*, 818-820. 673
33. Khan, S., Shafiei, M.S., Longoria, C., Schoggins, J.W., Savani, R.C., Zaki, H. SARS-CoV-2 spike protein induces inflammation via TLR2-dependent activation of the NF-kappaB pathway. *Elife* **2021**, *10*, e68563. 674
34. Solis, O., Beccari, A.R., Iaconis, D., Talarico, C., Ruiz-Bedoya, C.A., Nwachukwu, J.C., Cimini, A., Castelli, V., Bertini, R., Montopoli, M., Cocetta, V., Borocci, S., Prandi, I.G., Flavahan, K., Bahr, M., Napiorkowski, A., Chillemi, G., Ooka, M., Yang, X., Zhang, S., Xia, M., Zheng, W., Bonaventura, J., Pomper, M.G., Hooper, J.E., Morales, M., Rosenberg, A.Z., Nettles, K.W., Jain, S.K., Allegretti, M., Michaelides, M. The SARS-CoV-2 spike protein binds and modulates estrogen receptors. *bioRxiv* **2022**, 2022.05.21.492920. doi: 10.1101/2022.05.21.492920. 675
35. Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T.S., Herrler, G., Wu, N.H., Nitsche, A., Müller, M.A., Drosten, C., Pöhlmann, S. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* **2020**, *181*, 271-280.e8. 676
36. Angeli, F., Spanevello, A., Reboldi, G., Visca, D., Verdecchia, P. SARS-CoV-2 vaccines: Lights and shadows. *Eur J Intern Med* **2021**, *88*, 1-8. 677
37. Angeli, F., Reboldi, G., Trapasso, M., Zappa, M., Spanevello, A., Verdecchia, P. COVID-19, vaccines and deficiency of ACE2 and other angiotensinases. Closing the loop on the "Spike effect". *Eur J Intern Med* **2022**, *103*, 23-28. 678
38. Avolio, E., Carrabba, M., Milligan, R., Kavanagh Williamson, M., Beltrami, A.P., Gupta, K., Elvers, K.T., Gamez, M., Foster, R.R., Gillespie, K., Hamilton, F., Arnold, D., Berger, I., Davidson, A.D., Hill, D., Caputo, M., Madeddu, P. The SARS-CoV-2 Spike protein disrupts human cardiac pericytes function through CD147 receptor-mediated signalling: a potential non-infective mechanism of COVID-19 microvascular disease. *Clin Sci (Lond)* **2021**, *135*, 2667-2689. 679
39. Abdi, A., AlOtaiby, S., Badarin, F.A., Khraibi, A., Hamdan, H., Nader, M. Biomed Interaction of SARS-CoV-2 with cardiomyocytes: Insight into the underlying molecular mechanisms of cardiac injury and pharmacotherapy. *Pharmacother* **2022**, *146*, 112518. 680
40. Al-Kuraisy, H.M., Al-Gareeb, A.I., Al-Hamash, S.M., Cavalu, S., El-Bouseary, M.M., Sonbol, F.I., Batiha, G.E. Changes in the Blood Viscosity in Patients With SARS-CoV-2 Infection. *Front Med (Lausanne)* **2022**, *9*, 876017. 681
41. Al-Kuraisy, H.M., Al-Gareeb, A.I., Kaushik, A., Kujawska, M., Batiha, G.E. Hemolytic anemia in COVID-19. *Ann Hematol* **2022**, *101*, 1887-1895. 682
42. Zalpoor, H., Akbari, A., Samei, A., Forghaniesfidvajani, R., Kamali, M., Afzalnia, A., Manshoury, S., Heidari, F., Pornour, M., Khoshmirisafa, M., Aazami, H., Seif, F. The roles of Eph receptors, neuropilin-1, P2X7, and CD147 in COVID-19-associated neurodegenerative diseases: inflammasome and Jak inhibitors as potential promising therapies. *Cell Mol Biol Lett* **2022**, *27*, 10. 683
43. Fitzgerald, K.A., Kagan, J.C. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell* **2020**, *180*, 1044-1066. 684
44. Aboudounya, M.M., Heads, R.J. COVID-19 and Toll-Like Receptor 4 (TLR4): SARS-CoV-2 May Bind and Activate TLR4 to Increase ACE2 Expression, Facilitating Entry and Causing Hyperinflammation. *Mediators Inflamm* **2021**, *2021*, 8874339. 685
45. Konstantin Föhse, F., Geckin, B., Overheul, G.J., van de Maat, J., Kilic, G., Bulut, O., Dijkstra, H., Lemmers, H., Sarlea, S.A., Reijnders, M., Hoogerwerf, J., ten Oever, J., Simonetti, E., van de Veerdonk, F.L., Joosten, L.A.B., Haagmans, B.L., van Crevel, R., Li, Y., van Rij, R.P., GeurtsvanKessel, C., de Jonge, M.I., Dominguez-Andrés, J., Netea, M.G. The BNT162b2 mRNA vaccine against SARS-CoV-2 reprograms both adaptive and innate immune responses. *medRxiv* 2021.05.03.21256520; doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.03.21256520> 686

46. Laganà, A.S., Veronesi, G., Ghezzi, F., Ferrario, M.M., Cromi, A., Bizzarri, M., Garzon, S., Cosentino, M. Evaluation of menstrual irregularities after COVID-19 vaccination: Results of the MECOVAC survey. *Open Med (Wars)* **2022**, *17*, 475-484. 726
47. Fernandez, S.V., Russo, J. Estrogen and xenoestrogens in breast cancer. *Toxicol Pathol* **2010**, *38*, 110-122. 727
48. Suzuki, Y.J., Gychka, S.G. SARS-CoV-2 Spike Protein Elicits Cell Signaling in Human Host Cells: Implications for Possible Consequences of COVID-19 Vaccines. *Vaccines (Basel)* **2021**, *9*, 36. 728
49. Suzuki, Y.J., Nikolaienko, S.I., Dibrova, V.A., Dibrova, Y.V., Vasylyk, V.M., Novikov, M.Y., Shults, N.V., Gychka, S.G. SARS-CoV-2 spike protein-mediated cell signaling in lung vascular cells. *Vascul Pharmacol* **2021**, *137*, 106823. 729
50. Patra, T., Meyer, K., Geerling, L., Isbell, T.S., Hoft, D.F., Brien, J., Pinto, A.K., Ray, R.B., Ray, R. SARS-CoV-2 spike protein promotes IL-6 trans-signaling by activation of angiotensin II receptor signaling in epithelial cells. *PLoS Pathog* **2020**, *16*, e1009128. 730
51. WHO Guideline on nonclinical evaluation of vaccines, WHO Technical Report Series, No. 927, 2005. Available online: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/biologicals/annex1nonclinical.p31-63.pdf> (accessed on 8 September 2022). 731
52. WHO Guidelines on clinical evaluation of vaccines: regulatory expectations, WHO Technical Report Series 1004, Annex 9, 2017. Available online: <https://cdn.who.int/media/docs/default-source/prequal/vaccines/who-trs-1004-web-annex-9.pdf> (accessed on 8 September 2022). 732
53. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals. M3(R2) Current Step 4 version, dated 11 June 2009. Available online: https://database.ich.org/sites/default/files/M3_R2_Guideline.pdf (accessed on 8 September 2022). 733
54. Mulligan, M.J., Lyke, K.E., Kitchin, N., Absalon, J., Gurtman, A., Lockhart, S., Neuzil, K., Raabe, V., Bailey, R., Swanson, K.A., Li, P., Koury, K., Kalina, W., Cooper, D., Fontes-Garfias, C., Shi, P.Y., Türeci, Ö., Tompkins, K.R., Walsh, E.E., Frenck, R., Falsey, A.R., Dormitzer, P.R., Gruber, W.C., Şahin, U., Jansen, K.U. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* **2020**, *586*, 589-593. 734
55. BioNTech/Pfizer. PF-07302048 (BNT162 RNA-Based COVID-19 Vaccines) - Protocol C4591001. Available online: https://cdn.pfizer.com/pfizercom/2020-11/C4591001_Clinical_Protocol_Nov2020.pdf (accessed on 8 September 2022). 735
56. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Revision of M4E guideline on enhancing the format and structure of benefit-risk information in ICH efficacy. M4E(R2) Current Step 4 version, dated 15 June 2016. Available online: https://database.ich.org/sites/default/files/M4E_R2_Guideline.pdf (accessed on 8 September 2022). 736
57. Thiele, T., Ulm, L., Holtfreter, S., Schönborn, L., Kuhn, S.O., Scheer, C., Warkentin, T.E., Bröker, B.M., Becker, K., Aurich, K., Selleng, K., Hübner, N.O., Greinacher, A. Frequency of positive anti-PF4/polyanion antibody tests after COVID-19 vaccination with ChAdOx1 nCoV-19 and BNT162b2. *Blood* **2021**, *138*, 299-303. 737
58. Gundry, S.R. Observational Findings of PULS Cardiac Test Findings for Inflammatory Markers in Patients Receiving mRNA Vaccines. *Circulation* **2021**, *144*, A10712. 738
59. Villa, R. Prima del vaccino contro Covid-19 è meglio assumere farmaci? 12 May 2021. Available online: <https://dottoremaeveroche.it/assumere-farmaci-prima-vaccino-covid/> (accessed on 8 September 2022). 739
60. European Medicines Agency. Comirnaty : EPAR - Risk-management-plan. First published: 23/12/2020; Last updated: 13/04/2022. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/comirnaty-epar-risk-management-plan_en.pdf (accessed on 8 September 2022). 740
61. European Medicines Agency. Spikevax (previously COVID-19 Vaccine Moderna): EPAR - Risk-management-plan (PDF/2.22 MB) (updated). First published: 20/01/2021; Last updated: 02/09/2022. Available online: https://www.ema.europa.eu/en/documents/rmp-summary/spikevax-previously-covid-19-vaccine-moderna-epar-risk-management-plan_en.pdf (accessed on 8 September 2022). 741
62. Hazell, L., Shakir, S.A. Under-Reporting of Adverse Drug Reactions. *Drug Safety* **2006**, *29*, 385-396. 742
63. AIFA. Rapporto sulla Sorveglianza dei vaccini anti-COVID-19 n. 12. 27/12/2020 - 26/06/2022. Available online: https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1315190/Rapporto_sorveglianza_vaccini_COVID-19_12.pdf (accessed on 8 September 2022). 743
64. Rosenblum, H.G., Gee, J., Liu, R., Marquez, P.L., Zhang, B., Strid, P., Abara, W.E., McNeil, M.M., Myers, T.R., Hause, A.M., Su, J.R., Markowitz, L.E., Shimabukuro, T.T., Shay, D.K. Safety of mRNA vaccines administered during the initial 6 months of the US COVID-19 vaccination programme: an observational study of reports to the Vaccine Adverse Event Reporting System and v-safe. *Lancet Infect Dis* **2022**, *22*, 802-812. 744
65. Uppsala Monitoring Center. The use of the WHO-UMC system for standardised case causality assessment. 6 April 2018. Available online: https://who-umc.org/media/164200/who-umc-causality-assessment_new-logo.pdf (accessed on 21 August 2022). 745
66. World Health Organization. Causality assessment of an adverse event following immunization (AEFI): user manual for the revised WHO classification second edition, 2019 update. Geneva: World Health Organization; 2019. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Available online: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241516990> (accessed on 8 September 2022). 746
67. Bellavite, P. Causality assessment of adverse events following immunization: the problem of multifactorial pathology. *F1000Res* **2020**, *9*, 170. 747
68. Puliyl, J., Naik, P. Revised World Health Organization (WHO)'s causality assessment of adverse events following immunization-a critique. *F1000Res* **2018**, *7*, 243. 748
69. Wallace, M., Oliver, S. COVID-19 mRNA vaccines in adolescents and young adults: benefit-risk discussion. Slide 28. Published June 23, 2021. Available online: <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/meetings/downloads/slides-2021-06/05-COVID-Wallace-508.pdf> (accessed on 8 September 2022). 749

70. Diaz, G.A., Parsons, G.T., Gering, S.K., Meier, A.R., Hutchinson, I.V., Robicsek, A. Myocarditis and Pericarditis After Vaccination for COVID-19. *JAMA* **2021**, *326*, 1210-1212. 786
787
71. Barda, N., Dagan, N., Ben-Shlomo, Y., Kepten, E., Waxman, J., Ohana, R., Hernán, M.A., Lipsitch, M., Kohane, I., Netzer, D., Reis, B.Y., Balicer, R.D. Safety of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine in a Nationwide Setting. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 1078-1090. 788
789
790
72. Mevorach, D., Anis, E., Cedar, N., Bromberg, M., Haas, E.J., Nadir, E., Olsha-Castell, S., Arad, D., Hasin, T., Levi, N., Asleh, R., Amir, O., Meir, K., Cohen, D., Dichtiar, R., Novick, D., Hershkovitz, Y., Dagan, R., Leitersdorf, I., Ben-Ami, R., Miskin, I., Saliba, W., Muhsen, K., Levi, Y., Green, M.S., Keinan-Boker, L., Alroy-Preis, S. Myocarditis after BNT162b2 mRNA Vaccine against Covid-19 in Israel. *N Engl J Med* **2021**, *385*, 2140-2149. 791
792
793
794
73. Patone, M., Mei, X.W., Handunnetthi, L., Dixon, S., Zaccardi, F., Shankar-Hari, M., Watkinson, P., Khunti, K., Harnden, A., Coupland, C.A.C., Channon, K.M., Mills, N.L., Sheikh, A., Hippisley-Cox, J. Risks of myocarditis, pericarditis, and cardiac arrhythmias associated with COVID-19 vaccination or SARS-CoV-2 infection. *Nat Med* **2022**, *28*, 410-422. 795
796
797
74. Le Vu, S., Bertrand, M., Jabagi, M.J., Botton, J., Drouin, J., Baricault, B., Weill, A., Dray-Spira, R., Zureik, M. Age and sex-specific risks of myocarditis and pericarditis following Covid-19 messenger RNA vaccines. *Nat Commun* **2022**, *13*, 3633. 798
799
75. AIFA. Rapporto annuale sulla sicurezza dei vaccini anti-COVID-19. 27/12/2020 - 26/12/2021. Available online: https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1315190/Rapporto_annuale_su_sicurezza_vaccini%20anti-COVID-19.pdf (accessed on 8 September 2022). 800
801
802
76. Dickerman, B.A., Madenci, A.L., Gerlovin, H., Kurgansky, K.E., Wise, J.K., Figueroa Muñiz, M.J., Ferolito, B.R., Gagnon, D.R., Gaziano, J.M., Cho, K., Casas, J.P., Hernán, M.A. Comparative Safety of BNT162b2 and mRNA-1273 Vaccines in a Nationwide Cohort of US Veterans. *JAMA Intern Med* **2022**, *182*, 739-746. 803
804
805
77. Fraiman, J., Erviti, J., Jones, M., Greenland, S., Whelan, P., Kaplan, R.M., Doshi, P. Serious adverse events of special interest following mRNA COVID-19 vaccination in randomized trials in adults. *Vaccine* **2022**, S0264-410X(22)01028-3. doi: 10.1016/j.vaccine.2022.08.036. Online ahead of print. 806
807
808
78. Mansanguan, S., Charunwatthana, P., Piyaphanee, W., Dechkhajorn, W., Poolcharoen, A., Mansanguan, C. Cardiovascular Manifestation of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine in Adolescents. *Trop Med Infect Dis* **2022**, *7*, 196. 809
810
79. Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B.L., Tam, Y.K., Madden, T.D., Hope, M.J., Weissman, D. Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *J Control Release* **2015**, *217*, 345-351. 811
812
813
80. Hellerstein, M., Evans, W. Recent advances for measurement of protein synthesis rates, use of the 'Virtual Biopsy' approach, and measurement of muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **2017**, *20*, 191-200. 814
815
81. Möhlendick, B., Schönfelder, K., Breuckmann, K., Elsner, C., Babel, N., Balfanz, P., Dahl, E., Dreher, M., Fistera, D., Herbstreit, F., Hölzer, B., Koch, M., Kohnle, M., Marx, N., Risse, J., Schmidt, K., Skrzypczyk, S., Sutharsan, S., Taube, C., Westhoff, T.H., Jöckel, K.H., Dittmer, U., Siffert, W., Kribben, A. ACE2 polymorphism and susceptibility for SARS-CoV-2 infection and severity of COVID-19. *Pharmacogenet Genomics*. 2021; **31**: 165-171. 816
817
818
819
82. Moghimi, S.M., Simberg, D. Pro-inflammatory concerns with lipid nanoparticles. *Mol Ther* **2022**, *30*, 2109-2110. 820
83. Schoenmaker, L., Witzigmann, D., Kulkarni, J.A., Verbeke, R., Kersten, G., Jiskoot, W., Crommelin, D.J.A. mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability. *Int J Pharm* **2021**, *601*, 120586. 821
822
84. Tinari, S. The EMA covid-19 data leak, and what it tells us about mRNA instability. *BMJ* **2021**, *372*, n627. 823
85. Kudsova, L., Lansley, A., Scutt, G., Allen, M., Bowler, L., Williams, S., Lippett, S., Stafford, S., Tarzi, M., Cross, M., Okorie, M. Stability testing of the Pfizer-BioNTech BNT162b2 COVID-19 vaccine: a translational study in UK vaccination centres. *BMJ Open Sci* **2021**, *5*, e100203. 824
825
826
86. Tian, F., Tong, B., Sun, L., Shi, S., Zheng, B., Wang, Z., Dong, X., Zheng, P. N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2. *Elife* **2021**, *10*, e69091. 827
828
87. Cui, Z., Liu, P., Wang, N., Wang, L., Fan, K., Zhu, Q., Wang, K., Chen, R., Feng, R., Jia, Z., Yang, M., Xu, G., Zhu, B., Fu, W., Chu, T., Feng, L., Wang, Y., Pei, X., Yang, P., Xie, X.S., Cao, L., Cao, Y., Wang, X. Structural and functional characterizations of infectivity and immune evasion of SARS-CoV-2 Omicron. *Cell* **2022**, *185*, 860-871.e13. 829
830
831
88. European Medicines Agency. First adapted COVID-19 booster vaccines recommended for approval in the EU. News 01/09/2022. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/first-adapted-covid-19-booster-vaccines-recommended-approval-eu> (accessed on 8 September 2022). 832
833
834
89. Cosentino, M., Ferrari, M., Marino, F. Coronavirus Disease-19 Vaccines Best Reflect Effective Pharmaceuticals. *J Neuroimmune Pharmacol* **2021**, *16*, 517-518. 835
836
837