



# Gli effetti della diffusione dell'RNA autoamplificante mediata da vescicole extracellulari e un modo per mitigarli

Maurizio Federico

National Center for Global Health, Istituto Superiore di Sanità, 00161 Rome, Italy; maurizio.federico@iss.it

**Abstract:** La tecnologia basata sull'autoamplificazione (sa)RNA rappresenta l'ultima frontiera nell'utilizzo dell'RNA sintetico in vaccinologia. Tipicamente, gli saRNA sono costituiti da molecole di RNA a filamento positivo di origine virale (quasi esclusivamente da alfavirus) in cui le sequenze delle proteine strutturali vengono sostituite con sequenze che codificano per l'antigene di interesse. Per la somministrazione in vivo, vengono complessati con nanoparticelle lipidiche (LNP), proprio come gli attuali vaccini contro il COVID-19 basati su (m)RNA messaggero sintetico. Data la loro capacità di autoamplificarsi all'interno della cellula, livelli intracellulari ottimali dell'antigene immunogenico possono essere raggiunti somministrando quantità inferiori di molecole di saRNA rispetto ai vaccini a base di mRNA. Tuttavia, l'eccessivo accumulo intracellulare di saRNA può rappresentare un inconveniente rilevante poiché, come già descritto nelle cellule infettate da alfavirus, **la cellula ricevente può reagire incorporando un eccesso di molecole di RNA nelle vescicole extracellulari (EV). Queste EV possono essere rilasciate dalle cellule ed entrare in cellule vicine e distanti, dove il saRNA associato alle EV può iniziare un nuovo ciclo replicativo. Questo meccanismo potrebbe portare a una diffusione indesiderata e non necessaria di saRNA in tutto il corpo, ponendo rilevanti problemi di sicurezza.** Il presente articolo discute i meccanismi molecolari attraverso i quali i saRNA possono essere trasmessi tra diverse cellule/tessuti. Inoltre, viene proposto un modo semplice per controllare la possibile eccessiva propagazione intercellulare di saRNA attraverso la co-espressione di una proteina ancorata all'EV che inibisce la replicazione del saRNA. Sulla base delle attuali conoscenze, un miglioramento della sicurezza dei vaccini a base di saRNA appare obbligatorio per il loro utilizzo in soggetti sani.

**Keywords:** self-amplifying RNA; alphaviruses; SARS-CoV-2 vaccines; extracellular vesicles; HIV-1 Nef

## 1. Introduzione

Il 12 dicembre 2024, il "Comitato per i medicinali per uso umano" (CHMP) dell'Agenzia Europea per i Medicinali (EMA) ha raccomandato l'approvazione del medicinale Kostaive [1]. Il 12 febbraio 2025, la Commissione Europea, recependo l'indicazione dell'EMA, ne ha concesso l'autorizzazione all'immissione in commercio [2]. Kostaive è la denominazione commerciale del vaccino ARCT-154 [3, 4], che, come nel caso dei vaccini a mRNA, dovrebbe essere più appropriatamente definito come profarmaco. Si tratta di un prodotto farmaceutico basato su vescicole lipidiche contenenti molecole di RNA autoamplificanti (sa) che codificano la proteina Spike stabilizzata di SARS-CoV-2 e progettato per proteggere dalla malattia COVID-19. Grazie alla capacità di replicarsi nella cellula

bersaglio, sono sufficienti dosi inferiori di RNA per raggiungere livelli di risposta immunitaria simili a quelli indotti dall'iniezione dei vaccini anti-COVID-19 a base di (m)RNA ampiamente diffusi.

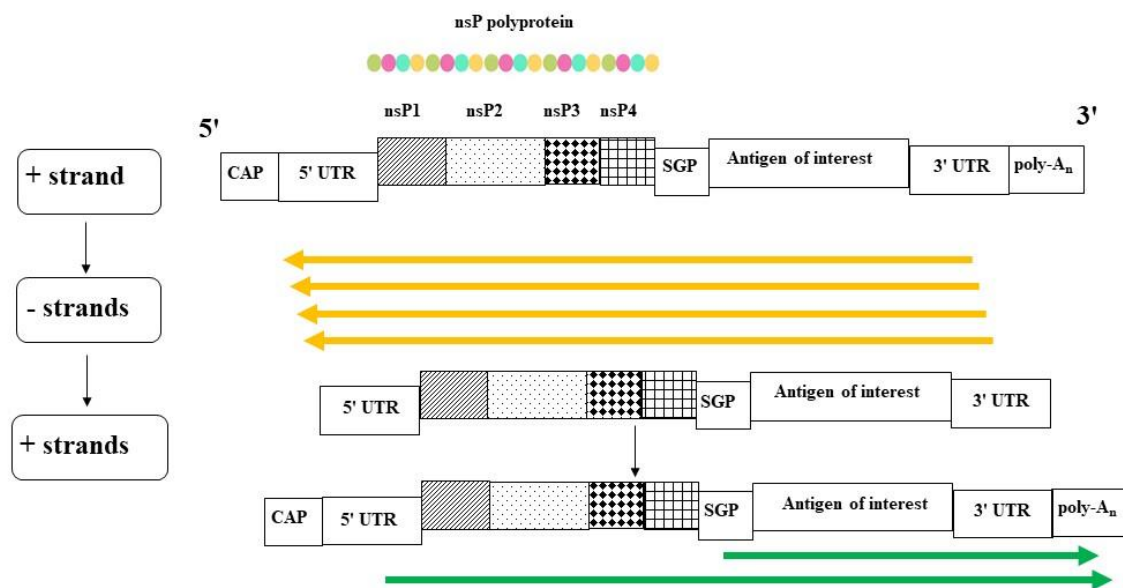
Oltre ad ARCT-154, almeno altri quattro prodotti anti-COVID-19 basati su saRNA sono in fase di studio clinico. COVAC1 [5-7] e GEMCOVAC-OM [8], entrambi esprimono la proteina Spike di SARS-CoV-2 stabilizzata a lunghezza intera, e VLPCOV-1 [9] con la sua versione migliorata VLPCOV-2 [10], che esprimono il dominio di legame al recettore Spike. Come nel caso di ARCT-154, questi prodotti derivano dal genoma del virus dell'encefalite equina venezuelana e sono incapsulati in nanoparticelle lipidiche sintetiche simili ai vaccini anti-COVID-19 a base di mRNA attualmente disponibili. A differenza di questi ultimi, tuttavia, i prodotti a base di saRNA non incorporano la 5'-metil pseudouridina nelle proprie sequenze di RNA, dati i suoi effetti inibitori sulla replicazione del saRNA [11]. La tecnologia basata sui saRNA è stata anche alla base della produzione di vaccini contro il virus della rabbia, attualmente in fase di sperimentazione clinica [12].

Da un punto di vista tecnologico, lo sviluppo di farmaci e vaccini basati sui saRNA rappresenta indubbiamente una rilevante novità. Il loro utilizzo nell'uomo è seguito di qualche anno dall'introduzione dei vaccini contro il COVID-19 a base di mRNA, che a loro volta hanno rappresentato un'importante innovazione. Come nel caso della tecnologia basata su mRNA, farmaci e vaccini a base di saRNA saranno sperimentati e applicati in diversi campi, dalle malattie infettive a quelle tumorali. Tuttavia, restano ancora da affrontare rilevanti questioni di sicurezza, soprattutto per quanto riguarda l'uso di prodotti biologicamente attivi che esprimono saRNA in esseri umani sani, considerando anche che le attuali regole per la valutazione non clinica dei vaccini non richiedono studi di farmacocinetica [13]. In questo articolo vengono riassunti i meccanismi molecolari alla base dell'attività del saRNA e della sua interazione con l'apparato multivescicolare della cellula. Vengono inoltre illustrate questioni di sicurezza ancora inesplorate, insieme a una possibile strategia per controllarle. Ottimizzare la sicurezza delle nuove biotecnologie proposte per gli esseri umani sani è una questione obbligatoria.

## 2. Il ciclo replicativo dei saRNA

La tecnologia basata sui saRNA si basa sull'ingegnerizzazione del genoma degli alfavirus, virus a RNA a filamento positivo, in particolare il virus dell'encefalite equina venezuelana, il virus della foresta di Semliki (SFV) e il virus Sindbis [14]. All'ingresso nella cellula, le molecole di saRNA possono amplificarsi esprimendo livelli elevati del gene di interesse, il che è determinante, in molti casi, per indurre una forte immunità antigene-specifica. Nel genoma degli alfavirus, le proteine replicative non strutturali sono codificate da sequenze situate all'estremità 5', mentre le sequenze all'estremità 3' codificano le proteine strutturali. L'amplificazione dei saRNA, simile al ciclo replicativo degli alfavirus [15], inizia con la traduzione delle proteine non strutturali nsP1-P4. Queste formano un complesso poliproteico che, dopo parziale scissione, sono coinvolte nella sintesi dei filamenti di RNA complementari e negativi che fungono da stampo per generare RNA messaggeri (m) genomici e sub-genomici. Questi ultimi sono specificamente dedicati alla produzione dell'antigene di interesse (Fig. 1).

Le funzioni di ciascuna delle quattro proteine non strutturali sono state studiate in modo approfondito [16]. NsP1 è un enzima di "capping" che ancora il complesso replicasi virale alle membrane cellulari. NsP2 ha una funzione elicastica, un'attività proteasica ed è coinvolta nel "packaging" dell'RNA virale.



**Figura 1.** Schema della replicazione del saRNA. All'ingresso nella cellula, le sequenze delle proteine non strutturali nsP1-P4 vengono tradotte, generando un complesso poliproteico che, dopo parziale auto-scissione, sintetizza i filamenti di RNA complementari negativi (in giallo). Questi fungono da stampo per generare RNA messaggeri (m)RNA sia genomici che sub-genomici (in verde), questi ultimi specificamente dedicati alla produzione dell'antigene di interesse. CAP: struttura del cap 5'; UTR: regione non tradotta; SGP: promotore sub-genomico; poly-A: coda poliadenilata.

NsP3 interagisce con diverse proteine delle cellule ospiti e la sua inattivazione riduce drasticamente l'efficienza di replicazione del genoma e l'espressione dell'RNA sub-genomico, influenzando così i livelli di replicazione virale. Infine, nsP4 ha attività di RNA polimerasi RNA-dipendente (RDRP).

Per produrre l'immunogeno desiderato, il genoma dell'alfavirus viene ingegnerizzato in modo che le sequenze che codificano per le proteine strutturali vengano sostituite con sequenze specifiche per il gene di interesse, ovvero quelle della proteina Spike di SARS-CoV-2 nel caso dei vaccini contro il COVID-19 a base di saRNA. In questo modo, il gene di interesse viene tradotto nella fase tardiva del ciclo di replicazione da RNA sub-genomici la cui espressione è regolata da un promotore interno sub-genomico.

Il vantaggio più evidente della tecnologia a saRNA rispetto alla tecnologia a mRNA è rappresentato dalla minore quantità di molecole di RNA da somministrare per ottenere una risposta immunitaria comparabile. Ad esempio, livelli di risposta immunitaria simili a quelli generati dall'inoculazione nei topi di un vaccino a mRNA sono stati ottenuti con una dose di saRNA più di 60 volte inferiore [17]. Nella sperimentazione clinica di fase 3, l'inoculazione di 5 µg di RNA equivalenti di saRNA ha prodotto effetti immunogenici di forza simile a quelli provocati da 30 µg di un vaccino a base di mRNA [4]. Da un punto di vista biologico, la differenza più evidente è che mentre l'mRNA artificiale, una volta entrato nella cellula, può persistere, supportato dalla ri-adenilazione indotta dall'enzima

cellulare TENT5A [18], o degradarsi gradualmente, il saRNA può riprodursi e accumularsi all'interno della cellula bersaglio.

### 3. Il destino intracellulare del saRNA e il suo caricamento nelle vescicole extracellulari

La caratteristica biologica più rilevante delle molecole di saRNA consiste nella loro capacità di replicarsi una volta internalizzate dalle cellule bersaglio. I prodotti finali del ciclo replicativo sono molecole di RNA a lunghezza intera a filamento positivo, stabilizzate da un cap 5' e poliadenilate all'estremità 3', insieme a mRNA sub-genomici che, in seguito a poliadenilazione, diventano stampi per la produzione dell'antigene di interesse.

A differenza del ciclo replicativo del virus parentale, in cui l'RNA a lunghezza intera neosintetizzato si assembla con le proteine virali strutturali neosintetizzate per formare la progenie virale, ci si aspetta che il saRNA a lunghezza intera neosintetizzato si accumuli intracellularmente, resistendo nel contempo alla rapida degradazione intracellulare. I dati della letteratura aiutano a prevedere il destino delle molecole di saRNA neosintetizzate. In particolare, risultati rilevanti sono stati ottenuti considerando i sofisticati meccanismi che le cellule attivano per rimuovere l'eccesso di molecole estranee, in particolare il sistema multivescicolare/esosomale [19, 20].

Tutte le cellule rilasciano costitutivamente vescicole di varie dimensioni, riconoscendo diverse biogenesi [21]. Le vescicole extracellulari (EV) rilasciate dalle cellule sane sono generalmente distinte in microvescicole (50-1.000 nm) ed esosomi (50-200 nm). Sia le microvescicole (anche denominate ectosomi) che gli esosomi sono vescicole costituite da doppio strato lipidico. Le prime gemmano dalla membrana plasmatica, mentre i secondi originano intracellularmente dall'invaginazione verso l'interno delle membrane degli endosomi. Questo processo induce la formazione di vescicole intraluminali (ILV), che diventano parte dei corpi multivescicolari (MVB). Possono raggiungere i lisosomi per la degradazione o la membrana plasmatica, con cui si fondono, rilasciando così il loro contenuto nell'ambiente extracellulare sotto forma di esosomi.

In origine, si pensava che le EV fossero una sorta di "contenitori di spazzatura" attraverso i quali le cellule espellono i loro rifiuti. Oggi, è ampiamente accettato che le EV siano anche componenti chiave della rete di comunicazione intercellulare. Esse incorporano mRNA, microRNA (miRNA), DNA e proteine, che possono essere funzionali nelle cellule bersaglio [22]. Grazie alla loro stabilità nei fluidi biologici, le EV possono circolare nell'organismo e la loro interazione con le cellule bersaglio può portare alla loro internalizzazione. Ciò è mediato da una vasta gamma di meccanismi, tra cui il legame a specifici recettori cellulari, la fusione con la membrana plasmatica, seguita dal rilascio del carico di esosomi direttamente nel citoplasma, la micropinocitosi, la fagocitosi e l'endocitosi mediata da clatrina, caveolina o "raft" lipidici.

Per quanto riguarda la loro composizione molecolare, alcune proteine delle EV sono specifiche di un tipo cellulare, mentre altre sono parti invariabili delle EV, indipendentemente dalla cellula di origine. Le proteine tipiche presenti nelle microvescicole sono CD40, selectine, integrine e proteine del citoscheletro. D'altra parte, gli esosomi sono arricchiti con prodotti coinvolti nella formazione di MVB (ad esempio, Alix, TSG101), nel trasporto e nella fusione di membrana (ad esempio, annessine, flotilline, GTPasi), nell'adesione (ad esempio, integrine), nelle tetraspanine (ad esempio, CD9, CD63, CD81, CD82) e nella presentazione dell'antigene (molecole MHC di classe I e II).

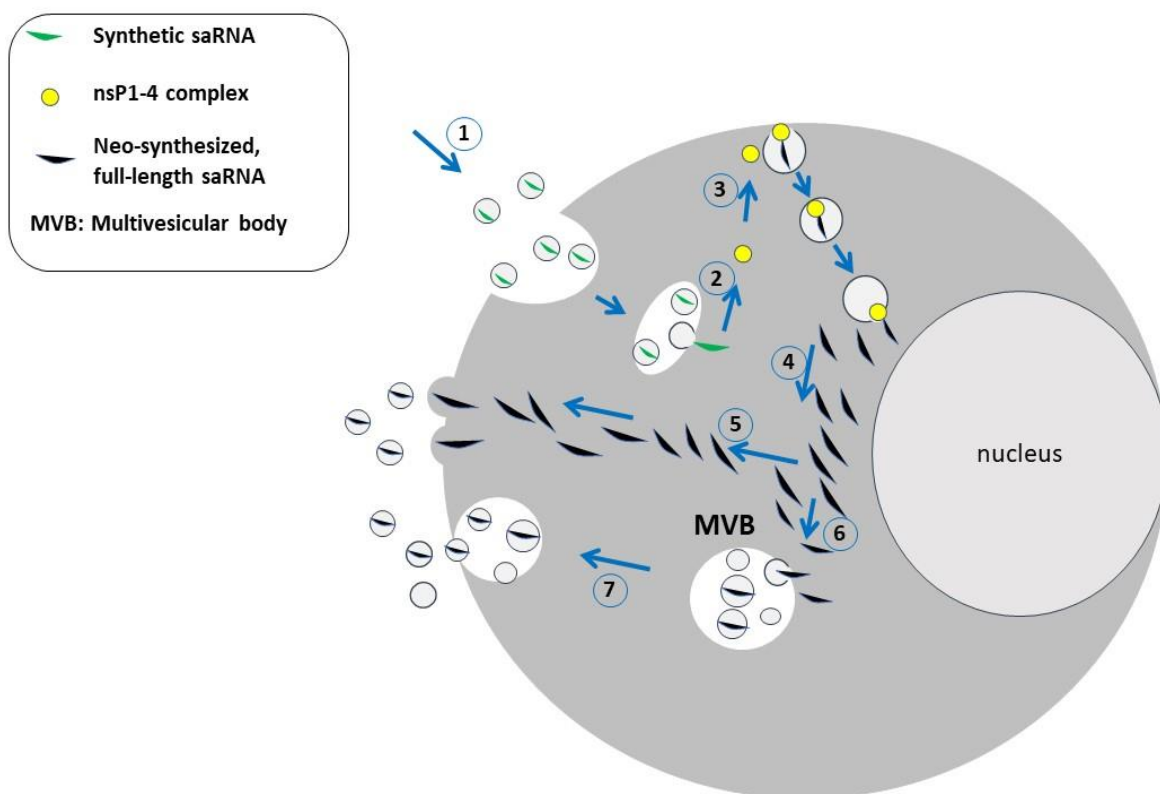
Le EV possono trasportare RNA sia a corta che a lunga catena. Oltre agli mRNA e ai microRNA, altre specie di RNA sono state trovate nelle EV, come RNA virali, Y-RNA, frammenti di tRNA, RNA mitocondriali, piccoli RNA nucleari, piccoli RNA nucleolari, RNA interagenti con piwi e lunghi RNA non codificanti [23]. I meccanismi che regolano

il caricamento specifico di specie di RNA nelle EV sono solo parzialmente noti. Il caricamento di RNA nelle EV avviene attraverso meccanismi attivi o passivi. Nel primo contesto, le proteine leganti l'RNA (RBP) svolgono un ruolo chiave nello smistamento delle molecole di RNA negli esosomi [24, 25]. È stato identificato un breve motivo nucleotidico che regola lo smistamento dell'RNA negli esosomi attraverso il legame con la proteina ubiquitaria RNP-A2B1 [26]. Successivamente, è stata rilevata una breve sequenza nucleotidica alternativa come motivo di legame per il rilascio di miRNA, mediato da hnRNP-Q, negli esosomi rilasciati dagli epatociti [27]. Insieme, queste sequenze fanno parte dei cosiddetti "Exomotif" che svolgono un ruolo essenziale nel caricamento attivo di RNA negli esosomi [28]. D'altra parte, gli RNA possono essere caricati nelle EV mediante meccanismi passivi guidati dall'elevata concentrazione intracellulare di uno specifico RNA [29]. Questo potrebbe essere il caso di molecole di saRNA neosintetizzate a lunghezza intera, il cui accumulo intracellulare dovrebbe essere elevato quanto quello successivo a un'infezione virale acuta.

#### 4. EV come veicoli di propagazione del genoma dell'alfavirus: il potenziale della diffusione del saRNA associato alle EV

Studi sia in vitro che in vivo hanno dimostrato la diffusione del genoma degli alfavirus attraverso le EV. In dettaglio, è stato riportato che sia i genomi del virus Semliki Forest che del virus Sindbis, difettivi per l'espressione delle proteine del capsido, possono propagarsi sia in cellule di mammifero che di insetto attraverso le EV [19]. Questi genomi difettivi si propagano sia in presenza che in assenza della co-espressione delle rispettive proteine Spike. È stato dimostrato che le EV che emergono dalle cellule che esprimono i genomi virali mutati incorporano l'RNA virale a filamento positivo, competente per la replicazione, e sono infettivi in vivo, dove si diffondono con maggiore efficienza nei polmoni. Conclusioni simili sono state tratte analizzando i surnatanti di cellule epiteliali infettate da un altro alfa-virus, ovvero il virus Chikungunya [20]. Sulla base di queste evidenze sperimentali, sembra più che plausibile che eventi simili si possano verificare in cellule infettate da saRNA (Fig. 2). Le EV che emergono da queste cellule possono penetrare in cellule e tessuti vicini e distanti, e la diffusione delle EV caricate con saRNA può portare a un'espansione di tipo virale. La diffusione del saRNA mediata dalle EV potrebbe anche essere favorita dal caricamento diretto negli esosomi di molecole di LNP-saRNA che sfuggono alla degradazione endosomiale, come descritto per gli mRNA che esprimono sia eritropoietina che VEGF-A [30, 31].

Sebbene questi meccanismi possano essere in qualche modo vantaggiosi per quanto riguarda l'immunogenicità desiderata, possono altresì essere considerati processi praticamente off-target. Infatti, a differenza della maggior parte delle specie virali, le EV possono penetrare nelle cellule di qualsiasi tessuto/organo, dati i loro molteplici meccanismi di ingresso cellulare. In questo scenario, l'unico ostacolo alla diffusione delle EV con saRNA sarebbe la risposta immunitaria adattativa indotta contro gli antigeni espressi dal saRNA.



**Figura 2.** Un modello del destino intracellulare del saRNA. Dopo il rilascio intracellulare, guidato dagli LNP a cui i saRNA sono complessati (1), il ciclo replicativo si avvia. Dopo il rilascio del saRNA nel citoplasma (2), il ciclo replicativo, guidato dal complesso proteico nsP1-4 neosintetizzato, avviene in siti protetti chiamati "sferule", dove il saRNA si accumula (3). Sia i filamenti di saRNA positivi genomici che quelli sub-genomici vengono quindi rilasciati nel citoplasma (4). In assenza di proteine virali strutturali con cui interagire, le molecole di saRNA genomico stabilizzate dal cap possono essere smistate in microvesicole che emergono dalla membrana plasmatica (5) e in vescicole intraluminali che si accumulano nelle membrane cellulari (MVB) (6), che vengono infine rilasciate nello spazio extracellulare (7). Il risultato finale è il rilascio delle EV che incorporano il saRNA.

Tuttavia, sia le risposte immunitarie umorali che quelle cellulari richiedono giorni per svilupparsi in modo efficiente, mentre il ciclo di replicazione del saRNA si completa in poche ore e le EV possano diffondersi in pochi minuti.

Ulteriori risultati di studi sulla biodistribuzione supportano l'idea che il saRNA possa avere un potenziale replicativo in vivo. Una singola iniezione intramuscolare nei ratti di un saRNA che esprime la glicoproteina della rabbia ha portato alla distribuzione del vaccino nei polmoni, nel fegato e nella milza entro due giorni. Significativamente, il carico di saRNA rilevato nei polmoni è aumentato di oltre cento volte al quindicesimo giorno successivo all'iniezione. Forti aumenti dei livelli di saRNA sono stati documentati anche nel fegato e nella milza otto giorni dopo l'inoculazione [32].

In un altro studio sulla biodistribuzione, le quantità di saRNA esprime l'emagglutinina del virus dell'influenza aviaria rilevate nella milza dei topi iniettati sono aumentate dal quinto al settimo giorno dopo la somministrazione intramuscolare [33]. Nel complesso, questi risultati corroborano fortemente le precedenti evidenze ottenute con genomi difettivi dei virus SFV e Sindbis.

Le conseguenze attese della diffusione del saRNA dipendono principalmente dall'attività biologica del gene di interesse espresso. Il caso della proteina SARS-CoV-2

stabilizzata richiede alcune considerazioni specifiche. In primo luogo, la presenza protratta di Spike, principalmente conseguenza della persistenza dell'mRNA del vaccino, è stata documentata nei vaccinati [34, 35], suggerendo quindi che la risposta immunitaria non può eliminare rapidamente le cellule che esprimono la proteina Spike di SARS-CoV-2. In secondo luogo, è stato suggerito che la proteina Spike di SARS-CoV-2 si associ agli esosomi [36, 37]. In tal caso, si dovrebbe indagare se gli esosomi che esprimono Spike possano essere facilitati nell'ingresso e nel rilascio di molecole di saRNA nelle cellule che esprimono ACE2, e quali siano le conseguenze di ciò. Infine, e probabilmente più importante, l'effetto dell'espressione della proteina Spike di SARS-CoV-2 diffusa nell'organismo dovrebbe essere valutato in termini di tossicità complessiva, in relazione al legame con ACE2, nonché ad altri bersagli molecolari [38], che portano a effetti indesiderati, tra cui risposte infiammatorie, disregolazione immunitaria e autoimmunità [39-42].

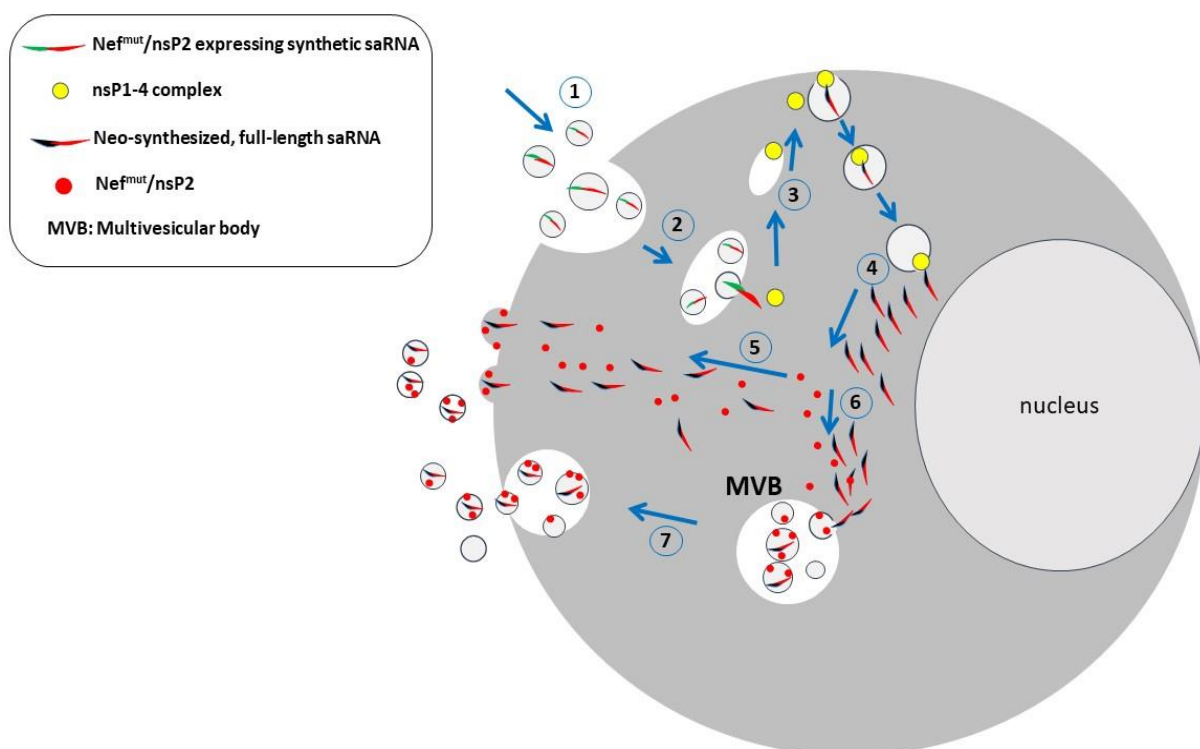
In ogni caso, una caratteristica peculiare dei saRNA è la loro potenziale capacità di diffondersi nell'organismo. Pertanto, la ricerca di un metodo per mitigare/inibire la loro diffusione incontrollata appare ampiamente auspicabile.

## 5. Un modo per controllare la diffusione del saRNA

La circolazione incontrollata di EV che incorporano RNA a lunghezza intera può rappresentare una limitazione di sicurezza per l'uso di vaccini a base di saRNA negli esseri umani. Per superare tale potenziale inconveniente, la coespressione nelle EV di un inibitore della replicazione del saRNA sarebbe di grande aiuto. A questo proposito, abbiamo identificato un mutante proteico difettivo di Nef in HIV-1, ovvero Nef<sup>mut</sup>, che agisce come proteina di ancoraggio delle EV [43]. Si tratta di un mutante proteico funzionalmente difettivo, privo degli effetti Nef tipicamente associati alla patogenesi dell'HIV e che mostra una straordinaria capacità di incorporarsi negli EV, ovvero da 50 a 100 volte più efficientemente rispetto all'isoforma wild-type. Nef<sup>mut</sup> può essere fuso al suo C-terminale con proteine di scelta, mantenendo nel tempo le sue proprietà di ancoraggio degli EV. Pertanto, Nef<sup>mut</sup> consente l'incorporazione di elevate quantità di antigeni ad esso fusi nelle cellule EV, che rimangono così protette da fattori di neutralizzazione e/o degradazione esterni. Nef<sup>mut</sup> si lega ai foglietti interni delle membrane intracellulari e plasmatiche, con cui interagisce strettamente attraverso le sue code miristilate e palmitoilate N-terminali [44].

Le cellule infettate da alfavirus resistono alla superinfezione omologa attraverso un blocco che si verifica a livello della trascrizione dell'RNA virale [45, 46]. È stato riportato che la coespressione di nsP2 inibisce l'attività dell'omologo RDRP [47]. Sulla base di queste evidenze sperimentali, le caratteristiche di Nef<sup>mut</sup> sarebbero fondamentali per ottenere il controllo della diffusione dei saRNA. In particolare, un saRNA modificato verrebbe progettato in modo che una proteina di fusione Nef<sup>mut</sup>/nsP2 venga co-espressa con l'antigene di interesse attraverso la creazione di un RNA bi-cistronico, unendo le rispettive sequenze con un sito di ingresso interno al ribosoma (IRES) [48]. In questo modo, le cellule che internalizzano il saRNA accumulano i prodotti di fusione Nef<sup>mut</sup>/nsP2 nelle loro EV nascenti. Pertanto, quando le EV che incorporano saRNA entrano nelle cellule, il ciclo replicativo del saRNA può essere limitato dall'effetto inibitorio di nsP2 associato all'EV (Fig. 3). Inoltre, un'ampia serie di evidenze sperimentali ha dimostrato che le EV che incorporano antigeni fusi con Nef<sup>mut</sup> inducono una forte risposta immunitaria citotossica (CTL) indotta dai linfociti T CD8<sup>+</sup>, che porta all'eliminazione delle cellule che esprimono l'antigene [49-51]. Pertanto, le EV che emergono dalle cellule esprimenti Nef<sup>mut</sup>/nsP2 possono agire come immunogeni specifici in grado di suscitare una risposta immunitaria CTL contro le cellule che esprimono saRNA. In questo modo, la risposta immunitaria contro Nef<sup>mut</sup>/nsP2, che, data la sua sovraespressione, dovrebbe essere

prevalente rispetto a quella verso le altre proteine alfavirus, contribuirebbe a controllare la diffusione del saRNA. In sintesi, la co-espressione di Nef<sup>mut</sup>/nsP2 nel contesto di vaccini a base di saRNA potrà proteggere dagli effetti collaterali indesiderati/imprevisti dovuti alla diffusione incontrollata del saRNA mediata dalle EV. Si presume che questa protezione avvenga attraverso due meccanismi distinti: inibendo la replicazione del saRNA nelle cellule e inducendo l'immunità CTL contro le cellule che esprimono nsP2. Questa strategia mitigherebbe specificamente i rischi legati all'autoamplificazione. Nel caso dei vaccini contro il COVID-19 basati sulla proteina Spike, sarebbe necessario studiare in quali tessuti, per quanto tempo e in quale quantità la proteina Spike può essere prodotta.



**Figura 3.** Generazione di saRNA autolimitante. Dopo l'ingresso nella cellula e il completamento del ciclo replicativo (1-4), la traduzione delle molecole di RNA sub-genomico porta alla produzione di Nef<sup>mut</sup>/nsP2. Il prodotto di fusione raggiunge sia la superficie interna della membrana plasmatica (5) sia le vescicole intraluminali (6-7), venendo così incorporato nelle vescicole extracellulari emergenti insieme al saRNA a lunghezza intera.

## 6. Conclusioni

Lo sviluppo della piattaforma tecnologica basata su saRNA apre certamente prospettive molto interessanti nella ricerca di base, traslazionale, preclinica e clinica. Come già accaduto con le tecnologie basate su retrovirus e lentivirus, la profonda conoscenza della biologia dei virus ha permesso la manipolazione dei loro genomi con l'obiettivo finale di creare nuovi farmaci preventivi/terapeutici. Ad esempio, i vettori lentivirali vengono sfruttati per produrre cellule CAR-T per curare i pazienti oncologici [52]. Recentemente, un vaccino contro il COVID-19 a base di saRNA è stato commercializzato per l'uso in persone sane [1]. Questo fatto impone una valutazione accurata dei potenziali rischi biologici. I risultati dello studio clinico di fase 3 di ARCT-154 somministrato come quarta dose di richiamo dopo tre dosi di un vaccino a base di mRNA suggeriscono che la sua efficacia protettiva non è inferiore a quella indotta dalla quarta dose del vaccino a mRNA

considerato come benchmark [4]. Tuttavia, l'effettiva impossibilità di valutare le conseguenze immunologiche delle precedenti immunizzazioni anti-SARS-CoV-2 rende i risultati difficili da interpretare.

Oltre ai vantaggi non così ovvi di questa nuova generazione di vaccini contro il COVID-19, l'uso di saRNA in esseri umani sani pone problemi di sicurezza senza precedenti, che sono stati solo parzialmente studiati. Hick e colleghi hanno dimostrato una ridotta replicazione di alfavirus omologhi nelle cellule che esprimono saRNA, a causa degli effetti dell'interferenza virale omologa [53]. Questo meccanismo riduce la possibilità di ricombinazione tra il virus infettante e il saRNA, sebbene il blocco appaia incompleto e una certa co-replicazione sia ancora possibile a seconda delle dosi di virus/saRNA utilizzate e della tempistica della superinfezione. D'altra parte, non sono state rilevate ricombinazioni virali nei topi iniettati con saRNA e infettati con l'alfavirus parentale.

Al contrario, non si sa nulla sulla possibile diffusione delle molecole di saRNA. Nel presente articolo viene proposto un meccanismo realistico di trasmissione intercellulare di saRNA basato su precedenti risultati sperimentali. Una caratteristica peculiare delle molecole di saRNA è la loro efficienza nel replicarsi, proprio come fanno i genomi virali. Tuttavia, a differenza del ciclo replicativo dei virus autentici, è atteso che le molecole di saRNA a lunghezza intera si accumulino intracellularmente poiché non possono fuoriuscire dalla cellula a seguito dell'associazione con le proteine strutturali virali. In particolare, e a differenza di molte altre specie virali, il genoma degli alfavirus si diffonde efficacemente nelle particelle virali emergenti [54] e, come dimostrato per il virus Chikungunya [20], anche nelle EV. Per questi motivi, appare fondamentale indagare se l'accumulo intracellulare di saRNA a lunghezza intera si associ alla generazione di EV che incorporano saRNA. L'associazione dell'RNA virale con le EV non è una novità nel campo della virologia. Ad esempio, i lentivirus sfruttano il traffico intercellulare degli esosomi sia per la biogenesi delle particelle virali sia come mezzo di infezione [55]. Analogamente, la trasmissione attraverso EV è stata descritta per HBV [56], HCV [57], HSV [58] e virus Dengue [59].

È inoltre urgente un'indagine approfondita sulla possibile associazione di saRNA con EV, considerando il vaccino recentemente commercializzato progettato per esprimere Spike di SARS-CoV-2, ovvero una proteina biologicamente attiva in grado di legare e attivare il diffuso recettore cellulare ACE2. L'eccessiva redistribuzione di saRNA che esprime Spike potrebbe esacerbare gli eventi avversi già descritti per i vaccini a base di mRNA [38], nonché aumentare il numero di cellule che possono essere attaccate e uccise dalla risposta immunitaria anti-Spike evocata. È stato riportato che l'espressione della proteina dell'envelope virale (la Spike) non è necessaria per la replicazione del genoma dell'alfavirus incorporato nelle EV [19]. Tuttavia, si prevede che l'associazione di Spike di SARS-CoV-2 con queste EV faciliti il loro trasporto nelle cellule che esprimono ACE2, rendendo così lo scenario generale ancora più complicato. Ulteriori dati richiedono un'indagine urgente sulla possibile associazione saRNA-EV. In primo luogo, molti autori hanno dimostrato che le EV circolanti possono migrare facilmente nei tessuti polmonari [60]. A questo proposito, è stato dimostrato che le EV associate al genoma SFV difettivi per l'espressione delle proteine del capsido si replicano nei polmoni in modo efficiente, comunque più efficiente del virus wild-type stesso [19]. In secondo luogo, quantità ben rilevabili di EV sono state trovate associate alle esalazioni polmonari [61-63]. Pertanto, oltre ai fluidi corporei, le esalazioni polmonari potrebbero essere un modo per trasmettere le EV che incorporano saRNA, aprendo nel contempo la possibilità teorica di un impatto ambientale [64]. In terzo luogo, le EV non riconoscono barriere di specie efficaci.

La strategia proposta di inattivazione della trasmissione tramite saRNA rappresenterebbe un modo per mitigare il rischio di sovraespressione indesiderata del gene di

interesse, da sfruttare per la progettazione di vaccini di seconda generazione basati su saRNA in un'efficace configurazione bi-cistronica.

**Funding:** This work was supported by the RiPrEI grant, n. Rip1, from the Ministry of Health, Rome, Italy.

**Institutional Review Board Statement:** not applicable.

**Informed Consent Statement:** not applicable.

**Data Availability Statement:** No new data were created.

**Acknowledgments:** I thank Rosangela Duranti and Federica Magnani for their secretarial assistance.

**Conflicts of Interest:** The author declares no conflict of interest.

## References

1. <https://www.ema.europa.eu/en/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-9-12-december-2024>. Accessed on March 27, 2025.
2. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/kostaive>. Accessed on March 27, 2025.
3. Hồ, N. T.; Hughes, S. G.; Ta, V. T.; Phan, L. T.; Đỗ, Q.; Nguyễn, T. V.; Phạm, A. T. V.; Thị Ngọc Đặng, M.; Nguyễn, L. V.; Trịnh, Q. V.; Phạm, H. N.; Chử, M. V.; Nguyễn, T. T.; Lương, Q. C.; Tường Lê, V. T.; Nguyễn, T. V.; Trần, L.-T.-L.; Thi Van Luu, A.; Nguyen, A. N.; Nguyen, N.-T.-H.; Vu, H.-S.; Edelman, J. M.; Parker, S.; Sullivan, B.; Sullivan, S.; Ruan, Q.; Clemente, B.; Luk, B.; Lindert, K.; Berdieva, D.; Murphy, K.; Sekulovich, R.; Greener, B.; Smolenov, I.; Chivukula, P.; Nguyễn, V. T.; Nguyen, X.-H. Safety, Immunogenicity and Efficacy of the Self-Amplifying mRNA ARCT-154 COVID-19 Vaccine: Pooled Phase 1, 2, 3a and 3b Randomized, Controlled Trials. *Nat Commun* **2024**, *15* (1), 4081. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-47905-1>.
4. Oda, Y.; Kumagai, Y.; Kanai, M.; Iwama, Y.; Okura, I.; Minamida, T.; Yagi, Y.; Kurosawa, T.; Greener, B.; Zhang, Y.; Walson, J. L. Immunogenicity and Safety of a Booster Dose of a Self-Amplifying RNA COVID-19 Vaccine (ARCT-154) versus BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: A Double-Blind, Multicentre, Randomised, Controlled, Phase 3, Non-Inferiority Trial. *The Lancet Infectious Diseases* **2024**, *24* (4), 351–360. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00650-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00650-3).
5. Pollock, K. M.; Cheeseman, H. M.; Szubert, A. J.; Libri, V.; Boffito, M.; Owen, D.; Bern, H.; McFarlane, L. R.; O'Hara, J.; Lemm, N.-M.; McKay, P.; Rampling, T.; Yim, Y. T. N.; Milinkovic, A.; Kingsley, C.; Cole, T.; Fagerbrink, S.; Aban, M.; Tanaka, M.; Mehdi-pour, S.; Robbins, A.; Budd, W.; Faust, S.; Hassanin, H.; Cosgrove, C. A.; Winston, A.; Fidler, S.; Dunn, D.; McCormack, S.; Shattock, R. J.; Adams, K.; Amini, F.; Atako, N. B.; Bakri, A.; Barclay, W.; Brodnicki, E.; Brown, J. C.; Byrne, R.; Chilvers, R.; Coelho, S.; Day, S.; Desai, M.; Dorman, E.; Elliott, T.; Flight, K. E.; Fletcher, J.; Galang, J.; Gohil, J.; Gupta, A.; Harlow, C.; Hu, K.; Kalyan, M.; Lagrue, D.; Liscano, E.; Njenga, C.; Polra, K.; Powlette, D. A.; Randell, P.; Rauchenberger, M.; Redknap, I.; Ricamara, M.; Rogers, P.; Sallah, H.; Samnuan, K.; Schumacher, M.; Shah, Z.; Shaw, R.; Shaw, T.; Sivapatham, S.; Slater, S.; Sorley, K.; Storch, R.; Tan, E.; Tan, T.; Thielemans, L.; Whitely, S.; Valentine, C.; Varghese, J.; Vikraman, A.; Wilkins, M. Safety and Immunogenicity of a Self-Amplifying RNA Vaccine against COVID-19: COVAC1, a Phase I, Dose-Ranging Trial. *eClinicalMedicine* **2022**, *44*. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2021.101262>.
6. Szubert, A. J.; Pollock, K. M.; Cheeseman, H. M.; Alagaratnam, J.; Bern, H.; Bird, O.; Boffito, M.; Byrne, R.; Cole, T.; Cosgrove, C. A.; Faust, S. N.; Fidler, S.; Galiza, E.; Hassanin, H.; Kalyan, M.; Libri, V.; McFarlane, L. R.; Milinkovic, A.; O'Hara, J.; Owen, D. R.; Owens, D.; Pacurar, M.; Rampling, T.; Skene, S.; Winston, A.; Woolley, J.; Yim, Y. T. N.; Dunn, D. T.; McCormack, S.; Shattock, R. J.; COVAC 1 Study Team. COVAC1 Phase 2a Expanded Safety and Immunogenicity Study of a Self-Amplifying RNA Vaccine against SARS-CoV-2. *EclinicalMedicine* **2023**, *56*, 101823. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2022.101823>.
7. Kitonsa, J.; Serwanga, J.; Abaasa, A.; Lunkuse, J.; Cheeseman, H. M.; Ruzagira, E.; Kato, L.; Nambaziira, F.; Oluka, G. K.; Gombe, B.; Jackson, S.; Ssebwana, J. K.; McFarlane, L.; Joseph, S.; Pierce, B.; Shattock, R. J.; Kaleebu, P. Safety and Immunogenicity of a Modified Self-Amplifying Ribonucleic Acid (saRNA) Vaccine Encoding SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein in SARS-CoV-2 Seronegative and Seropositive Ugandan Individuals. Social Science Research Network: Rochester, NY February 19, 2025. <https://doi.org/10.2139/ssrn.5140914>.

8. Saraf, A.; Gurjar, R.; Kaviraj, S.; Kulkarni, A.; Kumar, D.; Kulkarni, R.; Virkar, R.; Krishnan, J.; Yadav, A.; Baranwal, E.; Singh, A.; Raghuwanshi, A.; Agarwal, P.; Savergave, L.; Singh, S. An Omicron-Specific, Self-Amplifying mRNA Booster Vaccine for COVID-19: A Phase 2/3 Randomized Trial. *Nat Med* **2024**, *30* (5), 1363–1372. <https://doi.org/10.1038/s41591-024-02955-2>.
9. Akahata, W.; Sekida, T.; Nogimori, T.; Ode, H.; Tamura, T.; Kono, K.; Kazami, Y.; Washizaki, A.; Masuta, Y.; Suzuki, R.; Matsuda, K.; Komori, M.; Morey, A. L.; Ishimoto, K.; Nakata, M.; Hasunuma, T.; Fukuhara, T.; Iwatani, Y.; Yamamoto, T.; Smith, J. F.; Sato, N. Safety and Immunogenicity of SARS-CoV-2 Self-Amplifying RNA Vaccine Expressing an Anchored RBD: A Randomized, Observer-Blind Phase 1 Study. *Cell Reports Medicine* **2023**, *4* (8), 101134. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2023.101134>.
10. Aboshi, M.; Matsuda, K.; Kawakami, D.; Kono, K.; Kazami, Y.; Sekida, T.; Komori, M.; Morey, A. L.; Suga, S.; Smith, J. F.; Fukuhara, T.; Iwatani, Y.; Yamamoto, T.; Sato, N.; Akahata, W. Safety and Immunogenicity of VLPCOV-02, a SARS-CoV-2 Self-Amplifying RNA Vaccine with a Modified Base, 5-Methylcytosine. *iScience* **2024**, *27* (2), 108964. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108964>.
11. Quintana, V.; Caillava, J.; Byk, L. A.; Mondotte, J. A.; Battini, L.; Tarte, P.; Samsa, M. M.; Filomatori, C. V.; Alvarez, D. E. Improvement of the Potency of a N1-Methylpseudouridine-Modified Self-Amplifying RNA through Mutations in the RNA-Dependent-RNA-Polymerase. *bioRxiv* June 14, 2024, p 2024.06.14.599087. <https://doi.org/10.1101/2024.06.14.599087>.
12. Maine, C. J.; Miyake-Stoner, S. J.; Spasova, D. S.; Picarda, G.; Chou, A. C.; Brand, E. D.; Olesiuk, M. D.; Domingo, C. C.; Little, H. J.; Goodman, T. T.; Posy, J. L.; Gonzalez, J.; Bayone, T. L.; Sparks, J.; Gary, E. N.; Xiang, Z.; Tursi, N. J.; Hojcecki, C. E.; Ertl, H. C. J.; Weiner, D. B.; Casmil, I. C.; Blakney, A. K.; Essink, B.; Somodevilla, G.; Wang, N. S.; Geall, A. J.; Goldberg, Z.; Aliahmad, P. Safety and Immunogenicity of an Optimized Self-Replicating RNA Platform for Low Dose or Single Dose Vaccine Applications: A Randomized, Open Label Phase I Study in Healthy Volunteers. *Nat Commun* **2025**, *16* (1), 456. <https://doi.org/10.1038/s41467-025-55843-9>.
13. 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 May 8, 2025.
14. Schmidt, C.; Schnierle, B. S. Self-Amplifying RNA Vaccine Candidates: Alternative Platforms for mRNA Vaccine Development. *Pathogens* **2023**, *12* (1), 138. <https://doi.org/10.3390/pathogens12010138>.
15. Pietilä, M. K.; Hellström, K.; Ahola, T. Alphavirus Polymerase and RNA Replication. *Virus Res* **2017**, *234*, 44–57. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.01.007>.
16. Skidmore, A. M.; Bradfute, S. B. The Life Cycle of the Alphaviruses: From an Antiviral Perspective. *Antiviral Res* **2023**, *209*, 105476. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105476>.
17. Vogel, A. B.; Lambert, L.; Kinnear, E.; Busse, D.; Erbar, S.; Reuter, K. C.; Wicke, L.; Perkovic, M.; Beissert, T.; Haas, H.; Reece, S. T.; Sahin, U.; Tregoning, J. S. Self-Amplifying RNA Vaccines Give Equivalent Protection against Influenza to mRNA Vaccines but at Much Lower Doses. *Mol Ther* **2018**, *26* (2), 446–455. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.11.017>.
18. Krawczyk, P. S.; Mazur, M.; Orzeł, W.; Gewartowska, O.; Jeleń, S.; Antczak, W.; Kasztelan, K.; Brouze, A.; Matylla-Kulińska, K.; Gumińska, N.; Tarkowski, B.; Owczarek, E. P.; Affek, K.; Turowski, P.; Tudek, A.; Sroka, M.; Śpiewła, T.; Kusio-Kobińska, M.; Wesołowska, A.; Nowis, D.; Golab, J.; Kowalska, J.; Jemielity, J.; Dziembowski, A.; Mroczek, S. Re-Adenylation by TENT5A Enhances Efficacy of SARS-CoV-2 mRNA Vaccines. *Nature* **2025**. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08842-1>.
19. Ruiz-Guillen, M.; Gabev, E.; Quetglas, J. I.; Casales, E.; Ballesteros-Briones, M. C.; Poutou, J.; Aranda, A.; Martisova, E.; Bezunartea, J.; Ondiviela, M.; Prieto, J.; Hernandez-Alcoceba, R.; Abrescia, N. G. A.; Smerdou, C. Capsid-Deficient Alphaviruses Generate Propagative Infectious Microvesicles at the Plasma Membrane. *Cell Mol Life Sci* **2016**, *73* (20), 3897–3916. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2230-1>.
20. Le, B. C. T.; Burassakarn, A.; Tongchai, P.; Ekalaksananan, T.; Aromseree, S.; Phanthanawiboon, S.; Polsan, Y.; Alexander, N.; Overgaard, H. J.; Pientong, C. Characterization and Involvement of Exosomes Originating from Chikungunya Virus-Infected Epithelial Cells in the Transmission of Infectious Viral Elements. *Int J Mol Sci* **2022**, *23* (20), 12117. <https://doi.org/10.3390/ijms232012117>.
21. van Niel, G.; D'Angelo, G.; Raposo, G. Shedding Light on the Cell Biology of Extracellular Vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2018**, *19* (4), 213–228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.
22. Jeppesen, D. K.; Fenix, A. M.; Franklin, J. L.; Higginbotham, J. N.; Zhang, Q.; Zimmerman, L. J.; Liebler, D. C.; Ping, J.; Liu, Q.; Evans, R.; Fissell, W. H.; Patton, J. G.; Rome, L. H.; Burnette, D. T.; Coffey, R. J. Reassessment of Exosome Composition. *Cell* **2019**, *177* (2), 428–445.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.02.029>.
23. Kim, K. M.; Abdelmohsen, K.; Mustapic, M.; Kapogiannis, D.; Gorospe, M. RNA in Extracellular Vesicles. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2017**, *8* (4). <https://doi.org/10.1002/wrna.1413>.

24. O'Brien, K.; Breyne, K.; Ughetto, S.; Laurent, L. C.; Breakefield, X. O. RNA Delivery by Extracellular Vesicles in Mammalian Cells and Its Applications. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2020**, *21* (10), 585–606. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0251-y>.
25. Das, S.; Extracellular RNA Communication Consortium; Ansel, K. M.; Bitzer, M.; Breakefield, X. O.; Charest, A.; Galas, D. J.; Gerstein, M. B.; Gupta, M.; Milosavljevic, A.; McManus, M. T.; Patel, T.; Raffai, R. L.; Rozowsky, J.; Roth, M. E.; Saugstad, J. A.; Van Keuren-Jensen, K.; Weaver, A. M.; Laurent, L. C. The Extracellular RNA Communication Consortium: Establishing Foundational Knowledge and Technologies for Extracellular RNA Research. *Cell* **2019**, *177* (2), 231–242. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.03.023>.
26. Villarroya-Beltri, C.; Gutiérrez-Vázquez, C.; Sánchez-Cabo, F.; Pérez-Hernández, D.; Vázquez, J.; Martín-Cofreces, N.; Martínez-Herrera, D. J.; Pascual-Montano, A.; Mittelbrunn, M.; Sánchez-Madrid, F. Sumoylated hnRNPA2B1 Controls the Sorting of miRNAs into Exosomes through Binding to Specific Motifs. *Nat Commun* **2013**, *4* (1), 2980. <https://doi.org/10.1038/ncomms3980>.
27. Santangelo, L.; Giurato, G.; Cicchini, C.; Montaldo, C.; Mancone, C.; Tarallo, R.; Battistelli, C.; Alonzi, T.; Weisz, A.; Tripodi, M. The RNA-Binding Protein SYNCRIP Is a Component of the Hepatocyte Exosomal Machinery Controlling MicroRNA Sorting. *Cell Rep* **2016**, *17* (3), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.031>.
28. Garcia-Martin, R.; Wang, G.; Brandão, B. B.; Zanutto, T. M.; Shah, S.; Kumar Patel, S.; Schilling, B.; Kahn, C. R. MicroRNA Sequence Codes for Small Extracellular Vesicle Release and Cellular Retention. *Nature* **2022**, *601* (7893), 446–451. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04234-3>.
29. Brinkman, K.; Meyer, L.; Bickel, A.; Enderle, D.; Berking, C.; Skog, J.; Noerholm, M. Extracellular Vesicles from Plasma Have Higher Tumour RNA Fraction than Platelets. *J Extracell Vesicles* **9** (1), 1741176. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1741176>.
30. Nawaz, M.; Heydarkhan-Hagvall, S.; Tangruksa, B.; González-King Garibotti, H.; Jing, Y.; Maugeri, M.; Kohl, F.; Hultin, L.; Reyahi, A.; Camponeschi, A.; Kull, B.; Christoffersson, J.; Grimsholm, O.; Jennbacken, K.; Sundqvist, M.; Wiseman, J.; Bidar, A. W.; Lindfors, L.; Synnergren, J.; Valadi, H. Lipid Nanoparticles Deliver the Therapeutic VEGFA mRNA In Vitro and In Vivo and Transform Extracellular Vesicles for Their Functional Extensions. *Adv Sci (Weinh)* **2023**, *10* (12), e2206187. <https://doi.org/10.1002/advs.202206187>.
31. Maugeri, M.; Nawaz, M.; Papadimitriou, A.; Angerfors, A.; Camponeschi, A.; Na, M.; Hölltä, M.; Skantze, P.; Johansson, S.; Sundqvist, M.; Lindquist, J.; Kjellman, T.; Mårtensson, I.-L.; Jin, T.; Sunnerhagen, P.; Östman, S.; Lindfors, L.; Valadi, H. Linkage between Endosomal Escape of LNP-mRNA and Loading into EVs for Transport to Other Cells. *Nat Commun* **2019**, *10* (1), 4333. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12275-6>.
32. Stokes, A.; Pion, J.; Binazon, O.; Laffont, B.; Bigras, M.; Dubois, G.; Blouin, K.; Young, J. K.; Ringenberg, M. A.; Ben Abdeljelil, N.; Haruna, J.; Rodriguez, L.-A. Nonclinical Safety Assessment of Repeated Administration and Biodistribution of a Novel Rabies Self-Amplifying mRNA Vaccine in Rats. *Regul Toxicol Pharmacol* **2020**, *113*, 104648. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104648>.
33. Cui, X.; Vervaeke, P.; Gao, Y.; Opsomer, L.; Sun, Q.; Snoeck, J.; Devriendt, B.; Zhong, Z.; Sanders, N. N. Immunogenicity and Biodistribution of Lipid Nanoparticle Formulated Self-Amplifying mRNA Vaccines against H5 Avian Influenza. *NPJ Vaccines* **2024**, *9* (1), 138. <https://doi.org/10.1038/s41541-024-00932-x>.
34. 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* (6), 1025–1040.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.01.018>.
35. Krauson, A. J.; Casimero, F. V. C.; Siddiquee, Z.; Stone, J. R. Duration of SARS-CoV-2 mRNA Vaccine Persistence and Factors Associated with Cardiac Involvement in Recently Vaccinated Patients. *NPJ Vaccines* **2023**, *8* (1), 141. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00742-7>.
36. Bansal, S.; Perincheri, S.; Fleming, T.; Poulson, C.; Tiffany, B.; Bremner, R. M.; Mohanakumar, T. Circulating Exosomes with COVID Spike Protein Are Induced by BNT162b2 (Pfizer-BioNTech) Vaccination Prior to Development of Antibodies: Novel Mechanism for Immune Activation by mRNA Vaccines. *J Immunol* **2021**, *207* (10), 2405–2410. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.2100637>.
37. Bansal, S.; Fleming, T.; Perincheri, S.; Smith, M.; Bremner, R.; Mohanakumar, T. Lung Transplant Recipients with SARS-CoV-2 Infection Induce Circulating Exosomes with SARS-CoV-2 Spike Protein S2 Which Are Immunogenic in Mice. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **2022**, *41* (4, Supplement), S134. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.01.314>.

38. Parry, P. I.; Lefringhausen, A.; Turni, C.; Neil, C. J.; Cosford, R.; Hudson, N. J.; Gillespie, J. "Spikeopathy": COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines* **2023**, *11* (8), 2287. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>.
39. Federico, M. The Immunologic Downsides Associated with the Powerful Translation of Current COVID-19 Vaccine mRNA Can Be Overcome by Mucosal Vaccines. *Vaccines (Basel)* **2024**, *12* (11), 1281. <https://doi.org/10.3390/vaccines12111281>
40. Arlt, F. A.; Breuer, A.; Trampenau, E.; Boesl, F.; Kirchner, M.; Mertins, P.; Sánchez-Sendín, E.; Nasouti, M.; Mayrhofer, M.; Blüthner, M.; Endres, M.; Prüss, H.; Franke, C. High Serum Prevalence of Autoreactive IgG Antibodies against Peripheral Nerve Structures in Patients with Neurological Post-COVID-19 Vaccination Syndrome. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1404800. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1404800>.
41. Bellucci, M.; Bozzano, F. M.; Castellano, C.; Pesce, G.; Beronio, A.; Farshchi, A. H.; Limongelli, A.; Uccelli, A.; Benedetti, L.; De Maria, A. Post-SARS-CoV-2 Infection and Post-Vaccine-Related Neurological Complications Share Clinical Features and the Same Positivity to Anti-ACE2 Antibodies. *Front Immunol* **2024**, *15*, 1398028. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1398028>.
42. Collins, C. P.; Herzog, C.; Vick, L. V.; Nielsen, R.; Harville, Y. I.; Longo, D. L.; Arthur, J. M.; Murphy, W. J. Sequential SARS-CoV-2 mRNA Vaccination Induces Anti-Idiotypic (Anti-ACE2) Antibodies in K18 Human ACE2 Transgenic Mice. *Vaccines (Basel)* **2025**, *13* (3), 224. <https://doi.org/10.3390/vaccines13030224>.
43. Lattanzi, L.; Federico, M. A Strategy of Antigen Incorporation into Exosomes: Comparing Cross-Presentation Levels of Antigens Delivered by Engineered Exosomes and by Lentiviral Virus-like Particles. *Vaccine* **2012**, *30* (50), 7229–7237. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.10.010>.
44. Chiozzini, C.; Manfredi, F.; Arenaccio, C.; Ferrantelli, F.; Leone, P.; Federico, M. N-Terminal Fatty Acids of NEFMUT Are Required for the CD8+ T-Cell Immunogenicity of In Vivo Engineered Extracellular Vesicles. *Vaccines (Basel)* **2020**, *8* (2), 243. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020243>.
45. Karpf, A. R.; Lenches, E.; Strauss, E. G.; Strauss, J. H.; Brown, D. T. Superinfection Exclusion of Alphaviruses in Three Mosquito Cell Lines Persistently Infected with Sindbis Virus. *J Virol* **1997**, *71* (9), 7119–7123.
46. Nasar, F.; Erasmus, J. H.; Haddow, A. D.; Tesh, R. B.; Weaver, S. C. Eilat Virus Induces Both Homologous and Heterologous Interference. *Virology* **2015**, *484*, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.009>.
47. Cherkashchenko, L.; Rausalu, K.; Basu, S.; Alpey, L.; Merits, A. Expression of Alphavirus Nonstructural Protein 2 (nsP2) in Mosquito Cells Inhibits Viral RNA Replication in Both a Protease Activity-Dependent and -Independent Manner. *Viruses* **2022**, *14* (6), 1327. <https://doi.org/10.3390/v14061327>.
48. Martin, P.; Albagli, O.; Poggi, M. C.; Boulukos, K. E.; Pognonec, P. Development of a New Bicistronic Retroviral Vector with Strong IRES Activity. *BMC Biotechnology* **2006**, *6* (1), 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-6-4>.
49. Di Bonito, P.; Chiozzini, C.; Arenaccio, C.; Anticoli, S.; Manfredi, F.; Olivetta, E.; Ferrantelli, F.; Falcone, E.; Ruggieri, A.; Federico, M. Antitumor HPV E7-Specific CTL Activity Elicited by in Vivo Engineered Exosomes Produced through DNA Inoculation. *Int J Nanomedicine* **2017**, *12*, 4579–4591. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131309>.
50. Anticoli, S.; Manfredi, F.; Chiozzini, C.; Arenaccio, C.; Olivetta, E.; Ferrantelli, F.; Capocéfalo, A.; Falcone, E.; Ruggieri, A.; Federico, M. An Exosome-Based Vaccine Platform Imparts Cytotoxic T Lymphocyte Immunity Against Viral Antigens. *Biotechnol J* **2018**, *13* (4), e1700443. <https://doi.org/10.1002/biot.201700443>.
51. Manfredi, F.; Chiozzini, C.; Ferrantelli, F.; Leone, P.; Pugliese, K.; Spada, M.; Di Virgilio, A.; Giovannelli, A.; Valeri, M.; Cara, A.; Michelini, Z.; Andreotti, M.; Federico, M. Antiviral Effect of SARS-CoV-2 N-Specific CD8+ T Cells Induced in Lungs by Engineered Extracellular Vesicles. *npj Vaccines* **2023**, *8* (1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41541-023-00686-y>.
52. Pan, K.; Farrukh, H.; Chittepudi, V. C. S. R.; Xu, H.; Pan, C.; Zhu, Z. CAR Race to Cancer Immunotherapy: From CAR T, CAR NK to CAR Macrophage Therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **2022**, *41* (1), 119. <https://doi.org/10.1186/s13046-022-02327-z>.
53. Hick, T. A. H.; Geertsema, C.; Nguyen, W.; Bishop, C. R.; van Oosten, L.; Abbo, S. R.; Dumenil, T.; van Kuppeveld, F. J. M.; Langereis, M. A.; Rawle, D. J.; Tang, B.; Yan, K.; van Oers, M. M.; Suhrbier, A.; Pijlman, G. P. Safety Concern of Recombination between Self-Amplifying mRNA Vaccines and Viruses Is Mitigated in Vivo. *Mol Ther* **2024**, *32* (8), 2519–2534. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2024.06.019>.
54. Button, J. M.; Mukhopadhyay, S. Removing the Polyanionic Cargo Requirement for Assembly of Alphavirus Core-Like Particles to Make an Empty Alphavirus Core. *Viruses* **2020**, *12* (8), 846. <https://doi.org/10.3390/v12080846>.

55. Gould, S. J.; Booth, A. M.; Hildreth, J. E. K. The Trojan Exosome Hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100* (19), 10592–10597. <https://doi.org/10.1073/pnas.1831413100>. 558  
559
56. Yang, Y.; Han, Q.; Hou, Z.; Zhang, C.; Tian, Z.; Zhang, J. Exosomes Mediate Hepatitis B Virus (HBV) Transmission and NK-Cell Dysfunction. *Cell Mol Immunol* **2017**, *14* (5), 465–475. <https://doi.org/10.1038/cmi.2016.24>. 560  
561
57. Ramakrishnaiah, V.; Thumann, C.; Fofana, I.; Habersetzer, F.; Pan, Q.; de Ruiter, P. E.; Willemsen, R.; Demmers, J. A. A.; Stalin Raj, V.; Jenster, G.; Kwekkeboom, J.; Tilanus, H. W.; Haagmans, B. L.; Baumert, T. F.; van der Laan, L. J. W. Exosome-Mediated Transmission of Hepatitis C Virus between Human Hepatoma Huh7.5 Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110* (32), 13109–13113. <https://doi.org/10.1073/pnas.1221899110>. 562  
563  
564  
565
58. Bello-Morales, R.; Praena, B.; de la Nuez, C.; Rejas, M. T.; Guerra, M.; Galán-Ganga, M.; Izquierdo, M.; Calvo, V.; Krummenacher, C.; López-Guerrero, J. A. Role of Microvesicles in the Spread of Herpes Simplex Virus 1 in Oligodendrocytic Cells. *J Virol* **2018**, *92* (10), e00088-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00088-18>. 566  
567  
568
59. Vora, A.; Zhou, W.; Londono-Renteria, B.; Woodson, M.; Sherman, M. B.; Colpitts, T. M.; Neelakanta, G.; Sultana, H. Arthropod EVs Mediate Dengue Virus Transmission through Interaction with a Tetraspanin Domain Containing Glycoprotein Tsp29Fb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2018**, *115* (28), E6604–E6613. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720125115>. 569  
570  
571
60. Arenaccio, C.; Chiozzini, C.; Ferrantelli, F.; Leone, P.; Olivetta, E.; Federico, M. Exosomes in Therapy: Engineering, Pharmacokinetics and Future Applications. *Curr Drug Targets* **2019**, *20* (1), 87–95. <https://doi.org/10.2174/1389450119666180521100409>. 572  
573
61. Sinha, A.; Yadav, A. K.; Chakraborty, S.; Kabra, S. K.; Lodha, R.; Kumar, M.; Kulshreshtha, A.; Sethi, T.; Pandey, R.; Malik, G.; Laddha, S.; Mukhopadhyay, A.; Dash, D.; Ghosh, B.; Agrawal, A. Exosome-Enclosed microRNAs in Exhaled Breath Hold Potential for Biomarker Discovery in Patients with Pulmonary Diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2013**, *132* (1), 219–222.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.03.035>. 574  
575  
576  
577
62. Mitchell, M. I.; Ben-Dov, I. Z.; Ye, K.; Liu, C.; Shi, M.; Sadoughi, A.; Shah, C.; Siddiqui, T.; Okoroza, A.; Gutierrez, M.; Unawane, R.; Biamonte, L.; Parikh, K.; Spivack, S.; Loudig, O. Exhaled Breath Condensate Contains Extracellular Vesicles (EVs) That Carry miRNA Cargos of Lung Tissue Origin That Can Be Selectively Purified and Analyzed. *Journal of Extracellular Vesicles* **2024**, *13* (4), e12440. <https://doi.org/10.1002/jev2.12440>. 578  
579  
580  
581
63. Bano, A.; Yadav, P.; Sharma, M.; Verma, D.; Vats, R.; Chaudhry, D.; Kumar, P.; Bhardwaj, R. Extraction and Characterization of Exosomes from the Exhaled Breath Condensate and Sputum of Lung Cancer Patients and Vulnerable Tobacco Consumers—Potential Noninvasive Diagnostic Biomarker Source. *J. Breath Res.* **2024**, *18* (4), 046003. <https://doi.org/10.1088/1752-7163/ad5eae>. 582  
583  
584  
585
64. Mueller, S. Existing and Emerging mRNA Vaccines and Their Environmental Impact: A Transdisciplinary Assessment. *Environmental Sciences Europe* **2024**, *36* (1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12302-024-00966-x>. 585  
586  
587

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content. 588  
589  
590