
mRNA חיסוני

במרץ 2019 הוכרז בישראל ובעולם מצב חירום רפואי עקב המגיפה שנגרמה על ידי נגיף הקורונה, שבעקבותיו הוחל במירוץ קדחתני שלא היה כדוגמתו מעולם לפיתוח חיסון בהקדם האפשרי. לאור התכנית לחיסון המוני בעולם בחיסונים שנעשו בטכנולוגיה חדישה שלא נוסתה עד כה בבני אדם (מעבר לניסויים על מספר זעום של אנשים), חשוב להכיר לעומק את הטכנולוגיה שעומדת בבסיסה, את הפרוטוקולים המלאים של המחקרים הקליניים, את התוצאות המלאות שלהם ותוצאות נוספות שהיו בעלות חשיבות. צריך לבחון כל אחד מהשלבים ולוודא שאכן נעשה כל מה שנדרש ולא הושמטו שלבים חשובים עקב הצורך לייצר את החיסון בחיפזון בלתי רגיל. חשוב גם להבין בקצרה את הטכנולוגיות הקיימות כדי להבין את היתרונות והחסרונות האפשריים של הטכנולוגיה החדשה.

בקצרה: החיסונים הקיימים היום פועלים בשלוש דרכים עיקריות.

הראשונה, פותחה על ידי שיטה הכוללת הדבקה בוירוס דומה אך פחות פאתוגני, כך שהנדבק מפתח נוגדנים נגד הוירוס הפחות אלים, הפעילים בצורה טובה גם נגד הוירוס האלים. כאשר אין בנמצא וירוס פחות אלים שדומה לוירוס האלים, ניתן לבצע שינוי בוירוס האלים בשיטות שונות (מה שנקרא חיסון בחיידק או וירוס חי מוחלש). הסכנות הטמונות בחיסון כזה הן שהוירוס יעבור מוטאציה שתהפוך אותו שוב לאלים (דוגמא לכך היא מה שעלול לקרות בחיסון סייבין לפוליו (Cherkasova et al., 2002)).

שיטה נוספת היא על ידי המתת הוירוס והזרקתו לגוף, כך שמערכת החיסון תזהה את החלבונים שלו, מבלי שהוירוס יוכל להתרבות. השיטה הזאת דורשת "לרמות" את מערכת החיסון כדי שהיא תראה סכנה בכמות קטנה של וירוס מומת ותגיב אליו. הדרך לעשות זאת היא על ידי הוספת חומר שנקרא adjuvant. הסכנה בחיסון מהסוג הזה היא שאצל חלק מהאנשים שיש להם נטייה גנטית לפתח מחלות אוטואימוניות, ה- adjuvant מביא לתגובה בלתי רצויה של מערכת החיסון, כנגד חלבונים של החיידק המומת אך גם לחלבונים עצמיים (Passaro et al., 2014). צריך לזכור שהידע וההבנה של מערכת החיסון בזמן פיתוח חיסונים אלה היו עדיין מועטים והאפשרות שתהיה תגובה בלתי-ספציפית מאוחרת לא הייתה ידועה וגם לא נלקחה בחשבון. לכן, המחקרים שנעשו על החיסונים השונים התייחסו אך ורק לתגובות מיידיות, שבמידה והיו קצרות וחולפות, לא נראו כבעייה ולא היה מעקב כדי לבחון אפשרות של התפתחות מחלות בשלב מאוחר יותר. בשנים האחרונות התפתחה ההבנה של התופעות הנלוות השונות, אך למרות שהמנגנונים ברורים, קיימים מודלים של חיות מעבדה ומחקרים אפידמיולוגיים הראו קשר בין הכנסת חיסונים לשימוש והופעה של מחלות אוטואימוניות, הקשר הזה עדיין לא נחקר דיו (Vadalà et al., 2017).

לפני 30 שנה פותחה שיטה נוספת שבה, בשיטות של הנדסה גנטית מייצרים במבחנה את חלבון הנגיף recombinant technology. בשיטה הזאת גם נדרשת תוספת של adjuvant שכן גם כאן מדובר בהחדרה של כמות קטנה של חלבון הנגיף. לכן, הסכנה הקיימת בחיסון בחיידק מומת קיימת גם בשיטה זו ואולי אף יותר. בנוסף, תגובה אלרגית אופיינית או לא אופיינית, מיידית או מאוחרת יכולה גם להתפתח למרכיבים נוספים של החיסון, כמו למשל פורמאלין שמשמש להמתת החיידקים או חומרי שימור. הבעיות בשיטות החיסון הקיימות הגדילה את הפיתוי למצוא חיסון יעיל ובטוח יותר והביאה לפיתוח של חיסון על ידי mRNA.

חוות דעת זו תדון בשיטה החדשה לפי הסעיפים הבאים:

1. הבסיס של השיטה: טרנספקציה של RNA בתאים במבחנה.
2. טרנספקציה של RNA על ידי הזרקה לחיות ותאי המטרה האפשריים.
3. המשמעות של טרנספקציה של תא שריר על ידי RNA שמקודד לחלבון זר.
4. תגובת המערכת החיסונית והסיכונים האפשריים עקב כך.

הבסיס של השיטה: טרנספקציה *in-vitro* של תאים על ידי mRNA

טרנספקציה של תאים הינה שיטה שבה מוחדר חומר גנטי (DNA או RNA) לתוך תא על ידי וקטור. טרנספקציה של DNA כבר קיימת שנים רבות בשימושים שונים, אולם טרנספקציה של RNA היא שיטה יחסית חדשה. RNA הוא חומר הרבה פחות יציב המתפרק בקלות, אך עדיין קיים בשימוש שנים רבות (Xu et al., 2020). יש עדיפות לטרנספקציה על ידי RNA מכמה סיבות: ראשית, בגלל העובדה שהוא בדרך כלל מתפרק במהירות, מדובר בשינוי זמני בתא ולא שינוי קבוע כפי שקורה בטרנספקציה של DNA שבה ישנה אינקורפורציה שלו לתוך הגנום של התא. נכון, שעלולה להיות הפיכה של RNA לDNA, כתוצאה מכך שיש לפעמים אנזים שיכול לעשות זאת גם בתאים של בני אדם (Berkhout et al., 1999) אך תהליך זה קורה לעיתים רחוקות. השיטה שפותחה מאפשרת שליטה מלאה על משך הזמן שבו ה-RNA יהיה קיים בתוך התא (Manuscript, 2011). טרנספקציה של RNA אינה דורשת וקטור, אלא יכולה להיעשות על ידי יצירת קומפלקס עם מעטפת שומנית ששומרת על יציבותו ומאפשרת את כניסתו לתוך התא.

טרנספקציה של *in-vivo* RNA

אפשר לבצע טרנספקציה בתאים בודדים במבחנה ואפשר גם לבצע טרנספקציה על ידי הזרקה של ה-RNA לחיות. הטרנספקציה יכולה להתרחש בתא ספציפי או במספר סוגי תאים, בהתאם לדרך ההזרקה של החומר. כאשר ההזרקה היא תת-עורית או תוך שרירית, תהיה טרנספקציה מקומית ולא רק סיסטמית. בהזרקה תוך ורידית תהיה טרנספקציה בעיקר של תאי הכבד (Pardi et al., 2015).

הקלות שבה ניתן לגרום לתא בתוך הגוף לבטא חלבון אחר, לזמן קצוב מראש, הפכה את הטכנולוגיה הזאת לטכנולוגיה מבטיחה כטיפול במחלות ובשלב מסויים גם כאופציה לחיסון שיתרונותיו: ייצור מהיר של חיסונים לנגיפים וחיידקים שונים ברגע שידוע המבנה הגנטי שלהם (Xu et al., 2020). דבר שיכול בעיקרון לקצר באופן משמעותי את הזמן הדרוש לפיתוח של חיסון במקרה של מגיפה.

חיסון ה-mRNA מביא לייצור החלבון הנגיפי על ידי תאי הגוף עצמם, מה שיחקה הדבקה אמיתית. אולם, בהדבקה הטבעית, הוירוס, כמו קורונה, נקשר לרצפטור (במקרה זה ACE2) ודרכו נכנס לתוך התא. בתוך התא הוא משתלט על הגרעין וגורם ליצירת החלבונים שלו, הנארזים בתוך קפסולה ויוצאים מתוך התא להדבקת תאים נוספים. בשום שלב, אין ביטוי של חלבוני הנגיף על הממברנה של התא המודבק. (ראו איור 1) מתוך (Iqbal et al., 2020). הדבקת התא ב-mRNA של הנגיף מביאה לביטוי החלבון הנגיפי על ממברנות התאים.

הבעיות בשיטה זו, היא בהבאת תא בריא לבטא חלבון של נגיף שאותו הוא לא מבטא באופן הרגיל. מעבר לכך, ל-mRNA והמעטפת השומנית שמשמשת כדי לייצב אותו ולאפשר חדירה שלו דרך הממברנה של התא, יש השפעות של adjuvant.

אין ספק שמדובר ברעיון חדשני ומבטיח. לאור זאת, נעשו במהלך העשור האחרון מספר מחקרים בעיקר בבע"ח, אך גם במספר קטן מאוד של מתנדבים בריאים לפיתוח של חיסון מהסוג הזה עבור נגיפים וחיידקים שונים (Xu et al., 2020).

כלומר מכל האמור לעיל, אכן כפי שנטען בפרסומים שונים מטעם איגוד רפואת הילדים, משרד הבריאות ועוד יש ניסיון של יותר מעשור בטכנולוגיה של טרנספקציה של *in-vivo* mRNA, אך חשוב להבין שעד להתחלת הניסויים הנוכחיים על ידי חברת פיזר ומודרנה, לא היתה כמעט כל אינפורמציה לגבי חיסון בשיטה של טרנספקציה של שריר בבני אדם. ולכן קשה לדעת מה יהיו ההשלכות לטווח בינוני וארוך של בטוי חלבון זר במקום שאינו אמור להתבטא באופן שמעורר את המערכת החיסונית, גם אם זה רק לזמן קצוב. חשוב להבין שניסויים קצרים בפאזה ראשונה ושנייה, לא יכולים לזהות בעיות שיבואו לידי ביטוי באחוז קטן מהאנשים. הם ודאי לא מתוכננים כדי לענות על סיכונים שעלולים להיות אצל אנשים עם מחלות רקע או קשישים. לא בכדי נדרשת פאזה 3, שכוללת אוכלוסיה מגוונת של מתנדבים (שמייצגת בצורה טובה יותר את כלל האוכלוסיה שאמורה לקבל את הטיפול) ולא פעם, בעיות משמעותיות מתגלות רק ב"עולם האמיתי" בשלב של post marketing.

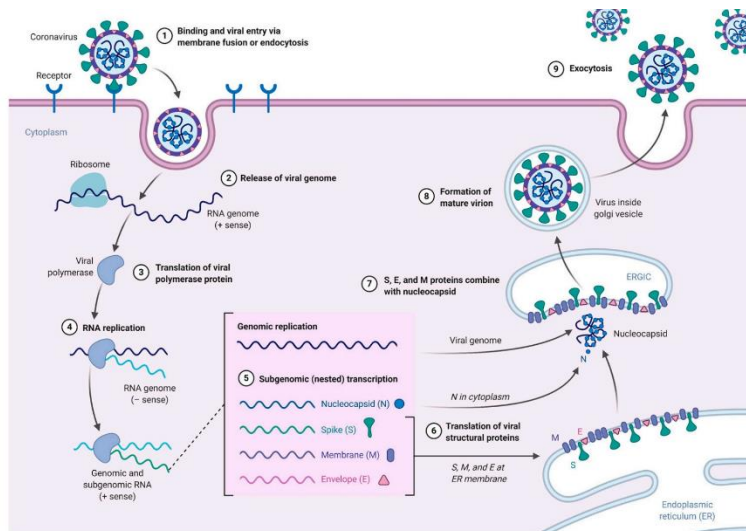
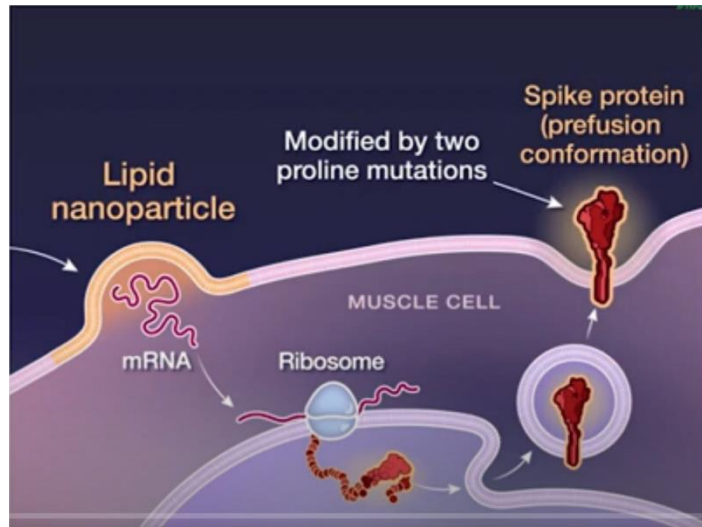


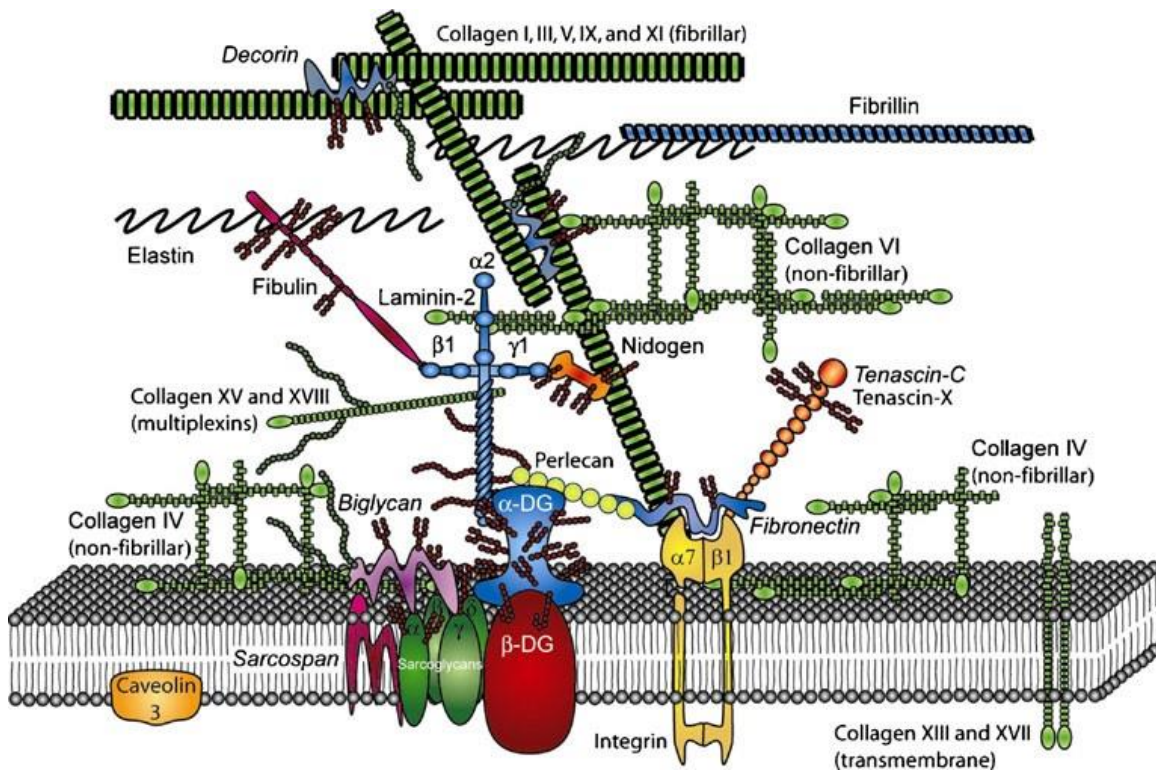
Fig. 2. Representation of endocytosis and exocytosis-based Coronavirus entry and exit to and from the host, respectively. The Figure was created with "BioRender.com" template and exported under the terms of premium subscription

איור 1

הטכנולוגיה שפותחה מאפשרת ל-RNA להיות יציב מספיק וגם לעבור אינטרנאליזציה לתוך התא. החסון מוזרק לתוך השריר, ומטרת החיסון שפותח על ידי מודרנה ופיזר היא לגרום לתאים של מערכת החיסון (dendritic cells ואחרים), הנמצאים ברקמת השריר לעבור טרנספקציה ולבטא את החלבון הנגיפי. אלא שהחדרת ה-RNA אינה ספיציפית, והוא יכול לעבור אינטרנאליזציה ולהתבטא גם על הממברנה של תאי בעצמם לתאים מציגי אנטיגן (antigen presenting cells) (Marino et al., 2011). היכולים להפעיל את התגובה החסונית. מחקרים בעכברים הראו שהזרקה תוך שרירית גורמת לביטוי מקומי של החלבון כמו גם ביטוי סיסטמי כתוצאה ממעבר לבלוטות לימפה והדם (Hassett et al., 2019). כמו כן מתפתח תהליך דלקתי משמעותי בתאי השריר הביא לנקרוזיס ושינויים אחרים בתאים (Hassett et al., 2019). כלומר, כפי שניתן לראות מאיור 2 שנלקח ממצגת של חברת התרופות, ברור שחלק מה-RNA של הנגיף יתבטא על הממברנה של תאי השריר עצמם. אלא שבניגוד למה שמוצג באיור זה, על ממברנת תא השריר ישנם גם חלבונים אחרים, כך שמה שיהיה קרוב יותר למציאות הוא מה שניתן לראות באיור 3.



איור 2



איור 3

הסיכון האפשרי בטרנספקציה של תאי שריר

כאמור, טרנספקציה של תא שריר על ידי החלבון של הנגיף תביא לכך שאותו תא (בריא) יבטא את החלבון של הנגיף על הממברנה שלו לצידם של החלבונים הרגילים שלו. הרעיון שעומד בבסיסו של החיסון של פייזר ומודרנה הוא זהו החלבון של הנגיף שנמצא על הממברנה של התא על ידי מערכת החסון שיגרום להפעלת התאים של מערכת זו וליצירת נוגדנים המכוונים נגדו. בשלבים הראשונים הנוגדנים שיווצרו יזהו את החלבון הספיציפי הזה. אולם, זהו החלבון על ידי מערכת החסון ותקיפתו והפיכת סביבת השריר לדלקתית יכולה להביא בהמשך לחשיפת חלבונים נוספים היכולים להיות מותקפים בהמשך על ידי מערכת החסון. המערכת החיסונית לא תייצר נוגדנים רק נגד חלבון אחד, אלא התגובה שלה תהפוך לפוליקלונאלית ולתקיפת חלבונים נוספים. אפשר לקוות שלא תהיה שום תגובה נגד חלבונים עצמיים, אבל לא ניתן לדעת שכך יקרה. כפי שהוכח כבר בטפולים אימוניים בסרטן, אחת הסכנות היא צירת נוגדנים נגד חלבונים עצמיים (June et al., 2017) כפי שניתן לראות באיור 4.

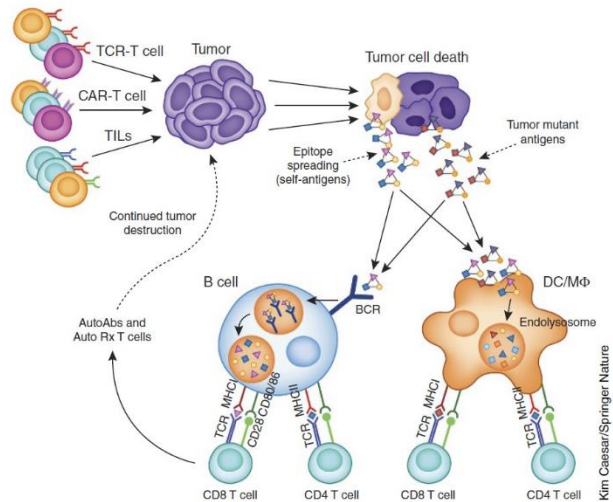


Figure 3 Potential mechanism of epitope spreading leading to autoimmunity. Top, T cells recognizing antigens (for example, neoantigens or antigens overexpressed on tumor cells) on tumor cells induce cytokine secretion and/or cytotoxic killing of tumor cells. This can also result in the death of nontransformed bystander cells. The antigens released by all cells in the environment are ingested by APCs (for example, dendritic cells, macrophages, and B cells), which migrate to the lymph nodes. Bottom, in the lymph nodes, these activated APCs can present tumor antigens as well as antigens from bystander cells, thereby priming a second wave of T cells that can re-enter the tissue and cause additional tumor destruction and off-target destruction of normal tissue. This, in turn, leads to autoimmunity. AutoAbs, autoantibodies. Auto RX, autoreactive.

יצירת נוגדנים עצמיים נגד חלבונים שנמצאים על תא השריר אינה דבר קטן ערך. השריר הוא איבר חיוני לחיים. מעבר לתנועה וייצוב השלד יש לו גם תפקידים חשובים בויסות הורמונאלי ובפעילות של המערכת החיסונית. כל זה מתאפשר בעזרת אינטראקציה מורכבת של חלבונים ממברנאליים עם חלבונים נוספים (ראה מאמר סקירה (Towler et al., 2004)). ניתן לראות את החשיבות של חלק מהחלבונים האלה ואת המורכבות שלהם באיור 3. יצירת נוגדנים נגד אחד החלבונים הממברנאליים שנמצאים בסמיכות לחלבון הקורונה עלולה להביא לתופעות לוואי שונות כמו למחלת שרירים פרוגרסיבית שביטוייה יהיו מאוד קלים בהתחלה. לדוגמה, חסר מולד של חלבון dystrophin גורם למחלת Duchene muscular dystrophy. הילדים שסובלים מהמחלה הזאת נולדים ומתפתחים באופן כמעט לחלוטין תקין והביטויים הקליניים המשמעותיים מופיעים רק לאחר מספר שנים. גם מחלות קלות יותר כמו מיאסטניה גראביס לא יתבטאו בהכרח באופן מיידי.

העובדה שלא נעשתה בדיקה לאפשרות שאינה בלתי סבירה של היווצרות נוגדנים נגד חלבונים של תאי השריר תמוהה, שכן בטכנולוגיות הקיימות היום קל מאוד גם לבדוק האם נוצרו נוגדנים נגד תאי השריר בחיות מעבדה או בני אדם שקיבלו את החיסון. ניתן להדגיר את הסרום שלהם אחרי סימון פלורוסנטי עם תאי שריר ולראות האם יש סימון של אחד או יותר מהחלבונים (Kufukihara et al., 2019). ממה שראינו בסקירת הספרות שעשינו, בדיקה כזאת לא נעשתה. יתרה מכך, במחקר שפורסם ב NEJM על פרימאטים, נבדק כי הייתה תגובה פוליקלונאלית חזקה לחלבון ה spike של הנגיף, אך אין שום ציון של בדיקת נוגדנים נגד חלבוני השריר, כפי שהיה מתבקש לאור האמור לעיל (Corbett et al., 2020). חשוב להבין שדי בכך שרק אחוז קטן מהאוכלוסייה יפתח נוגדנים כאלה כדי לגרום לתחלואה ונכות קשה ואולי אף תמותה למספר עצום של אנשים ברחבי העולם. חשוב לציין גם בהעובדה שרמת הנוגדנים בעקבות החיסון הייתה גבוהה באופן משמעותי מזו המושגת כתוצאה מזיהום בנגיף עצמו יש מקור לדאגה שישנה תגובה חיסונית מוגזמת.

סיכונים אפשריים נוספים:

חשש נוסף הוא התפתחות של antigen dependent enhancement (ADE). אפשרות זו הועלתה כסכנה אפשרית עקב ניסיון קודם בחיסוני קורונה בחיות.

בנוסף, כמו בכל תרופה או חומר זר שמוחדר לגוף קיימת גם סכנה לתגובות אלרגיות שעלולות להיות מסכנות חיים. וכמובן, ייתכנו גם סיכונים אחרים שגם אנחנו לא חושבים עליהם. צריך לזכור שלא מעט טכנולוגיות רפואיות ולא רפואיות שנכנסו לשימוש התגלו לאחר שנים כמזיקות או מסוכנות לאדם או לסביבה. ביניהן: חומרי הדברה כמו DDT, מזון מהונדס גנטית ועוד.

Berkhout, B., Jebbink, M., & Zsíros, J. (1999). Identification of an Active Reverse Transcriptase Enzyme Encoded by a Human Endogenous HERV-K Retrovirus. *Journal of Virology*, 73(3), 2365–2375. <https://doi.org/10.1128/jvi.73.3.2365-2375.1999>

Bhosle, S. M., Loomis, K. H., Kirschman, J. L., Blanchard, E. L., Vanover, D. A., Zurla, C., Habrant, D., Edwards, D., Baumhof, P., Pitard, B., & Santangelo, P. J. (2018). Unifying in vitro and in vivo IVT mRNA expression discrepancies in skeletal muscle via mechanotransduction. *Biomaterials*, 159, 189–203. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.01.010>

Camilleri, A. a, Willmann, R., Sadasivam, G., Lin, S., Rüegg, M. a, Gesemann, M., & Fuhrer, C. (2007). Tyrosine phosphatases such as SHP-2 act in a balance with Src-family kinases in stabilization of postsynaptic clusters of acetylcholine receptors. *BMC Neuroscience*, 8, 46. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-8-46>

Cherkasova, E. A., Korotkova, E. A., Yakovenko, M. L., Ivanova, O. E., Ereemeeva, T. P., Chumakov, K. M., & Agol, V. I. (2002). Long-Term Circulation of Vaccine-Derived Poliovirus That Causes Paralytic Disease. *Journal of Virology*, 76(13), 6791–6799. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.13.6791-6799.2002>

- Corbett, K. S., Flynn, B., Foulds, K. E., Francica, J. R., Boyoglu-Barnum, S., Werner, A. P., Flach, B., O'Connell, S., Bock, K. W., Minai, M., Nagata, B. M., Andersen, H., Martinez, D. R., Noe, A. T., Douek, N., Donaldson, M. M., Nji, N. N., Alvarado, G. S., Edwards, D. K., ... Graham, B. S. (2020). Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates. *New England Journal of Medicine*, 383(16), 1544–1555. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2024671>
- Hassett, K. J., Benenato, K. E., Jacquinet, E., Lee, A., Woods, A., Yuzhakov, O., Himansu, S., Deterling, J., Geilich, B. M., Ketova, T., Mihai, C., Lynn, A., McFadyen, I., Moore, M. J., Senn, J. J., Stanton, M. G., Almarsson, Ö., Ciaramella, G., & Brito, L. A. (2019). Optimization of Lipid Nanoparticles for Intramuscular Administration of mRNA Vaccines. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 15(April), 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>
- Iqbal, H. M. N., Romero-Castillo, K. D., Bilal, M., & Parra-Saldivar, R. (2020). The emergence of novel-coronavirus and its replication cycle - An overview. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 14(1), 13–16. <https://doi.org/10.22207/JPAM.14.1.03>
- June, C. H., Warshauer, J. T., & Bluestone, J. A. (2017). Is autoimmunity the Achilles' heel of cancer immunotherapy? *Nature Medicine*, 23(5), 540–547. <https://doi.org/10.1038/nm.4321>
- Kufukihara, K., Watanabe, Y., Inagaki, T., Takamatsu, K., Nakane, S., Nakahara, J., Ando, Y., & Suzuki, S. (2019). Cytometric cell-based assays for anti-striational antibodies in myasthenia gravis with myositis and/or myocarditis. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41730-z>
- Manuscript, A. (2011). *of expression duration*. 239(7), 2034–2040. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22344.A>
- Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., & Bartocioni, E. (2011). Skeletal muscle cells: From local inflammatory response to active immunity. *Gene Therapy*, 18(2), 109–116. <https://doi.org/10.1038/gt.2010.124>
- Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., Hope, M. J., & Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of Controlled Release*, 217, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
- Passaro, G., Soriano, A., & Manna, R. (2014). Vaccines and Autoimmunity: Meningococcal Vaccines. *Vaccines and Autoimmunity*, 185–190. <https://doi.org/10.1002/9781118663721.ch19>
- Towler, M. C., Kaufman, S. J., & Brodsky, F. M. (2004). Membrane traffic in skeletal muscle. *Traffic*, 5(3), 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2003.00164.x>
- Vadalà, M., Poddighe, D., Laurino, C., & Palmieri, B. (2017). Vaccination and autoimmune diseases: is prevention of adverse health effects on the horizon? *EPMA Journal*, 8(3), 295–311. <https://doi.org/10.1007/s13167-017-0101-y>
- Xu, S., Yang, K., Li, R., & Zhang, L. (2020). Mrna vaccine era—mechanisms, drug platform and clinical prospection. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 18). <https://doi.org/10.3390/ijms21186582>

