

# Development of mRNA vaccines: a road to a Nobel Prize

Vitor Francisco Ferreira<sup>1</sup> & Wilson C. Santos.<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Departamento de Tecnologia Farmacêutica, R. Dr. Mario Vianna, 523 - Santa Rosa, Niterói, RJ, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal Fluminense, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos Para a Saúde, Niterói, RJ, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto Teófilo Hernando, Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, España.

---

*Los científicos pioneros de las vacunas de ARNm han ganado el Premio Nobel de Medicina y Fisiología. Un ajuste molecular sentó las bases de las vacunas que han salvado millones de vidas.*

---

Contacto:

<sup>1</sup> Vitor Francisco

Ferreira

E-mail:

vitorferreira@

id.uff.br

Orcid:

[HTTPS://ORCID.](https://orcid.org/0000-0002-2166-766X)

[ORG/0000-0002-](https://orcid.org/0000-0002-2166-766X)

[2166-766X](https://orcid.org/0000-0002-2166-766X)

## RESUMEN

La bioquímica Katalin Karikó y el inmunólogo Drew Weissman han sido los ganadores del Premio Nobel de Medicina y Fisiología 2023 por los descubrimientos que han permitido el desarrollo de vacunas de ARNm contra el COVID-19. Estos científicos han encontrado una vía para el desarrollo de vacunas al hallar un modo de introducir ARN mensajero en las células sin desencadenar una respuesta inmunitaria no deseada.

Palabras clave: ARNm, COVID-19, vacunas.

<sup>2,3</sup> Wilson C. Santos

e-mail:

wsantos@id.uff.br

Orcid:

[HTTPS://ORCID.](https://orcid.org/0000-0001-9971-094X)

[ORG/0000-0001-](https://orcid.org/0000-0001-9971-094X)

[9971-094X](https://orcid.org/0000-0001-9971-094X)

## ABSTRACT

The biochemist Katalin Karikó and immunologist the Drew Weissman were the winners of 2023 medicine or physiology Nobel Prize for the discoveries that have enabled the development of mRNA vaccines against COVID-19. The scientists have found a pathway for the development of vaccines by finding a way to bring messenger RNA into cells without triggering an unwanted immune response.

Key words: mRNA, COVID-19, vaccines.

1. INTRODUCTION

The pioneer work from Malone *et al.* (1989) has founded the basis for the use of messenger RNA (mRNA) as a source for future drug and vaccine discovery projects. They have reported a method for mRNA transfection and expression in tissue culture cells using a synthetic cationic lipid, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) incorporated into a liposome containing a cationic lipid (lipofectin), which was previously used to transfect DNA into cells. The published results have allowed them to claim that it is reasonable to study the parameters of translation machinery by direct RNA transfection, rather than by introducing DNA constructs. A remarkable feature from that technique was that the RNA/lipofectin procedure is able to be transfect to a wide variety of cell types, such as, for instance, human, mouse, rat, *Xenopus*, and *Drosophila* cells. The final conclusion for the published research was remarkable:

"The RNA/lipofectin method can be used to directly introduce RNA into whole tissues and embryos (R.W.M., C. Holt, and I.M.V., unpublished results), raising the possibility that liposome-mediated mRNA transfection might offer yet another option in the growing technology of eukaryotic gene delivery, one based on the concept of using RNA as a drug."

In fact, such affirmative seemed to pave the way for the incoming technologies that have employed the RNA as a source material for developing new drugs or therapies. However, the studies from Malone *et al.* (1989) didn't come out by a serendipitous alone. Yet in 1978, scientists had used fatty membrane structures called liposomes to transport mRNA into mouse (Dimitriadis, 1978) and human (Ostro *et al.*, 1978) cells to induce protein expression. Both publications have shown that liposomes were able to package and to protect the mRNA and then fuse with cell membranes to deliver the genetic material into cells, thus providing a new and direct approach for studying the molecular mechanisms involved in protein synthesis. These experiments for sure provided insights for experiments such those published by Malone *et al.* and therefore also collaborated for the road of works with liposomes and with mRNA in innovative drug discovery projects.

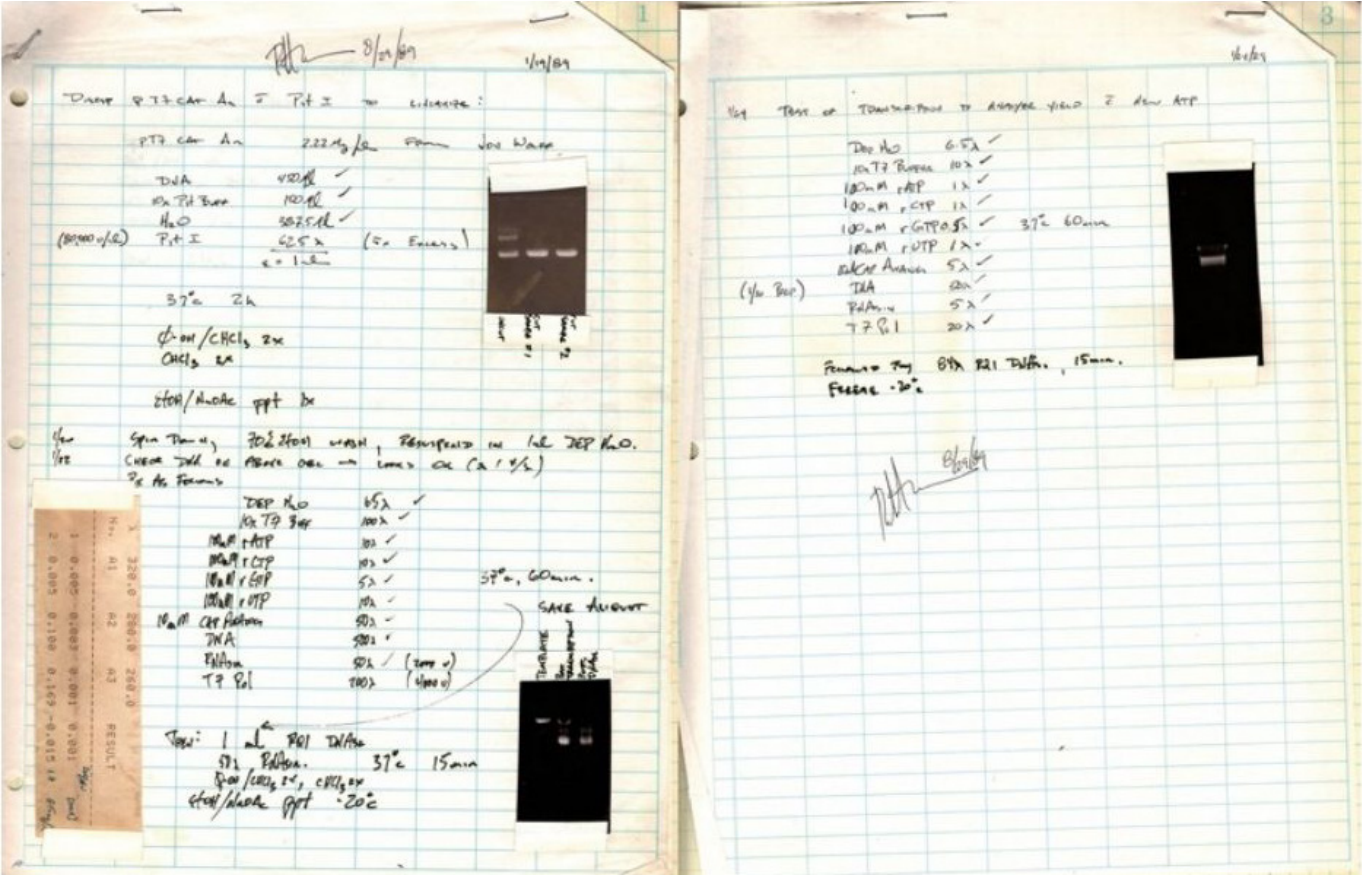


Figure 1. An excerpt from Robert Malone's lab notebooks, describing the 1989 synthesis of mRNA for injection into mice.

Extract from: Elie Dolgin, The Tangled History of mRNA Vaccines. Nature 597, 318-325, 2021.

At that time, however, it was not easy to consider mRNA as a medical product because the technologies needed to produce genetic material on a laboratory basis were lacking. Nevertheless, Melton *et al.* (1984) published a method for *in vitro* synthesizing pure, single-stranded RNAs of virtually any structure. In their experiments they have constructed cloning vectors for the specific RNA synthesis by bacteriophage SP6 RNA polymerase which initiates transcription exclusively at an SP6 promoter and they have established optimal conditions for *in vitro* RNA synthesis. In the sequence of their investigation, they have injected the lab-made mRNA into frog eggs and they have shown that the synthetic RNAs functions efficiently as messenger RNAs. Authors have favorable concluded for the usefulness of the method to produce large amounts of mRNA and consequently protein from any cDNA clone (Krieg and Melton, 1984). With the advance of such technique, it was further demonstrated that the protein expression can be readily detected when RNA and DNA expression vectors containing genes for chloramphenicol, acetyltransferase, luciferase, and beta-galactosidase were separately injected into mouse skeletal muscle *in vivo* (Wolff *et al.*, 1990). The very consistent results from that work allowed Authors to infer that "...The intracellular expression of genes encoding antigens may provide alternative approaches to vaccine development."

## 2. mRNA AS A SOURCE FOR VACCINES AND MEDICINES

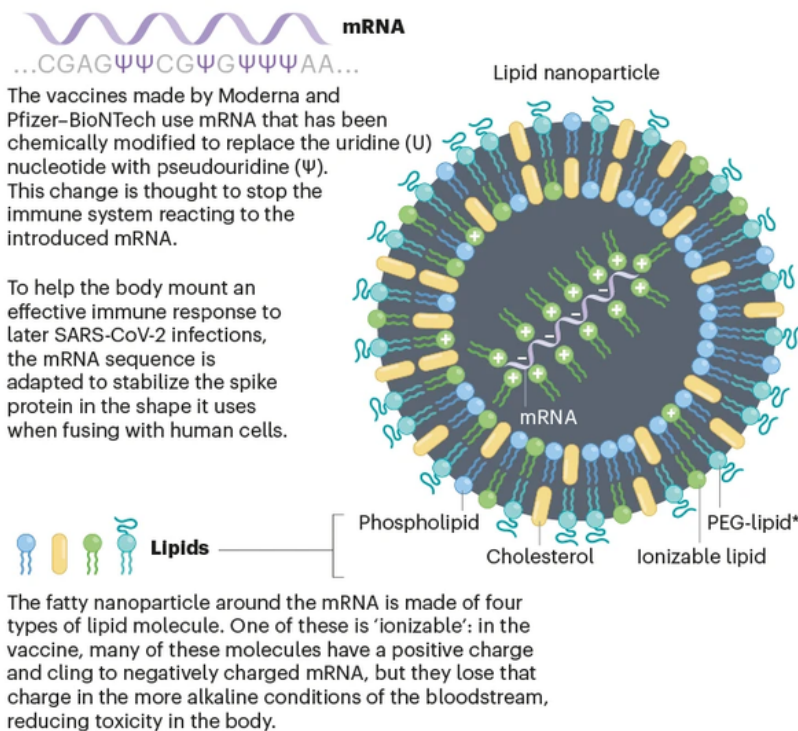
The seminal paper from Martinon *et al.* (1993) is considered to be the first to show that an mRNA in a liposome can elicit a specific antiviral immune response in mice, according to Dolgin (2021). Authors have reported the induction of anti-influenza cytotoxic T lymphocytes (CTL) *in vivo* by immunizing mice with liposomes containing messenger RNA encoding the influenza virus nucleoprotein (NP). As a strategy, they have encapsulated the NP mRNA into simple cholesterol/phosphatidylcholine/phosphatidylserine liposomes by the detergent removal technique. The relevance of their results in the context of vaccine development was discussed and have allowed Authors to assume that "... By astute engineering of the DNA, and hence the mRNA, the antigen could be targeted to different processing and presentation pathways, thereby inducing both humoral and cell-mediated responses".

Even with the impressive advances attained on the studies of mRNA as a biochemical source for new drugs development projects, yet in the 1990' years the overall feeling and wisdom was that mRNA was prone to biochemical degradation - and as so, too hard to work with. Besides, it was too expensive for technical production. In oncology area however, the knowledge gained on mRNA researches lead it to be considered as a therapeutic agent. The general thought was on the mRNA encoded proteins expressed by cancer cells and whether injecting it could provide activation of immune response to fight those cells (Conry *et al.*, 1995; Boczkowski *et al.*, 1996). Those ideas perhaps had as consequence the basis to investigational projects for administrating the mRNA into the body directly and therefore activating the immune response (Hoerr *et al.*, 2000; Probt, 2007).

Two pivotal papers by Katalin Karikó *et al.* (2004, 2005) have delineated the activation of Toll-like receptors by synthetic mRNA and a substantial immune response as a consequence. This response was inhibited by reconfiguring the chemical bonds on the nucleotide uridine, resulting in an analogue called pseudouridine. This modification effectively prevented the body from recognizing the mRNA as an enemy. Authors have reported that dendritic cells exposed to such modified RNA express significantly less cytokines and activation markers than those treated with unmodified RNA. That strategy of altering part of the mRNA code to avoid cell's innate immune response is now recognized as key finding in vaccine and drug discovery projects. Such strategy has enabled the development of mRNA vaccines against COVID-19,

### INSIDE AN MRNA COVID VACCINE

COVID-19 vaccines made from messenger RNA use lipid nanoparticles — bubbles of fats — to carry the molecules into cells. The mRNA contains the code for cells to produce the 'spike' protein that the coronavirus SARS-CoV-2 uses to enter cells. Here are key innovations in the design of these vaccines.



\*Lipid attached to polyethylene glycol

©nature

Figure 2. Representative formulation of COVID-19 vaccines made by Moderna and Pfizer-BioNTech.

Extract from: Elie Dolgin, *The Tangled History of mRNA Vaccines*. Nature 597, 318-325, 2021.

which has saved billions of lives all of the world. The vaccine delivers mRNA that instructs cells to create copies of the spike protein from SARS-CoV-2 virus particles. This mechanism stimulates the body to make antibodies that target the protein, as well as triggering other immune responses. For the developing of such innovation biochemical mechanism, the 2023 Nobel Prize in Physiology or Medicine has been awarded to biochemist Katalin Karikó and immunologist Drew Weissman for enabling the development of mRNA vaccines against COVID-19.

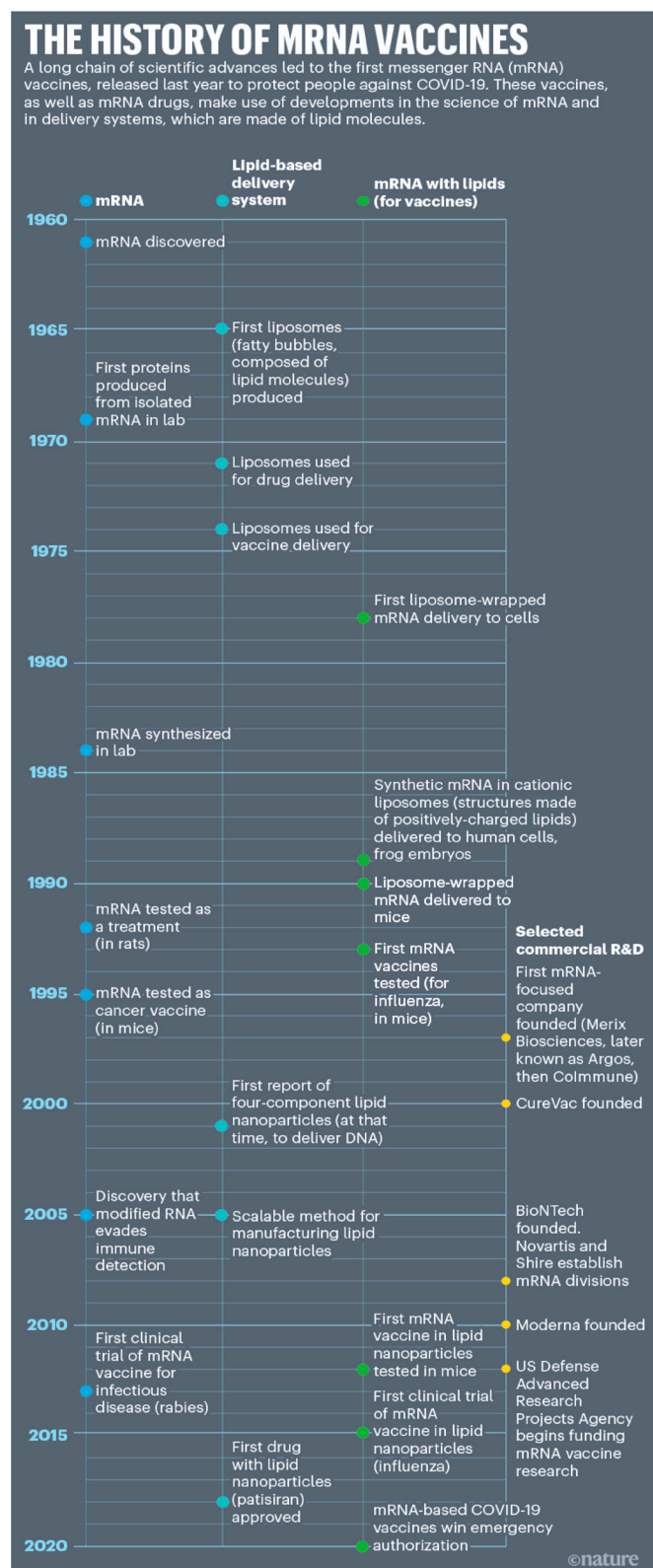


Figure 3. Timeline for mRNA vaccines.

Extract from: Elie Dolgin, *The Tangled History of mRNA Vaccines*. *Nature* 597, 318-325, 2021.

The contributions by Karikó and Weissman were essential to the vaccines' success during the pandemic and beyond and have helped the development of other vaccine discovery platforms. There are now mRNA vaccines in development for a number of other diseases, including influenza, HIV, malaria and Zika (Callaway & Naddaf, 2023).

### 3. CONCLUSION

The key finding from Karikó & Weissman, namely the changing the type of the mRNA nucleotides within the vaccine, therefore shifting the way in which cells see it, seems to release a new chapter for health sciences.

### REFERENCES

- Malone R.W. *et al.* Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 86(16):6077-81, 1989. doi: 10.1073/pnas.86.16.6077
- Dolgin, E. The Tangled History of mRNA Vaccines. *Nature* 597, 318-325, 2021
- Dimitriadis, G. Translation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature* 274, 923-924, 1978. <https://doi.org/10.1038/274923a0>
- Ostro, M. *et al.* Evidence for translation of rabbit globin mRNA after liposome mediated insertion into a human cell line. *Nature* 274, 921-923 (1978). <https://doi.org/10.1038/274921a0>
- Melton, D.A. *et al.* Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res* 12, (18):7035-56, 1984. doi: 10.1093/nar/12.18.7035
- Krieg P.A., Melton D. A. Functional messenger RNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *Nucleic Acids Res* 12 (18):7057-70, 1984. doi: 10.1093/nar/12.18.7057
- Wolff, J.A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247,(4949 Pt 1):1465-8, 1990. doi: 10.1126/science.1690918.
- Conry, R.M. *et al.* Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res* 55 (7):1397-400, 1995.
- Boczkowski D. *et al.* Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 184 (2): 465-72, 1996. doi: 10.1084/jem.184.2.465
- Hoerr I. *et al.* In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 30 (1): 1-7, 2000. doi: 10.1002/1521-4141(200001)
- Probst J. *et al.* Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA in vivo is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Ther.* 14 (15): 1175-80, 2007. doi: 10.1038/sj.gt.3302964.
- Karikó, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. & Weissman, D. J. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *Biol. Chem.* 279: 12542-12550, 2004. doi: 10.1074/jbc.M310175200
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H. & Weissman, D. Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity* 23: 165-175, 2005. doi: 10.1016/j.immuni.2005.06.008
- Callaway, E. and Naddaf, M. Pioneers of mRNA COVID vaccines win Medicine Nobel. *Nature* 622: 228, 2023

# La Quinta Revolución Industrial: una oportunidad para los Medicamentos Personalizados

Carmen Álvarez Lorenzo.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Académica de Número de la Real Academia de Farmacia de Galicia, San Roque nº2, 15704 Santiago de Compostela, España.

<sup>2</sup>Departamento de Farmacología, Farmacia y Tecnología Farmacéutica, I+D Farma Group (GI-1645), Facultad de Farmacia, Instituto de Materiales (iMATUS) e Instituto de Investigación Sanitaria (IDIS), Universidad de Santiago de Compostela, 15872 Santiago de Compostela, España.

La búsqueda de productos para mejorar la salud se cuenta entre las principales actividades que ha venido desarrollando el ser humano a lo largo de la historia. Hasta bien entrado el siglo XIX, buena parte de los medicamentos se preparaban en las reboticas ubicadas en la parte trasera de las oficinas de farmacia, utilizando las escasas materias primas accesibles y aplicando procedimientos manuales. Los medicamentos se elaboraban a demanda y de manera individualizada para cada persona enferma o, en situaciones de epidemia, para pequeños grupos de personas del entorno próximo. Por lo tanto, los primeros medicamentos surgieron “personalizados”, aunque por las limitaciones del conocimiento y la tecnología de la época la personalización fuese muy rudimentaria.

Los avances científicos y tecnológicos que se han ido produciendo en los últimos tres siglos han originado las sucesivas revoluciones industriales, que se han plasmado en cambios disruptivos en la manufactura de productos muy diversos <sup>[1]</sup>. En el siglo XVIII, la máquina de vapor reemplazó en numerosas tareas el trabajo físico de personas y animales, lo que hizo posible el comienzo de la industrialización. Un siglo más tarde, se introdujeron máquinas que funcionaban con petróleo, gas y principalmente con electricidad, lo que permitió que se generalizara la producción en masa. El desarrollo de la informática desencadenó la tercera revolución industrial. Los ordenadores abrieron la posibilidad de automatizar y controlar los procesos, y de hacer un seguimiento de la calidad de los productos en tiempo real. La cuarta revolución industrial se inició a comienzos del siglo XXI, cuando se empezó a utilizar Internet para interconectar máquinas, de una misma factoría o de factorías distintas, y se hizo realidad el concepto de “fábrica inteligente”.

Las cuatro revoluciones industriales facilitaron la producción en masa de una gran variedad de objetos, con una importante reducción de costes y una mejora progresiva de la calidad. Muchos productos, entre ellos los relacionados directamente con la salud y el bienestar, se hicieron accesibles a un abanico de personas cada vez más amplio. La confluencia de los avances en el conocimiento con la producción de medicamentos en masa cambió nuestras vidas, desempeñando un papel fundamental en el aumento de la esperanza de vida y en la mejora las oportunidades sociales y profesionales de los hombres y, sobre todo, de las mujeres, que se ha producido en las últimas décadas.

En la actualidad, los medicamentos y los productos sanitarios son los bienes más demandados en todo el mundo. La producción a gran escala es una necesidad real para que se puedan afrontar las necesidades de salud de la población, pero la producción en masa de unidades iguales lleva implícitas importantes limitaciones. Para cada tratamiento, la elección del fármaco y la dosis, y de las dimensiones de los implantes y las prótesis de manera que puedan ser útiles para la mayoría de las personas obliga a una reflexión minuciosa. Las personas somos muy diferentes en tamaño, características morfológicas y funcionalidad de nuestros órganos; las patologías se manifiestan de distinta manera, y existen diferencias genéticas y fenotípicas que hacen que la respuesta a los tratamientos sea también distinta. En consecuencia, los medicamentos y los productos sanitarios de “talla única” no son adecuados en un gran número de situaciones.

El siglo XXI se caracteriza por un interés creciente en la mejora del rendimiento de los procesos y por la asequibilidad de los productos y, en los últimos años,

por su personalización. La producción en masa está empezando a transformarse en “personalización en masa” o “automatización de la personalización”. Este es el objetivo de la Quinta Revolución Industrial <sup>[2]</sup>, que se asienta sobre las sinergias que se pueden crear entre la inteligencia humana y la inteligencia artificial para generar y analizar grandes colecciones de datos y aprender con rapidez de los resultados. En el campo de la salud, la digitalización ha transformado la atención al paciente en términos de herramientas que permiten un diagnóstico más temprano, de identificación y aplicación más rápida de tratamientos más precisos, y de interconexión de datos de salud y seguimiento de pacientes, reduciendo el esfuerzo humano. La personalización de la automatización, que es el elemento clave de la Industria 5.0, debe hacer realidad la prestación de una atención “personalizada” a los pacientes, integrando todas las etapas: prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento. Entre ellas, el tratamiento es el que plantea, si cabe, los mayores retos ya que demanda la fabricación personalizada de medicamentos, productos sanitarios, implantes, órganos artificiales y trasplantes adaptados a las necesidades y el estilo de vida específicos de cada paciente.

La Industria 5.0 tiene como rasgos diferenciales el estar centrada en lo humano, la sostenibilidad y la resiliencia, y representa la oportunidad esperada para la plena implementación de la Medicina Personalizada o Medicina de Precisión <sup>[3]</sup>. Producir medicamentos personalizados supone todo un reto porque implica adaptar la producción en masa a la personalización de la producción de las formas farmacéuticas. El desarrollo de un medicamento personalizado no solo implica descubrir el fármaco más adecuado para un grupo de pacientes y desarrollar los tests genéticos para identificar a esos pacientes, sino también personalizar los medicamentos en cuanto a dosis, morfología y propiedades físicas de la forma farmacéutica, y a capacidad para regular el lugar, el momento y la velocidad a la que debe producirse la liberación del fármaco. El diseño personalizado de las formas farmacéuticas requiere tener en cuenta las restricciones en cuanto a modo de administración impuestas por la edad, la situación fisiopatológica y los condicionamientos culturales del paciente, las necesidades de acceso selectivo del fármaco a determinados tejidos o células del organismo, e incluso el ajuste a un determinado biorritmo del momento en el que se debe liberar el fármaco. Los procedimientos de fabricación, el equipamiento y los materiales se tienen que adaptar a las nuevas demandas de producción. En

este contexto, la fabricación aditiva, y en particular la impresión 2D y 3D, pueden contribuir a dar respuesta a los tres requerimientos básicos de la Industria 5.0.

Bajo el paraguas de impresión 2D y 3D se agrupan tecnologías muy diversas que tienen como rasgos comunes ser altamente versátiles y automatizables para producir unidades individualizadas diseñadas por ordenador y adaptarse perfectamente a las necesidades de cada paciente de forma rápida y altamente reproducible. Incluyen elementos de valor añadido para cada aplicación específica (están centrados en “cada” persona) utilizando las mínimas cantidades de materias primas y energía sin generar residuos (sostenibilidad). En condiciones de estrés de mercado por emergencias naturales, pandemias, cierres de fronteras, conflictos (geo)políticos o condiciones económicas cambiantes, las tecnologías de impresión 2D y 3D ofrecen resiliencia (capacidad de adaptación y recuperación) en toda la cadena de fabricación. También pueden conducir a productos de menor coste y mayor calidad, en comparación con las tecnologías de fabricación convencionales. A su mayor accesibilidad contribuye, además, el hecho de que se puedan producir medicamentos por impresión 2D/3D en el lugar en el que se van a utilizar (por ejemplo, en el punto de atención al paciente) compartiendo a través de Internet los archivos de su diseño y usando materias primas locales, con lo que se evitan los costes de transporte.

Las impresoras 2D, similares a las de inyección de tinta, imprimen gotas de disoluciones o suspensiones del fármaco seleccionado sobre films “comestibles” o implantables. La dosis se ajusta en función del tamaño del “texto” que se imprime. Generalmente, el “texto” tiene forma de puntos, pero también puede adoptar la forma de un código QR y contener, al mismo tiempo, información detallada del medicamento y sus controles de calidad <sup>[4]</sup>. Esta técnica permite combinar cartuchos con distintos fármacos y excipientes para cubrir necesidades de polimedición y de control de la velocidad de cesión de cada fármaco. Las impresoras 3D pueden producir medicamentos con casi cualquier arquitectura tridimensional y con una amplísima versatilidad de contenido en fármaco/s, propiedades mecánicas y velocidad de cesión. Las posibilidades que ofrece la impresión 3D para modificar la topología superficial de las formulaciones permite dar respuesta a otras demandas de personalización, como incluir letras de código Braille para pacientes con dificultad visual <sup>[5]</sup>. Estudios clínicos recientes han demostrado la utilidad de los “imprimidos” 3D con consistencia de “gominola” para el tratamiento personalizado de niños

con enfermedades raras. La impresión 3D también permite preparar productos sanitarios personalizados (por ejemplo, audífonos) con sustancias activas para paliar efectos secundarios asociados a su uso habitual (biofilm microbiano) o que cubran necesidades terapéuticas específicas de cada persona <sup>[6]</sup>.

Para dar respuesta a los principios de la Industria 5.0, las innovaciones en tecnologías de impresión 2D/3D de vanguardia requieren materiales avanzados y sostenibilidad. Para algunas técnicas se plantea la dificultad de que los materiales adecuados para la impresión y que son útiles para otras aplicaciones, carecen de datos de seguridad que demuestren su biocompatibilidad para la vía de administración seleccionada, lo que provoca un retraso en los ensayos clínicos de los nuevos medicamentos. Por otro parte, para algunos procedimientos, se necesitan monómeros y polímeros sintéticos que generan preocupación en cuanto a sostenibilidad e impacto ambiental. La innovación en la ciencia de los materiales y el desarrollo de estrategias de impresión multimaterial se identifican como factores claves para una rápida implementación de la Quinta Revolución Industrial en el ámbito biomédico.

Carmen Álvarez Lorenzo  
carmen.alvarez.lorenzo@usc.es

## REFERENCIAS

1. Leng, J., Sha, W., Wang, B., Zheng, P., Zhuang, C., Liu, Q., Wuest, T., Mourtzis, D. & Wang, L. Industry 5.0: Prospect and retrospect. *J Manufact Syst* 65, 279-295 (2022).
2. Breque, M., De Nul, L. & Petridis, A. Industry 5.0: Towards a sustainable, humancentric and resilient European industry. European Commission 2021. [https://msu.euramet.org/current\\_calls/documents/EC\\_Industry5.0.pdf](https://msu.euramet.org/current_calls/documents/EC_Industry5.0.pdf)
3. Haleem, A. & Javaid, M. Industry 5.0 and its expected applications in medical field. *Curr Med Res Pract* 9, 167-169 (2019).
4. Carou-Senra, P., Rodríguez-Pombo, L., Awad, A., Basit, A. W., Alvarez-Lorenzo, C. & Goyanes, A. Inkjet printing of pharmaceuticals. *Adv Mater* 2309164 (2023).
5. Awad, A., Yao, A., Trenfield, S.J., Goyanes, A., Gaisford, S. & Basit, A.W. 3D Printed tablets (printlets) with Braille and Moon patterns for visually impaired patients. *Pharmaceutics* 12, 172 (2020).
6. Seoane-Viaño, I., Trenfield, S.J., Basit, A.W. & Goyanes A. Translating 3D printed pharmaceuticals: From hype to real-world clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 174, 553-575 (2021).