

Citotossicità Apparente e Citotossicità Intrinseca dei Nanomateriali Lipidici Contenuti in un Vaccino a mRNA COVID-19

TRADUZIONE
NON UFFICIALE
AD USO INTERNO

Gabriele Segalla, PhD

Dottore in Chimica Pura (Chimica Organico - Biologica), specialista in Chimica delle micro-emulsioni e dei sistemi colloidali, CEO & Chief Scientist di Multichem R&D Italy, email: gabriele.segalla@gmail.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5969-3732>

SOMMARIO

Il preparato medicinale denominato *Comirnaty* di Pfizer-BioNTech è una dispersione acquosa di nanomateriali lipidici, destinata a costituire, dopo lo scongelamento e la diluizione, il prodotto finito per iniezione intramuscolare. Nel presente studio vengono esaminate alcune evidenti criticità chimico-fisiche del preparato, in particolare per quanto riguarda il pKa (*costante di dissociazione acida*) apparente e intrinseco del suo principale eccipiente, il lipide ionizzabile cationico ALC-0315. L'altissimo valore del suo pKa intrinseco provoca, dopo l'internalizzazione e la fuoriuscita endosomiale delle LNP, un improvviso aumento della sua concentrazione di carica cationica e di conseguenza la formazione di citochine pro-infiammatorie e ROS (specie reattive dell'ossigeno), che possono disgregare la membrana mitocondriale e rilasciarne il contenuto, causare errori di traduzione dell'RNA, polimerizzazione delle proteine e del DNA, mutazioni del DNA, distruzione della membrana nucleare e conseguente rilascio del suo contenuto. Inoltre, il valore apparentemente basso di pKa (6,09) di ALC-0315 associato ad altri lipidi nei LNP, non è adatto all'applicazione intramuscolare. Il suo valore è troppo basso per consentire una corretta trasfezione delle cellule ospiti, nonostante quanto affermato da EMA (European Medicines Agency) nel suo Assessment report del 19 febbraio 2021, in flagrante contraddizione con la stessa fonte bibliografica ivi citata. Inoltre, l'eccezionale penetrabilità, la mobilità, la reattività chimica e l'accumulo sistemico di nanoparticelle lipidiche cationiche incontrollabili, con alti livelli di citotossicità, rilasciate in sedi biologiche imprevedibili, anche lontane dal sito di inoculazione, sono tutti fattori che possono portare a un disastro medico senza precedenti. Si raccomandano ulteriori studi e verifiche immediate, tenendo nel frattempo in considerazione, in accordo con il principio di precauzione, l'immediata sospensione delle vaccinazioni con i vaccini COVID-19 a base di mRNA-LNP.

Parole chiave: *mRNA vaccine, LNP, lipid nanoparticles, ROS, reactive oxygen species, pKa, apparent pKa, intrinsic pKa*

INTRODUZIONE

Le nanoparticelle lipidiche (LNP) nei due vaccini COVID-19 a base di mRNA incapsulato in LNP (*Comirnaty* di Pfizer/BioNTech e *Spikevax* di Moderna Therapeutics) sono formate da quattro diversi tipi di lipidi: un lipide ionizzabile cationico la cui carica positiva si lega alla struttura dell'mRNA caricata negativamente, un lipide legato al polietilenglicole (PEG) che aiuta a prolungare l'emivita della composizione, un fosfolipide per facilitare la formazione di una struttura a due strati e colesterolo con funzione di modulatore/stabilizzatore della fluidità di membrana (Figura 1).

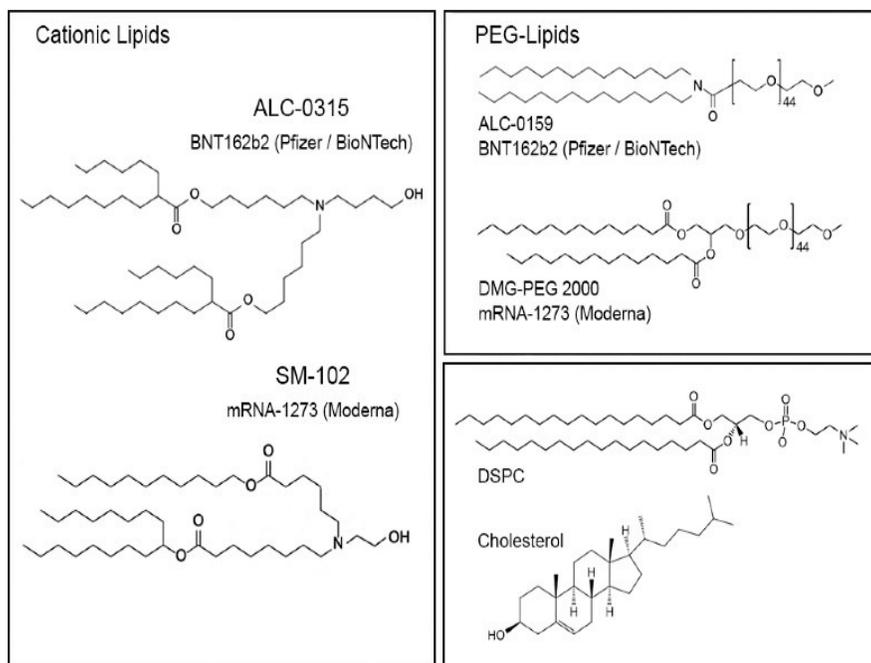


Figure 1. "Strutture dei costituenti lipidici delle LNP dei vaccini a mRNA COVID-19" ristampato dalla Figura 8, pagina 16989 dall'articolo di Tenchov, R., Bird, R., Curtze, A. E., & Zhou, Q., intitolato "Lipid nanoparticles — from liposomes to mRNA vaccine delivery, a landscape of research diversity and advancement" pubblicato in *ACS Nano* 2021, 15, 11, 16982–17015, 15(11), 16982–17015, <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsnano.1c04996>. Copyright © by the authors 2021 and licensed under [CC-BY 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Queste nanoparticelle hanno lo scopo primario di incapsulare l'mRNA, proteggerlo dalla degradazione enzimatica e favorirne la penetrazione nelle cellule dell'organismo ospite, dopo l'iniezione intramuscolare (Nance & Meier, 2021).

L'RNA messaggero (mRNA BNT162b2) del medicinale Comirnaty di Pfizer/BioNTech, che dovrebbe codificare per la proteina virale Spike all'interno della cellula ospite, è incapsulato in nanoparticelle lipidiche formate dai due lipidi funzionali ALC-0315 ((4-idrossibutil (azanedil) bis (esano-6,1-diil) bis (2-esildecanoato)) e ALC-0159 (2 ([polietilenglicole]-2000)-N,N-ditetradecilacetamide), e dai due lipidi strutturali DSPC (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfocolina) e colesterolo.

Nella presente pubblicazione, lo scopo è quello di fornire un resoconto dettagliato e documentato delle evidenze scientifiche attualmente esistenti che dimostrano la tossicità e la pericolosità dei nanomateriali lipidici cationici contenuti nei vaccini a mRNA, con particolare attenzione al Comirnaty di Pfizer/BioNTech, e alle gravi contraddizioni, omissioni e non conformità dimostrate sia da parte dei fabbricanti che degli organismi regolatori responsabili della valutazione scientifica, sorveglianza e controllo della sicurezza dei medicinali.

INADEMPIENZE NORMATIVE E ASSENZA DI STUDI TOSSICOLOGICI

ALC-0315 e ALC-0159 sono classificati dall'EMA come *nuovi eccipienti, mai utilizzati in precedenza in un medicinale in Europa e non registrati nella farmacopea dell'UE* (EMA/[707383](https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/comirnaty/comirnaty.htm), pag. 23).

Dei due, il lipide funzionale più importante è ALC-0315, determinante per la formazione di nanoparticelle lipidiche sferoidali. ALC-0315 è un amminolipide ionizzabile cationico, costituito da un'ammina terziaria con un gruppo idrossibutile e due gruppi esilici esterificati con acido 2-esildecanoico (Segalla, 2023).

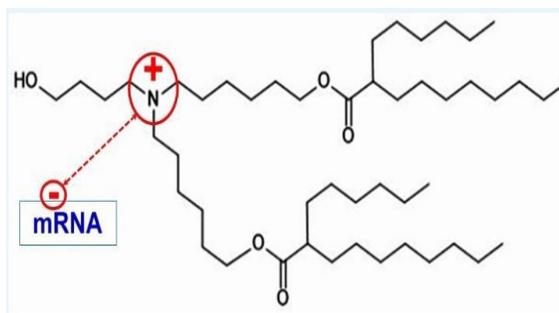


Figura 2. Struttura molecolare del lipide cationico ALC-0315

Grazie alla sua particolare struttura amminica terziaria, ALC-0315 tende ad essere protonato in ambiente neutro o a pH moderatamente basso, dando così luogo alla formazione di nanoparticelle cationiche, cioè aventi una carica superficiale positiva predominante. Questa carica positiva è fondamentale in quanto è ciò che permette la formazione di nano-complessi con materiali genetici caricati negativamente come l'mRNA (Figura 2).

Dati sperimentali, tuttavia, hanno dimostrato che gli effetti citotossici e genotossici sono potenziati se le nanoparticelle hanno una carica positiva (Kanasty et al., 2012; Fröhlich, 2012; Barone et al., 2017). Come ammesso anche da BioNTech (co-titolare, insieme a Pfizer, del vaccino Comirnaty) nel suo brevetto *RNA Formulation for Immunotherapy* del 26 novembre 2019, l'elevata tossicità attribuita ai liposomi e ai lipoplexes caricati positivamente li rende problematici e inadatti all'uso in ambito farmaceutico. Il riferimento è a formulazioni di RNA incapsulate in nanoparticelle lipidiche cationiche — cioè molto simili a quelle utilizzate in Comirnaty — e chiamate, in questo contesto, "lipoplexes":

Sfortunatamente, per i liposomi e i lipoplexes caricati positivamente è stata segnalata un'elevata tossicità, che può essere un problema per l'applicazione di tali preparati come prodotti farmaceutici (brevetto [US 10,485,884 B2](#))

Ciononostante, l'EMA, nel suo rapporto di valutazione del 19 febbraio 2021, sorprendentemente afferma:

Non sono stati condotti studi di genotossicità o cancerogenicità. I componenti della formulazione del vaccino sono lipidi e RNA che non dovrebbero avere un potenziale genotossico. (EMA/707383, 2021, p. 55)

Secondo le linee guida, non sono stati eseguiti studi di genotossicità o cancerogenicità. Non si prevede che i componenti del vaccino (lipidi e mRNA) abbiano un potenziale genotossico. Ciò è ritenuto accettabile per il CHMP. ¹ (EMA/707383, 2021, p. 56).

FORMAZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS) E TOSSICITÀ DELLE NANOPARTICELLE LIPIDICHE

In netto contrasto con quanto affermato da EMA, le nanoparticelle costituite da lipidi cationici monovalenti hanno dimostrato di essere significativamente efficienti nell'indurre la morte cellulare attraverso la produzione di *specie reattive dell'ossigeno* (ROS) (Yun et al., 2016). Ci sono prove schiaccianti che la sovrapproduzione di ROS è la causa principale della biotossicità delle nanoparticelle. Concentrandosi principalmente nei lisosomi, nei mitocondri e nel nucleo della cellula e generando ROS in quei siti, le nanoparticelle caricate positivamente possono produrre effetti devastanti. Numerosi studi confermano in modo inconfutabile che i componenti nucleotidici

¹ CHMP: Committee for Medicinal Products for Human Use.

del DNA e dell'RNA cellulari costituiscono un bersaglio significativamente vulnerabile all'aggressione dei ROS generati dai nanomateriali (Imlay et al., 1988; Maki et al., 1992; Demple et al., 1994). I principali rischi collegati all'uso eccessivo di nanomateriali cationici sono la loro tossicità dose-dipendente, l'epatotossicità e l'infiammazione polmonare, attraverso il rilascio di specie reattive dell'ossigeno e l'aumento dei livelli intracellulari di calcio (Ozpolat et al., 2014; Lee et al., 2013; Zhang et al., 2014). Inoltre, i liposomi cationici possono interagire con costituenti cellulari caricati negativamente, come le opsonine e le proteine sieriche, provocando l'emolisi, cioè la rottura o la distruzione dei globuli rossi (Buyens et al., 2012). Inoltre, le LNP possono indurre l'attivazione del sistema immunitario con conseguente pseudoallergia correlata all'attivazione del complemento (CARPA), una risposta immunologica acuta che può portare a shock anafilattico (Szebeni et al., 2014).

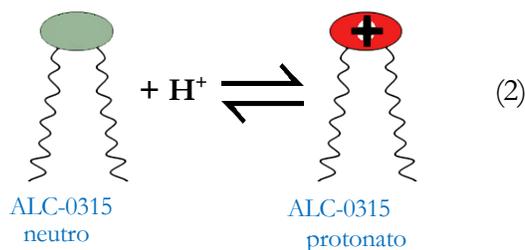
pKa INTRINSECO DELL'AMMINOLIPIDE ALC-0315

La quantità di un composto ionizzabile protonato (cioè caricato positivamente) in una soluzione acquosa, ad un certo pH, è definita dal valore della sua costante di *dissociazione acida* (pKa)².

Il valore di pKa di un composto ionizzabile definisce il pH al quale i suoi gruppi ionizzabili funzionali sono il 50% in forma ionizzata e il 50% in forma deionizzata. Poiché ALC-0315 contiene un gruppo di testa costituito da un'ammina terziaria protonabile con un *pKa intrinseco* di 9,6 (Zhang et al., 2022), ciò implica che, ad un valore di pH pari a 9,6, ci sarebbero il 50% delle molecole nella forma protonata (R₃NH⁺) e il 50% nella forma neutra (R₃N), secondo l'equazione:



che, per ALC-0315, può essere semplificato e schematizzato come segue:



La forma neutra, non protonata, di ALC-0315 (rappresentata in verde) esprimerà la minore tossicità, mentre la sua forma completamente protonata (rappresentata in rosso) esprimerà la massima tossicità a causa delle interazioni distruttive delle sue cariche cationiche con le porzioni anioniche delle membrane endosomiali, lisosomiali e mitocondriali (Figura 3).

² Costante di dissociazione acida (pKa): il pH al quale metà delle molecole della specie ionizzabile sono dissociate. Il pKa è della massima importanza per comprendere l'assorbimento e la biodistribuzione dei farmaci nella circolazione sistemica. Le misure di pKa consentono di determinare la proporzione delle molecole allo stato ionizzato (carico) e deionizzato (P. Patel et al., 2021).

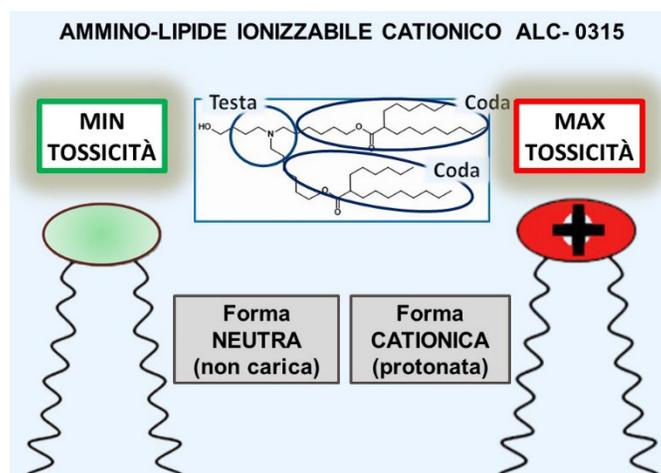


Figura 3. Rappresentazione della forma carica e di quella non carica di ALC-0315.

Il valore del pKa di un composto ionizzabile è di fondamentale importanza per comprenderne l'assorbimento e la biodistribuzione, e, come vedremo tra poco, anche per stimarne concretamente la citotossicità. Le misurazioni del pKa consentono di calcolare l'esatta proporzione di molecole ionizzate (caricate positivamente) e deionizzate (neutre) di ALC-0315, ad un determinato pH.

La relazione che lega il rapporto tra la forma deprotonata e la forma protonata con il pKa della molecola ionizzabile è regolata dall'*equazione di Henderson-Hasselbach*, che, nel caso di un'ammina terziaria, può essere rappresentata come segue:

$$\text{Log } [R_3N]/[R_3NH^+] = \text{pH} - \text{pKa} \quad (3)$$

oppure

$$[R_3N]/[R_3NH^+] = 10^{(\text{pH} - \text{pKa})} \quad (4)$$

in cui R_3N è la forma deprotonata (neutra) e R_3NH^+ è la forma protonata (cationica) di ALC-0315.

L'equazione di Henderson-Hasselbach mostra chiaramente che esiste una stretta correlazione tra il pH del mezzo acquoso, il pKa della sostanza ionizzabile e le concentrazioni relative delle sue forme cationiche e neutre. Ciò fornisce una buona valutazione della sua citotossicità teorica (secondo il principio che, per lo stesso numero di moli, più una specie è protonata, maggiore è la citotossicità risultante). Il pKa risultante determina anche il comportamento di ionizzazione e la carica superficiale delle nanoparticelle ionizzate, che influenzano sostanzialmente la loro stabilità, potenza³ e tossicità (Alabi et al., 2013).

A valori di pH inferiori al pKa, la specie chimica predominante è la forma protonata (cationica, più citotossica) dell'amminolipide, mentre a valori di pH superiori a pKa, la specie chimica predominante è la forma basica deprotonata (neutra, meno citotossica) dell'amminolipide.

³ La *potenza* di un farmaco è un'espressione della sua attività, in termini di concentrazione o quantità necessaria per produrre un determinato effetto (Neubig et al., 2003)

Applicando l'equazione (4) di cui sopra, ad un pH fisiologico di 7,4, avremo:

$$[R_3N]/[R_3NH^+] = 10^{(7,4 - 9,6)} = 0,006309573$$

il che indica semplicemente che, in un ambiente fisiologico, il 99,37% delle molecole di ALC-0315 sono protonate, esprimendo così la loro massima citotossicità.

pKa APPARENTE DELLE NANOPARTICELLE LIPIDICHE

Per ridurre la citotossicità dei liposomi cationici e dei nanomateriali in generale, una soluzione relativamente efficace è stata la *modulazione* della loro costante di dissociazione acida (pKa), tale per cui essa assume valori pari o inferiori a 7, che si sono dimostrati efficaci sia per l'incapsulamento dell'RNA che per la loro attività in vivo. Quando l'amminolipide viene inserito, insieme ad altri lipidi strutturali, all'interno della struttura di una nanoparticella lipidica, il suo pKa può subire un abbassamento di 2-3 unità, dovuto alle forze di interazione con specie anioniche o con porzioni polari degli altri lipidi contigui.

Il nuovo valore più basso, che caratterizza la nanoparticella lipidica, è chiamato pKa *apparente* (o pKa *di superficie*), per distinguerlo dal pKa *intrinseco* originario, cioè il valore di pKa dell'amminolipide misurato *prima* della formazione della nanoparticella lipidica.⁴

Il pKa apparente di una nanoparticella lipidica viene quindi definito come il pH al quale il 50% dei lipidi ionizzabili, associati a quella LNP, viene protonato.

Ad esempio, la nanoparticella lipidica utilizzata per incapsulare *Onpatro* (un farmaco per il trattamento dell'amiloidosi ereditaria e somministrato tramite inoculazione endovenosa) contiene l'amminolipide DLin-MC3-DMA approvato dalla FDA (pKa intrinseco

9,4), il cui pKa apparente associato alle LNP risulta essersi ridotto a 6,44.

Il pKa apparente delle LNP formate dall'amminolipide SM - 102 e utilizzate per incapsulare il vaccino Spikevax di Moderna, dal valore intrinseco 8,9, scende a 6,75. Il pKa apparente delle LNP basate su ALC-0315 è ridotto da 9,6 a 6,09 (Patel et al., [2021](#); Zhang et al., [2022](#); vedasi Figura 4).

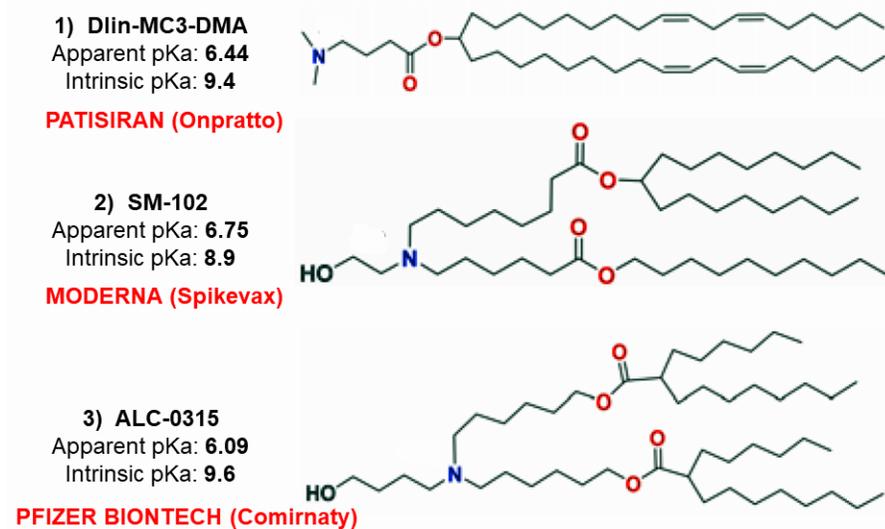


Figura 4. Struttura e valori di pKa degli amminolipidi: 1) DLin-MC3-DMA (Onpratto/Patisiran di Alnylam): pKa 6,44 apparente, pKa intrinseco 9,4 2) SM-102 (Spikevax di Moderna): pKa apparente 6,75, pKa intrinseco 8,9 3) Alc-0315 (Comirnaty di Pfizer/BioNTech): pKa 6,09 apparente, pKa intrinseco 9,6.

⁴ The apparent pKa of LNPs is dependent not only on the pKa of individual lipid but also on the molar ratio of all the lipids. Each lipid has a distinct pKa which can be changed by modifying its headgroup and the hydrophobic tail. Therefore, one strategy to adjust the apparent pKa of LNPs is to chemically modify the lipid. Another strategy is to use a mixture of two or more lipids with different pKa values and adjust their ratio to achieve the desirable apparent pKa (P. Patel et al., 2021).

Il pKa apparente delle nanoparticelle può essere misurato con diverse tecniche. La titolazione a fluorescenza TNS⁵ è considerata il metodo più accurato: i valori dei pKa amminolipidici sono determinati per ogni LNP misurando la fluorescenza del TNS durante la titolazione a diversi valori di pH (Jayaraman et al., 2012; Patel et al., 2021). Un pKa apparente compreso tra 6 e 7 è stato generalmente stimato come l'intervallo ottimale per lo sviluppo di nanoparticelle efficienti per il rilascio di RNA.

Le nanoparticelle con valori di pKa più bassi hanno, a pH neutro, cariche ioniche e polarità insufficienti, provocando così l'aggregazione delle nanoparticelle e la conseguente instabilità dell'intera composizione. D'altra parte, le nanoparticelle con un pKa più elevato emettono più positive a pH fisiologico,

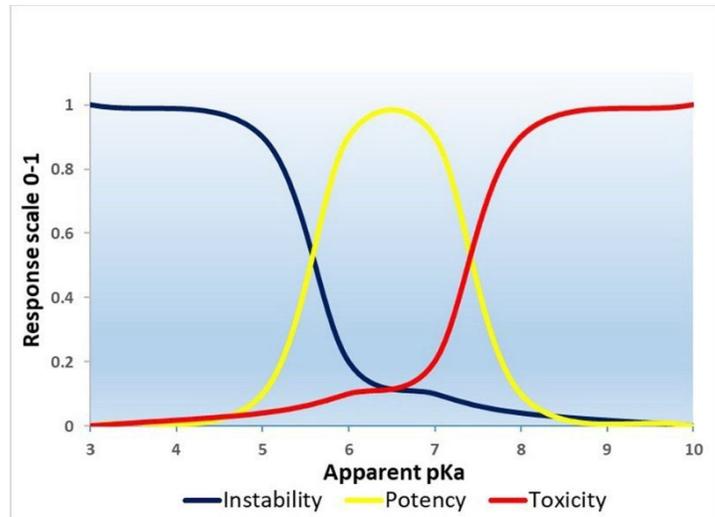


Figura 5. Gli effetti del pKa sull'instabilità, la potenza e la tossicità delle nanoparticelle. Ristampato da Trends in Pharmacological Sciences, Vol. 42(6), 448–460, Patel et al., 2021, *The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA*, pagina No. 458, Copyright © 2021, with permission from Elsevier Ltd

il che si traduce in una maggiore stabilità ma, sfortunatamente, anche in una maggiore tossicità (Figura 5).

Quando il pH del preparato è inferiore al pKa apparente delle nanoparticelle lipidiche, i gruppi amminici sono protonati e portano una carica positiva che interagisce con l'RNA caricato negativamente per formare nanoparticelle cationiche stabili.

INTERVALLO OTTIMALE E NON OTTIMALE DEL pKa DELLE LNP PER LA SOMMINISTRAZIONE INTRAMUSCOLARE DI VACCINI A mRNA

Secondo il rapporto di valutazione ufficiale dell'EMA, datato 19 febbraio 2021 (EMA, 2021, pagina 42), in ambiente fisiologico, dove il pH è 7,4, queste nanoparticelle lipidiche, grazie al contributo del driver primario ALC-0315, hanno una carica neutra:

La potenza del vaccino a RNA è ulteriormente ottimizzata dall'incapsulamento dell'RNA in nanoparticelle lipidiche (LNP), che protegge l'RNA dalla degradazione da parte delle RNAasi e consente la trasfezione delle cellule ospiti dopo la somministrazione intramuscolare (i.m.). Il lipide funzionale e ionizzabile, ALC-0315, è identificato come il driver primario di tale somministrazione, in quanto consente alle LNP di avere una carica neutra in un ambiente fisiologico per facilitare l'internalizzazione; l'ambiente endosomiale esprime una carica positiva e quindi innesca la traslocazione dell'RNA nel citosol (Midoux & Pichon, 2015; Hassett et al, 2019; S. Patel et al, 2019; and see Figure 6).

⁵ TNS: 2-(p-toluidino)-6-naphthalene sulfonic acid.

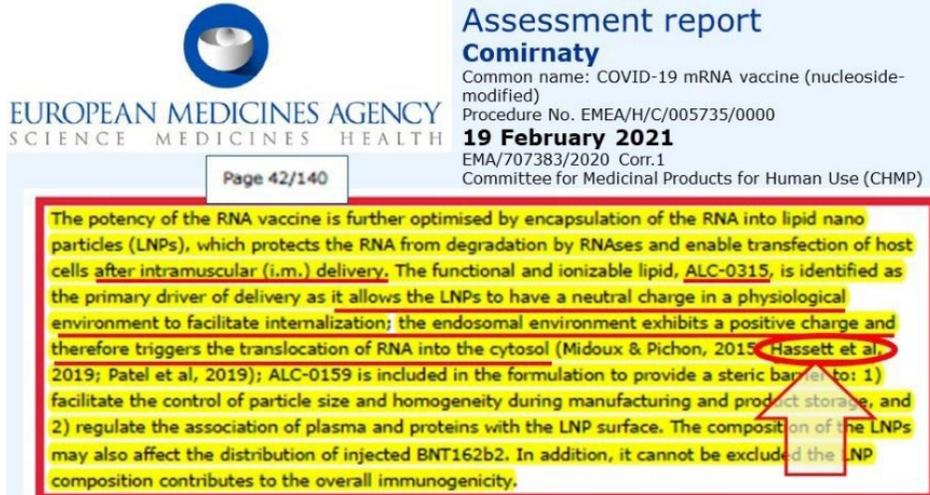


Figure 6. Rapporto di Valutazione di EMA, pagina 42, su Comirnaty della Pfizer/ BioNTech, datato 19 Febbraio 2021

Da tale affermazione si evince che l'EMA, definendolo addirittura *il driver primario*, ha senza dubbio compreso che ALC-0315 è un fattore essenziale e determinante nel facilitare e *ottimizzare* l'internalizzazione delle LNP nell'ambiente endosomiale e la conseguente traslocazione dell'mRNA nel citosol, dopo la somministrazione intramuscolare.

Sembra però che l'autore del rapporto di valutazione dell'EMA abbia ommesso di valutare scrupolosamente, se non volutamente ignorato, quanto riportato in uno dei riferimenti scientifici citati a sostegno di tale affermazione, ovvero lo studio del 2019 di [Hassett et al.](#), dall'eloquente titolo: *Ottimizzazione di Nanoparticelle Lipidiche per la Somministrazione Intramuscolare di vaccini a mRNA*.

Inaspettatamente, tutti i 19 autori di questo articolo sono dipendenti attuali o precedenti di Moderna Therapeutics e possiedono stock options e/o azioni di tale società, il principale concorrente di Pfizer per quanto riguarda i vaccini COVID-19 a mRNA.

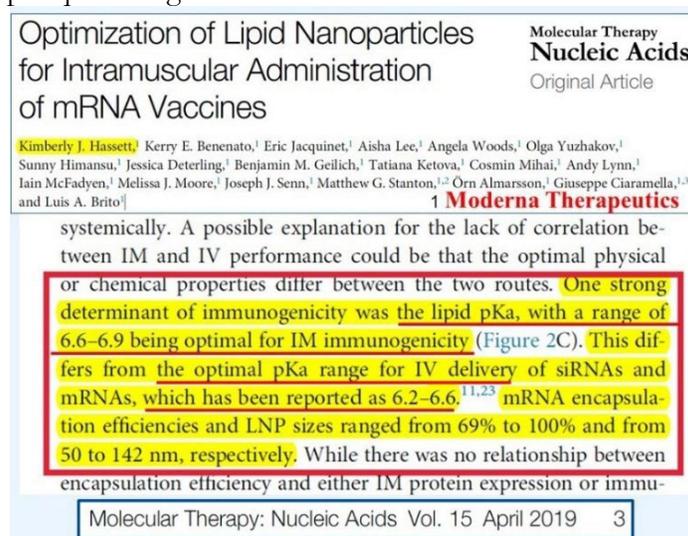


Figura 7. Estratto dell'articolo scientifico di Moderna Therapeutics (2021) sull'ottimizzazione delle LNP per somministrazione intramuscolare ed endovenosa (Hassett et al., 2019).

Ma ciò che appare ancor più singolare si trova a pagina 3 dello studio, a proposito del *valore ottimale* di pKa (giustamente definito come “strong determinant”, un *forte determinante*) che i lipidi dovrebbero avere per essere adatti alla somministrazione intramuscolare:

[...] Un forte determinante dell'immunogenicità è costituito dal pKa lipidico, con un intervallo di **6,6-6,9** che risulta ottimale per l'immunogenicità IM [intramuscolare] [...]. Ciò differisce dall'intervallo ottimale di pKa per la somministrazione endovenosa di siRNA e mRNA, che è stato riscontrato essere **6,2-6,6**. (Figura 7).

L'articolo scientifico di Hassett et al., citato da EMA a sostegno del presunto ruolo ideale svolto da ALC-0315 nella somministrazione intramuscolare del vaccino Comirnaty, spiega in modo chiaro e completo che l'intervallo ottimale di pKa lipidico per *le applicazioni intramuscolari* dovrebbe essere compreso tra 6,6 e 6,9.

Tale intervallo è considerato ottimale, in quanto le LNP con questi valori di pKa producono una risposta immunitaria efficiente dopo la somministrazione intramuscolare di mRNA (P. Patel et al., 2021).

È quindi chiaro che ALC-0315 non è adatto per la somministrazione intramuscolare, poiché il suo pKa apparente (6,09) è molto più basso dell'ottimale (Figura 8), rendendo la composizione del vaccino a RNA troppo instabile e inefficace per via intramuscolare.

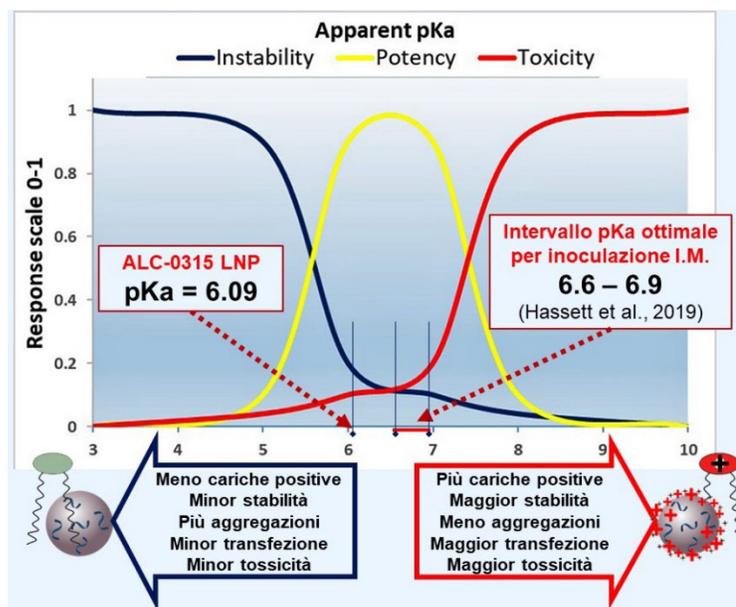


Figura 8. pKa lipidico di ALC-0315 in relazione all'instabilità, alla potenza e alla tossicità. Modified from Trends in Pharmacological Sciences, Vol. 42(6), 448–460, Patel et al., 2021, *The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA*, pagina No. 458, copyright © 2021, with permission from Elsevier Ltd.

Secondo Hassett et al., non sarebbe adatto nemmeno per la somministrazione endovenosa, dato che quest'ultima richiede valori apparenti di pKa compresi tra 6,2 e 6,6. L'intervallo ottimale indicato da Hassett et al. è in netta contraddizione con le informazioni tecniche che l'EMA stessa evidenzia nel suo rapporto di valutazione ufficiale sul prodotto medicinale *Comirnaty*, proprio in riferimento al suo *driver primario* ALC-0315.

Alla luce di quanto finora esposto e di quanto verrà ulteriormente presentato in seguito, affermare che le LNP di Comirnaty consentono la trasfezione delle cellule ospiti *dopo la somministrazione intramuscolare* (i.m.) e che ALC-0315 *consente alle LNP di avere una carica neutra in un ambiente fisiologico per facilitare l'internalizzazione*, è scientificamente inaccettabile e potenzialmente fuorviante, in quanto promuove l'idea che la composizione del vaccino Comirnaty a base di LNP sia stata in qualche modo "ottimizzata" per *l'inoculazione intramuscolare*. Tale affermazione è sconfessata dallo stesso riferimento su cui essa si basa.

In ultima analisi, è evidente (vedasi Figura 8), che il valore apparente del pKa di ALC-0315 è troppo

basso per essere definito *ottimale*, e che un valore così basso rende instabile l'intera struttura delle LNP, inducendo la formazione di aggregati e particolati, che possono inibire la trasfezione e influenzare inevitabilmente, non solo l'efficacia del prodotto, ma, altresì, la biodistribuzione e la bioaccumulazione di nanoparticelle lipidiche in tessuti e organi inaspettati. La bioaccumulazione può portare al blocco dei piccoli vasi sanguigni e linfatici, mentre una biodistribuzione anomala significa che la morte cellulare [apoptosi] e l'infiammazione causate dal vaccino a mRNA COVID-19 potrebbero verificarsi in organi non previsti dal suo destino biologico, come ad esempio cervello, placenta e testicoli (Parry, P.I., et al., 2023; Zhou, Y., et al., 2018; Wick, P., et al., 2010).

Altre significative evidenze relative all'inidoneità del medicinale *Comirnaty* per l'applicazione intramuscolare, nonché alla sua instabilità e inefficacia dovute alla formazione di aggregazioni e agglomerazioni di LNP causate dall'aggiunta di composti ionici destabilizzanti (costituenti del tampone pH denominato *PBS buffer*), sono già state descritte in dettaglio (Segalla, 2023).

PREDOMINANZA DELLA FORMA LIPIDICA PROTONATA CITOTOSSICA DURANTE I PROCESSI ENDOCITOTICI

Nell'ambiente acido degli endosomi, i gruppi amminici vengono protonati e la loro carica positiva favorisce l'interazione con i lipidi anionici dell'endosoma, inducendo la destabilizzazione della membrana endosomiale e favorendo il rilascio di mRNA nel citosol (Wan et al., 2014; Draz et al., 2014; Tam et al., 2013), come anche brevemente accennato nel succitato rapporto di EMA:

[...] In generale, in seguito all'endocitosi delle LNP, l'mRNA viene rilasciato dall'endosoma nel citosol della cellula ospite (Sahay et al, 2010; Maruggi et al, 2019).

La nanoparticella inglobante l'RNA, una volta penetrata per endocitosi nella cellula, subisce vari passaggi attraverso endosomi precoci, endosomi tardivi e lisosomi, lungo un gradiente di pH decrescente (Figura 9), fino a quando la sua carica cationica provoca la rottura della membrana endosomiale e il conseguente rilascio di RNA all'interno del citosol (P. Patel, et al., 2021).

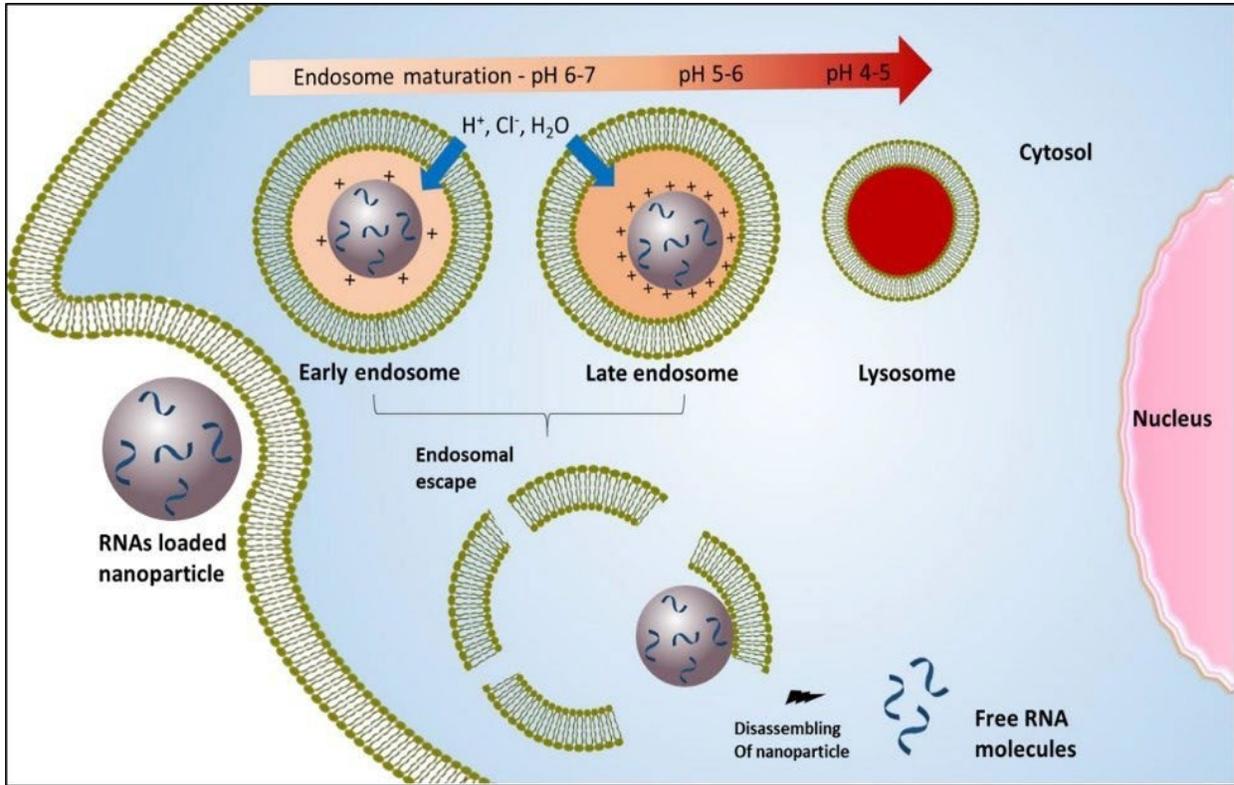


Figura 9. Rilascio di RNA nel citoplasma attraverso la fuga endosomiale con nanoparticelle ionizzabili. Una volta che le nanoparticelle vengono assorbite dalle cellule, le cariche sulla nanoparticella aumentano man mano che il pH scende al di sotto del pKa durante la maturazione endosomiale (pH 7-5,5). Le cariche sulle nanoparticelle diminuiscono nel citosol e indeboliscono l'interazione di legame con gli RNA. Infine, le nanoparticelle si dissociano per rilasciare le molecole di RNA e produrre l'attività desiderata.

Ristampato da *Trends in Pharmaceutical Sciences*, Vol. 42(6), 448–460, Patel et al., 2021, *The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA*, pagina No. 451, Copyright © 2021, with permission from Elsevier Ltd.

Il pH diminuisce quindi lungo il sistema endosomiale-lisosomiale: gli endosomi precoci hanno un pH compreso tra 6 e 7, gli endosomi tardivi hanno un pH compreso tra 5 e 6 e nei lisosomi il pH può diminuire fino a 4,5 (Hu et al., 2015).

Applicando l'equazione (4) alla composizione a base di LNP del vaccino Comirnaty, possiamo calcolare il rapporto $[R_3N]/[R_3NH^+]$ e, di conseguenza, la percentuale delle specie protonate (cioè le più citotossiche), a varie condizioni di pKa e pH, come segue:

- Prima dell'endocitosi: pH fisiologico 7,4; pKa apparente di ALC-0315/LNP: 6,09
- Negli endosomi precoci: pH 6,5; pKa apparente di ALC-0315/LNP: 6,09.
- Negli endosomi tardivi: pH 5,5; pKa apparente di ALC-0315/LNP: 6,09.
- Nei lisosomi: pH 4,5; pKa apparente di ALC-0315/LNP: 6,09.
- Nel citosol, dopo la fuoriuscita dall'endosoma e il disassemblaggio delle LNP: pH 7,4; pKa intrinseco di ALC-0315: 9,6.

I risultati sono illustrati nella Tabella 1 e nella Figura 10.

Tabella 1.

Equazione di Henderson-Hasselbach applicata al processo di endocitosi di COMIRNATY - Pfizer/ BioNTech					
FASI DELLA VIA ENDOCITICA	pH	pKa	Rapporto $[R_3N] / [R_3NH^+]$	% Forma protonata $[R_3NH^+]$	% Forma deprotonata $[R_3N]$
ALC-0315/ LNP prima dell'endocitosi	7.4	6.09 (apparente)	20.42	4.67%	95.33%
ALC-0315/ LNP in endosomi precoci	6.5	6.09 (apparente)	2.57	28.01%	71.99%
ALC-0315/ LNP in endosomi tardivi	5.5	6.09 (apparente)	0.26	79.55%	20.45%
ALC-0315/ LNP in lisosomi	4.5	6.09 (apparente)	0.03	97.49%	2.51%
ALC-0315 nel citosol dopo disassemblaggio	7.4	9.6 (intrinseco)	0.01	99.37%	0.63%

Un'altra questione che non può essere trascurata è senza dubbio l'enorme differenza tra i valori di pKa apparente e di pKa intrinseco delle specie lipidiche ionizzabili, in particolare per il preparato Pfizer. Considerando che questi valori sono valori logaritmici, una differenza di 3,51 tra il pKa intrinseco e il pKa apparente di ALC-0315 significa che la sua tendenza *intrinseca* alla protonazione (cioè la sua *forza basica*) è 3.236 volte superiore a quella espressa dal suo pKa lipidico *apparente*. Allo stesso modo per SM-102, una differenza tra i due valori di pKa di 2,15 significa una tendenza protonante intrinseca 141 volte superiore a quella apparente. Questo concetto elementare è alla base del sorprendente e improvviso balzo di predominanza delle specie protonate (e quindi della loro citotossicità) durante la via endocitotica, come evidenziato dal grafico di Figura 10.

Va inoltre notato che il valore intrinseco di pKa (9,6) di ALC-0315 rappresenta il valore di pKa più alto in assoluto per un lipide ionizzabile funzionale utilizzato nelle LNP cationiche per l'immunoterapia. Essendo il suo pKa perfino superiore a quello dello ione ammonio (9,25), ALC-0315 esprime una forza basica circa 2 volte superiore a quella dell'ammoniaca stessa, cioè possiede un potere ionizzante due volte superiore a quello di una soluzione acquosa equimolare di ammoniaca.

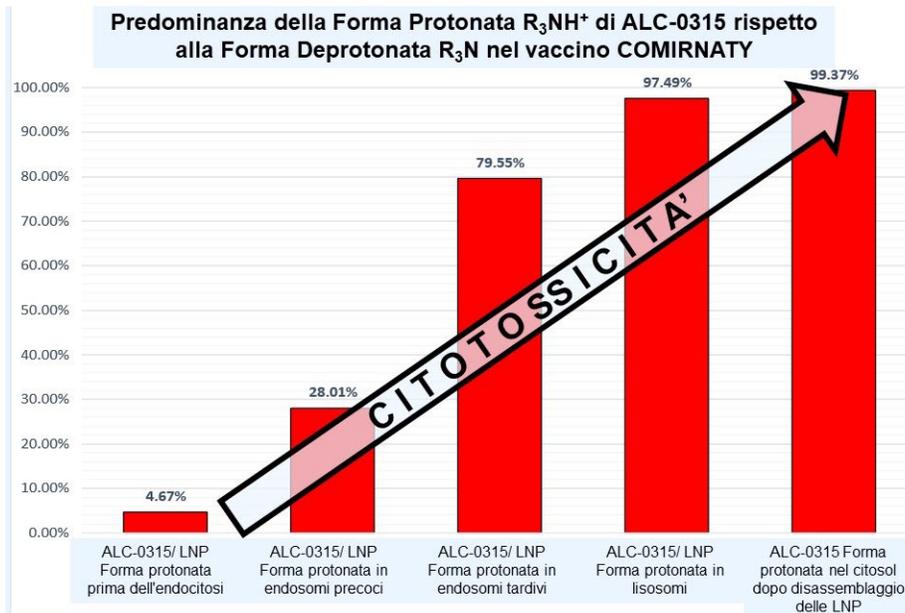


Figura 10. La questione fondamentale che emerge da questi calcoli è che, prima del processo endocitotico, la presenza della forma protonata R_3NH^+ è relativamente bassa e quindi meno citotossica (4,67%), ma poi, non appena le nanoparticelle lipidiche attraversano le fasi di digestione lisosomiale, disassemblaggio e fuoriuscita dall'endosoma nel citosol, la predominanza delle forme protonate citotossiche subisce un incremento fino quasi a raggiungere il suo valore massimo (99,37%). L'equilibrio dell'equazione (1) si sposta praticamente tutto a destra, cioè verso la produzione della specie cationica e più citotossica R_3NH^+ .

Pertanto, le molecole di ALC-0315, una volta penetrate e rilasciate nel citosol, dopo il disassemblaggio dell'involucro delle LNP, raggiungono la massima predominanza della loro forma cationica, ed esprimono così il massimo della loro citotossicità, stimolando la secrezione di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno (Hou et al., 2021). Questi ROS, a loro volta, possono avere conseguenze tossicologiche devastanti, tra cui effetti genotossici (Yun et al., 2016; Yu et al., 2020), dando luogo a problemi molto gravi, a medio e lungo termine, in particolare per le applicazioni parenterali, come precedentemente noto anche allo stesso fabbricante del medicinale Comirnaty (BioNTech patent US 10,485,884 B2, 2019). Inoltre, è bene ricordare che le eccezionali caratteristiche di penetrabilità, mobilità, reattività chimica e l'accumulo sistemico di nanoparticelle cationiche incontrollabili, con alti livelli di citotossicità, in sedi biologiche imprevedibili, anche lontane dal sito di inoculazione, hanno provocato un disastro medico, che, seppur prevedibile, è senza precedenti. Va altresì notato che, con qualsiasi agente che provoca danni genetici, compresi i farmaci antitumorali citotossici, c'è il rischio dell'insorgere di tumori (inclusa la leucemia), e c'è, inoltre, un limite alla dose complessiva che può essere tollerata. Pertanto, la prospettiva di "richiami" COVID ripetuti frequentemente, e anche quella di estendere la tecnologia mRNA ai vaccini contro altri agenti patogeni o malattie non infettive, evoca un rischio molto grave per la salute pubblica (Palmer et al., 2022).

CONCLUSIONI E PROSPETTIVE

Il corpus del lavoro presentato in questo studio include diverse evidenze chimico-fisiche, biochimiche e tossicologiche che mostrano chiaramente e dimostrano in modo inconfutabile come il prodotto medicinale denominato *vaccino Comirnaty COVID-19 mRNA BNT162b2*, non solo sia inadatto all'inoculazione intramuscolare, ma sia anche caratterizzato da un elevato grado di tossicità,

le cui conseguenze devastanti possono manifestarsi sia a breve che a medio e lungo termine, a causa dell'effetto *shedding* [dispersione casuale] nella biodistribuzione e bioaccumulazione delle LNP.

Le principali ragioni di tale inadeguatezza e criticità sono rappresentate dai seguenti fattori:

- Il valore del pKa apparente (6,09) del lipide ionizzabile ALC-0315 è ben lungi dall'essere stato ottimizzato per la somministrazione intramuscolare. Il suo valore è in realtà troppo basso per consentire una corretta trasfezione della cellula ospite, nonostante quanto incautamente affermato da EMA a pagina 42 del suo rapporto di valutazione del 19 febbraio [2021](#), in flagrante contraddizione con la stessa fonte bibliografica ivi citata (Hassett et al, [2019](#)).
- Il valore del pKa intrinseco (9,6) del lipide ionizzabile ALC-0315 è troppo alto, il che lo rende una base più forte dell'ammoniaca stessa (pKa [9,25](#)) in soluzione acquosa, e lo rende quindi pressoché completamente protonato una volta rilasciato nel citosol della cellula ospite, a pH fisiologico.
- Tale elevata carica cationica, acquisita da ALC-0315 dopo la sua fuga endosomiale, stimola la formazione di citochine pro-infiammatorie e specie reattive dell'ossigeno, che possono distruggere la membrana mitocondriale e rilasciarne il contenuto, causare errori di traduzione dell'RNA, polimerizzazione di proteine e DNA, mutazioni del DNA, distruzione della membrana nucleare e conseguente rilascio del suo contenuto (Yu et al., [2020](#)).
- Questo meccanismo di tipo "cavallo di Troia" determina l'apparentemente bassa tossicità della LNP prima dell'internalizzazione, facilitandone la penetrazione nella cellula ospite. Tuttavia, una volta penetrata e rilasciata nel citosol, l'LNP viene disassemblata e i suoi frammenti lipidici cationici sono liberi di esprimere il loro elevato pKa intrinseco e quindi la loro massima citotossicità.
- Un'elevata tossicità chimica delle LNP ionizzabili cationiche, massimizzata nel vaccino Comirnaty dall'estremo potere ionizzante di ALC-0315, deve tuttavia essere prevista anche in altri e futuri vaccini che utilizzano la stessa tecnologia di veicolazione, ovvero la piattaforma mRNA basata su LNP cationiche, indipendentemente dal fatto che esse siano dirette contro la proteina spike, o un altro antigene di SARS-CoV-2, o un antigene o una malattia completamente diversi.
- Ci sono prove scientifiche schiaccianti che dimostrano come le nanoparticelle lipidiche utilizzate nei vaccini COVID-19 inducano una significativa secrezione di citochine infiammatorie e proteine macrofagiche infiammatorie che possono provocare la morte cellulare. Questo effetto pro-infiammatorio delle nanoparticelle lipidiche cationiche aumenterebbe l'immunogenicità adiuvante dei vaccini a mRNA COVID-19 e si aggiungerebbe agli eventi avversi causati dalla tossicità della proteina spike. (Ndeupen et al., [2021](#); Parry et al., [2023](#)).

Un'ultima parola

E' da ritenersi prioritario che vengano condotti studi approfonditi e a lungo termine nelle appropriate sedi istituzionali, cliniche e forensi, soprattutto in relazione ad eventuali nessi causali o concausali tra quanto qui presentato e l'ampia eterogeneità patologica di eventi avversi gravi o letali che si sono verificati e si stanno ancora verificando, dopo le vaccinazioni, al fine di adottare e accelerare tutte le opportune azioni correttive e preventive a difesa della salute pubblica, compresa la cessazione della somministrazione di vaccini COVID-19 a mRNA in nanoparticelle lipidiche, conformemente al principio di precauzione, e alla luce dell'**Articolo 10 del Codice di Norimberga**:

Durante l'esperimento lo scienziato responsabile deve essere pronto a interromperlo in qualunque momento se indotto a credere che la continuazione dell'esperimento comporterebbe probabilmente lesioni, invalidità o morte per il soggetto umano.

Finanziamenti e conflitti di interesse

L'autore dichiara di non aver ricevuto alcun finanziamento per influenzare quanto qui affermato e che la ricerca è stata condotta in assenza di qualsiasi relazione commerciale o finanziaria che possa essere interpretata come un potenziale conflitto di interessi.

Riferimenti

- Alabi, C., A., Love, K.T., Sahay, G., Anderson, D.G. (2013). Multiparametric approach for the evaluation of lipid nanoparticles for siRNA delivery. *PNAS*, 110 (32), 12881–12886. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306529110>
- Barone, F., De Angelis, I., Andreoli, C., Battistelli, C.L., Arcangeli, C., & Leter, G. (2017). Metodi in vitro e in silico per la valutazione del potenziale tossicologico dei nanomateriali [In vitro and in silico methods for evaluating the toxicological potential of nanomaterials]. *ENEA -Focus 3/2017 Energia, ambiente e innovazione*. DOI [10.12910/EAI2017-045](https://doi.org/10.12910/EAI2017-045)
- Buschmann, M.D., Carrasco, M.J., Alishetty, S., Paige, M., Alameh, M.G., Weissman, D. (2021). Nanomaterial Delivery Systems for mRNA Vaccines. *Vaccines*, 9(1), 65. <https://doi.org/10.3390/vaccines9010065>
- Buyens, K., De Smedt, S.C., Braeckmans, K., Demeester, J., Peeters, L., Van Grunsven, L.A., de Mollerat du Jeu, X., Sawant, R., Torchilin, V., Farkasova, K., Ogris, M., Sanders, N.N. (2012). Liposome based systems for systemic siRNA delivery: stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. *J. Control.*, 158, 362-370. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.009>
- Demple, B., Harrison, L. (1994). Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem.* 63:915-48. doi: [10.1146/annurev.bi.63.070194.004411](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.004411).
- Draz, M.S., Fang, B.A., Zhang, P., Hu, Z., Gu, S., Weng, K.C., et al. (2014). Nanoparticle-mediated systemic delivery of siRNA for treatment of cancers and viral infections. *Theranostics* 4, 872. <https://doi.org/10.7150/thno.9404>
- Fröhlich, E. (2012). The role of surface charge in cellular uptake and cytotoxicity of medical nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 7:5577-5591 <https://doi.org/10.2147/IJN.S36111>
- 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* Vol. 15, 1-11 <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.01.013>
- Hou, X., Zaks, T., Langer, R., Dong, Y. (2021). Lipid nanoparticles for mRNA delivery. *Nat Rev Mater* 6, 1078–1094. <https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0>
- Hu, Y.B., Dammer, E., Ren, R.J., Wang, G. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4, 18. <https://doi.org/10.1186/s40035-015-0041-1>
- Imlay, J.A., Linn, S. (1988, June 3). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*. 240(4857):1302-9. <https://www.science.org/doi/10.1126/science.3287616>
- Jayaraman, M., Ansell, S.M., Mui, B.L., Tam, Y. K., Chen, J., Du, X., Butler, D., Eltepu, L., Matsuda, S., Narayanannair, J.K., Rajeev, K.G., Hafez, I.M., Akinc, A., Maier, M.A., Tracy, M.A., Cullis, P.R., Madden, T. D., Manoharan, M., Hope, M.J. (2012). Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 8529 –8533. <https://doi.org/10.1002/anie.201203263>
- Kanasty, R.L., Whitehead, K.A., Vegas, A.J., Anderson, D.G. (2012). Action and Reaction: The Biological Response to siRNA and Its Delivery Vehicles. *Molecular Therapy* 20 (3), 513–524. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.294>
- Lee, J.M., Yoon, T.J., Cho, Y.S. (2013). Recent developments in nanoparticle-based siRNA delivery for cancer therapy. *BioMed Res. Int.* 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/782041>

- Maki, H., Sekiguchi, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273–275. <https://doi.org/10.1038/355273a0>
- Maruggi, G., Zhang, C., Li, J., Ulmer, J.B., Yu, D. (2019). mRNA as a Transformative Technology for Vaccine Development to Control Infectious Diseases. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.020>
- Midoux, P., Pichon, C. (2015). Lipid-based mRNA vaccine delivery systems. *Expert Review of Vaccines*, 14 (2), 221-234. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.986104>
- Nance, K.D., Meier, J.L. (2021). Modifications in an emergency: the role of n1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS Central Science*, 7(5), 748–756. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.1c00197>
- Ndeupen, S., Qin, Z., Jacobsen, S., Bouteau, A., Estanbouli, H., Igyarto, B.Z. (2021). The mRNA-LNP platform's lipid nanoparticle component used in preclinical vaccine studies is highly inflammatory. *iScience* 24, 103479. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2021.103479>
- Ozpolat, B., Sood, A.K., Lopez-Berestein, G. (2014). Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66, 110–116. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.12.008>
- Palmer, M., Bhakdi, S., Wodarg, W. (2022). Expertise on the genotoxic risks of the Pfizer COVID-19 vaccine. <https://childrenshealthdefense.eu/wp-content/uploads/2022/07/att.-3-genotoxicity-mRNA-vaccines-scientific-report.pdf>
- Parry, P.I., Lefringhausen, A., Turni, C., Neil, C. J., Cosford, R., Hudson, N.J., Gillespie, J. (2023). ‘Spikeopathy’: COVID-19 Spike Protein Is Pathogenic, from Both Virus and Vaccine mRNA. *Biomedicines*, 11, 2287. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11082287>
- Patel, P., Ibrahim, N.M., Cheng, K. (2021). The Importance of Apparent pKa in the Development of Nanoparticles Encapsulating siRNA and mRNA. *Trends in Pharmacological Sciences*, 42(6), 448–460. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2021.03.002>
- Patel, S., Kim, J., Herrera, M., Mukherjee, A., Kabanov, A.V., Sahay, G. (2019). Brief update on endocytosis of nanomedicines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 144, 90-111. <https://doi.org/10.1016%2Fj.addr.2019.08.004>
- Sahay G., Alakhova, D.Y., Kabanov, A.V. (2010) Endocytosis of nanomedicines. *J Control Release*, 145-182 <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.036>
- Szebeni, J. (2014). Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. *Mol. Immunol.* 61, 163–173. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.06.038>
- Segalla, G. (2023). Chemical-physical criticality and toxicological potential of lipid nanomaterials contained in a COVID-19 mRNA vaccine. *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research*, 3(1), 787–817. <https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.68>
- Tam, Y.Y.C., Chen, S., Cullis, P.R. (2013). Advances in lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Pharmaceutics* 5 (3), 498-507. <https://doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics5030498>
- Wan, C., Allen, T., Cullis, P. (2014). Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics. *Drug Deliv Transl Res.* 4 (1), 74-83. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0161-z>
- Wick, P., Malek, A., Manser, P., Meili, D., Maeder-Althaus, X., Diener, L., Diener, P.A., Zisch, A., Krug, H.F., von Mandach, U. (2010). Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ. Health Perspect.*, 118, 432–436. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901200>
- Yu, Z., Li, Q., Wang, J., Yu, Y., Wang, Y., Zhou, Q. (2020). Reactive Oxygen Species-Related Nanoparticle Toxicity in the Biomedical Field - *Nanoscale Res Lett* 15, 115 <https://doi.org/10.1186/s11671-020-03344-7>
- Yun, C.H., Bae, C.S., & Ahn, T. (2016). Cargo-Free Nanoparticles Containing Cationic Lipids Induce Reactive Oxygen Species and Cell Death in HepG2 Cells - *Biol Pharm Bull.* 39(8):1338-46 <https://doi.org/10.1248/bpb.b16-00264>
- Zhang, J., Li, X., Huang, L. (2014). Non-viral nanocarriers for siRNA delivery in breast cancer. *J. Control. Release.* 190, pp. 440 - 450. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.05.037>
- Zhang, C., Ma, Y., Zhang, J., Kuo, J.C.T., Zhang, Z., Xie, H., Zhu, J., Liu, T. (2022). Modification of Lipid-Based *International Journal of Vaccine Theory, Practice, and Research* 3(1) October 16, 2023 | Page 972
<https://doi.org/10.56098/ijvtpr.v3i1.84>

Nanoparticles: An Efficient Delivery System for Nucleic Acid-Based Immunotherapy. *Molecules* 27(6), 1943. <https://doi.org/10.3390/molecules27061943>

Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E.S., Leblanc, R.M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J. Control Release*, 270, 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.12.015>

Esonero da responsabilità legali

Le informazioni sul sito web e nell' **IJVTPR** non sono intese come diagnosi, trattamento raccomandato, prevenzione o cura per qualsiasi condizione umana o procedura medica a cui si possa fare riferimento in qualsiasi modo. Gli utenti e i lettori che possono essere genitori, tutori, caregiver, medici o parenti di persone colpite da una qualsiasi delle condizioni morbose, procedure o protocolli a cui si può fare riferimento, devono utilizzare il proprio giudizio in merito ad applicazioni specifiche. Gli autori che contribuiscono, gli editori e le persone associate a qualsiasi titolo al sito web e/o alla rivista declinano ogni responsabilità nei confronti di qualsiasi persona o entità per qualsiasi danno, perdita finanziaria, lesione fisica o altra sanzione che possa derivare da qualsiasi uso o applicazione in qualsiasi contesto di informazioni, conclusioni, risultati di ricerca, opinioni, errori, o qualsiasi dichiarazione trovata sul sito web o nell' **IJVTPR**. Il materiale presentato è offerto gratuitamente a tutti gli utenti che potrebbero essere interessati ad esaminarlo, ma il modo in cui possono scegliere di applicare qualsiasi parte di esso, è di esclusiva responsabilità dello spettatore/utente. Se il materiale viene citato o ristampato, gli utenti sono pregati di citare la fonte/autore e di conformarsi ai requisiti non-commerciali, non-derivati del [Creative Commons License 4.0 NC D](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).