

I VACCINI 4

MCV 2023



Vaccini a subunità (3)

- *Proteici*
- ***Polisaccaridi***
- *Coniugati*

Bersaglio: batteri circondati da una capsula polisaccaridica che aiuta il microorganismo ad evadere il sistema immunitario

Il vaccino polisaccaridico sviluppa una risposta contro delle molecole della capsula

Spesso queste molecole sono poco immunogeniche.

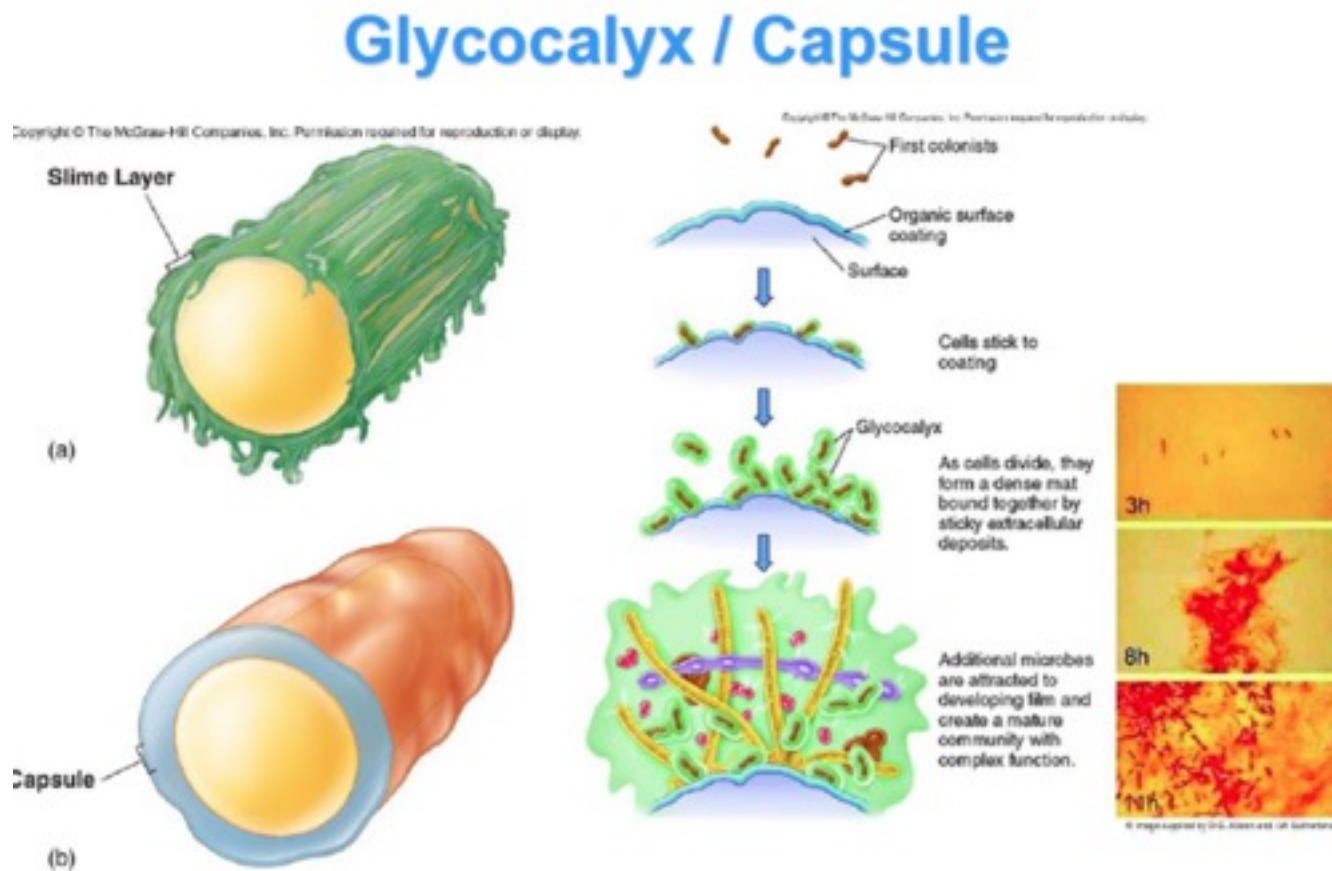
- ❑ I neonati e i bambini (<24 mesi) non rispondono
- ❑ Gli altri hanno una risposta immunitaria poco efficiente: attivazione di esclusiva dei linfociti B
 - ❑ Risposta immunitaria lenta
 - ❑ Livello di anticorpi bassi
 - ❑ Assenza di cellule della memoria

→ *Meningococco*

→ *Pneumococco*



Il ruolo della capsula batterica nei vaccini



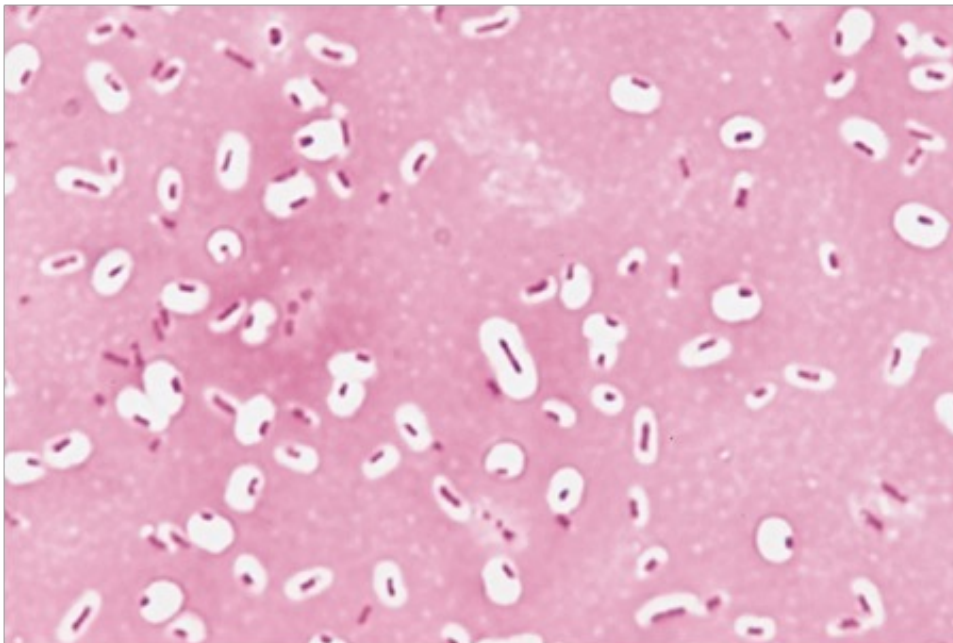
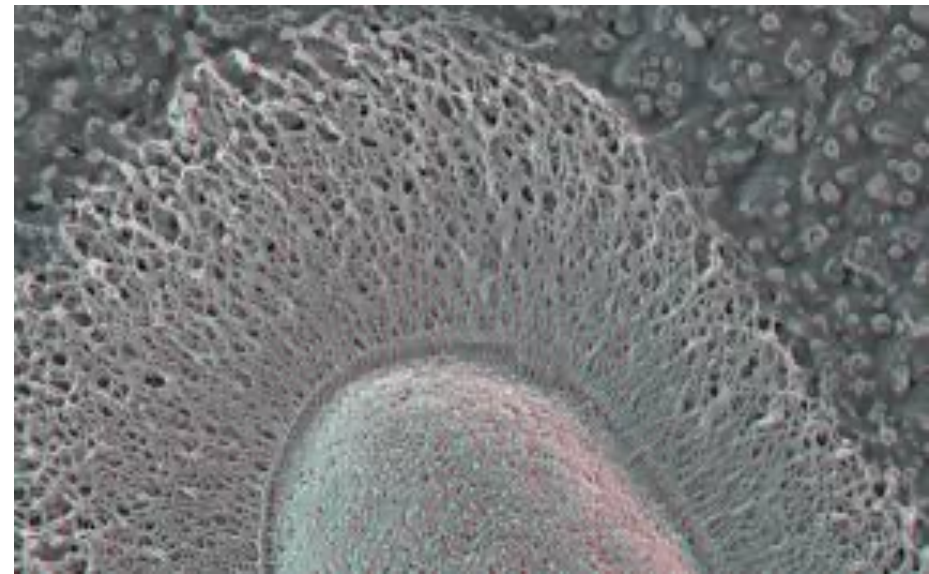
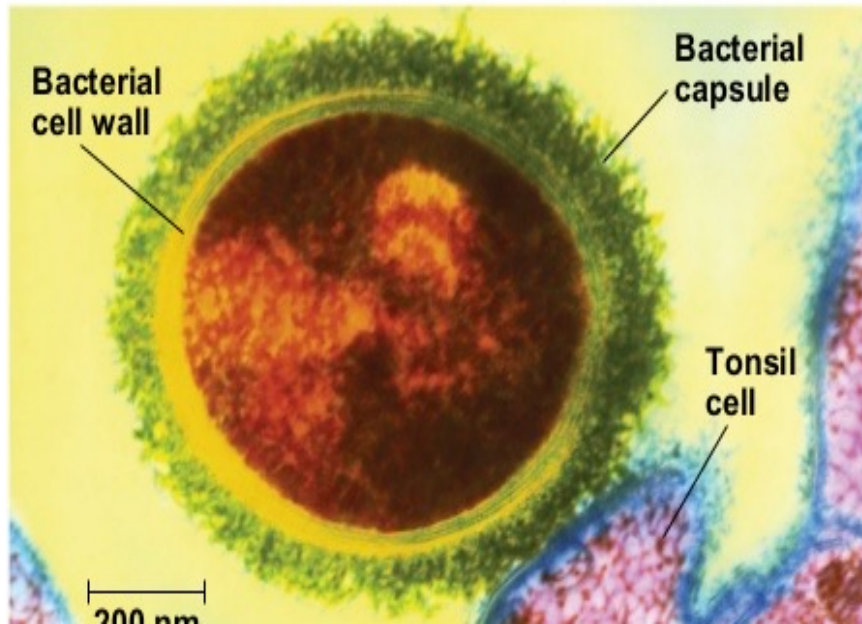


Tabella 2.4 Composizione chimica di alcune capsule batteriche.

BATTERIO	COMPOSIZIONE DELLE CAPSULE	MONOMERI
Gram positivi		
<i>Bacillus anthracis</i>	Poliipeptidi (acido poliglutamico)	Acido D-glutamico
<i>Bacillus megaterium</i>	Poliipeptidi e polisaccaridi	Acido D-glutamico, amminozuccheri, zuccheri
<i>Streptococcus mutans</i>	Polisaccaridi	(Destrano) glucosio
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Polisaccaridi	Zuccheri, amminozuccheri, acido uronico
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Polisaccaridi (acido ialuronico)	N-acetil-glucosammina e acido glucuronico
Gram negativi		
<i>Acetobacter xylinum</i>	Polisaccaridi	(Cellulosa) glucosio
<i>Escherichia coli</i>	Polisaccaridi (acido colanico)	Glucosio, galattosio, fucosio, acido glucuronico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Polisaccaridi	Acido mannuronico
<i>Azotobacter vinelandii</i>	Polisaccaridi	Acido glucuronico
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Polisaccaridi	(Glucano) glucosio

Vaccini a sub unità (4)

- *Proteici*
- *Polisaccaridi*
- **Coniugati**

- *Meningococco*
- *Pneumococco*
- *Haemophilus influenzae* type b (Hib)



Bersaglio: batteri circondati da una capsula polisaccaridica che aiuta il microorganismo ad evadere il sistema immunitario

Il vaccino coniugato sviluppa una risposta contro le molecole della capsula

- molto più efficiente del vaccino polisaccaridico
- attivazione di **linfociti B** e di **linfociti T**

Come?

- ❑ Lo zucchero viene legato (coniugato) ad una proteina “carrier”
 - ❑ Sviluppo di una risposta più forte
 - ❑ Produzione di cellule della memoria
 - ❑ Efficiente nei bambini di età pediatrica

Proteine “carrier” le più usate: - anatoxina difterica
- anatoxina tetanica

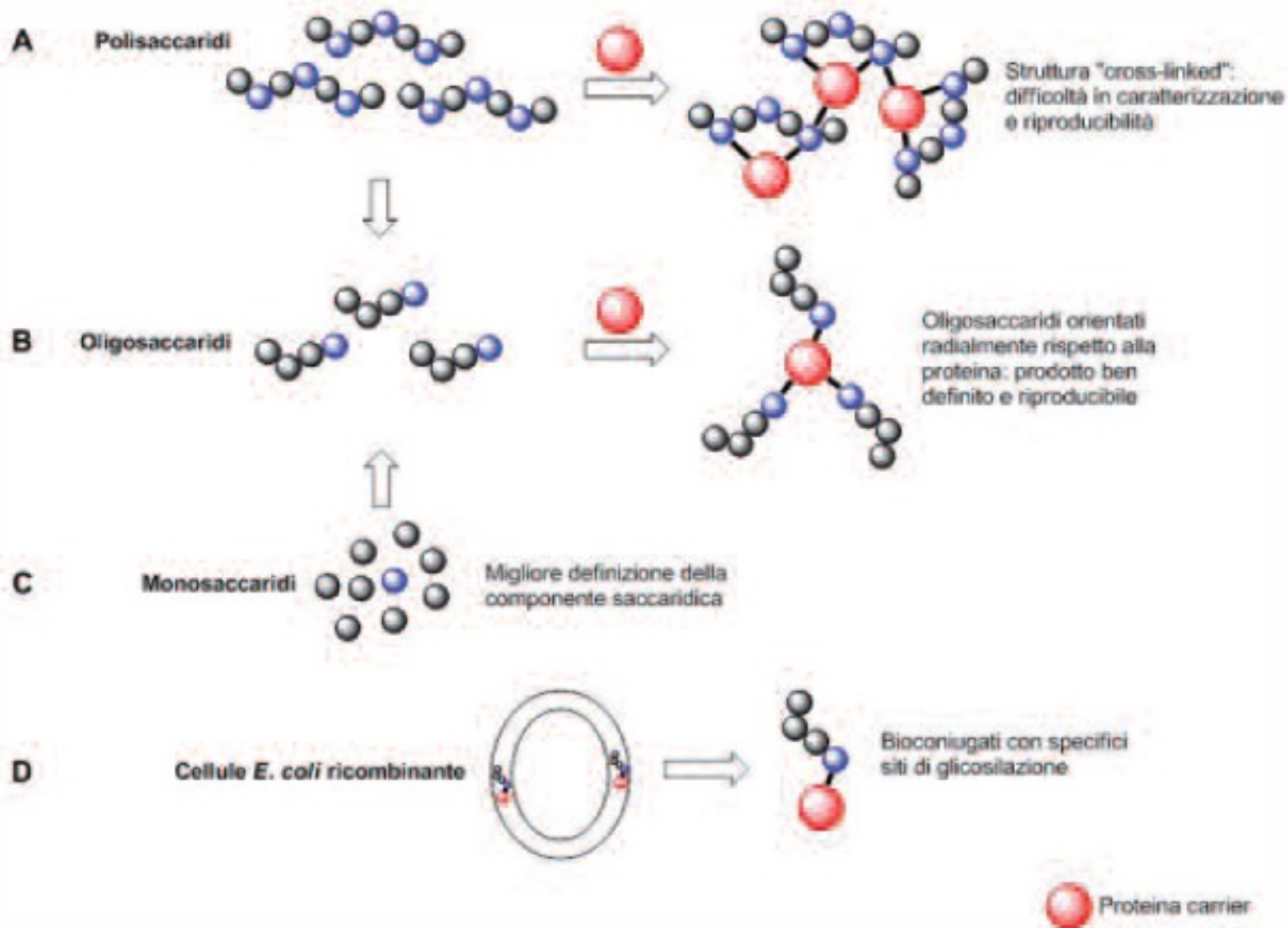
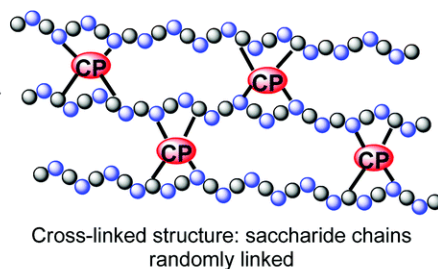
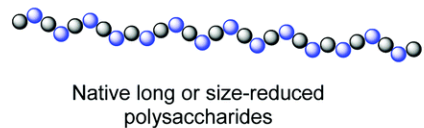
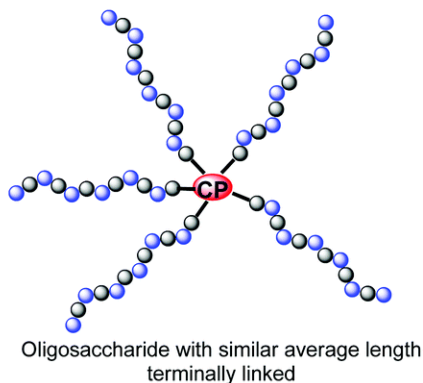
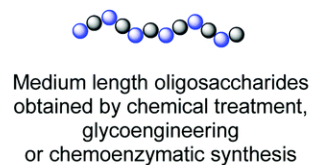


Fig. 1 - Rappresentazione schematica delle differenti strategie applicate per la preparazione dei glicoconiugati

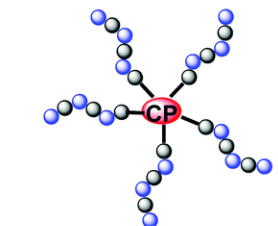
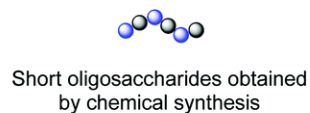
A)



B)



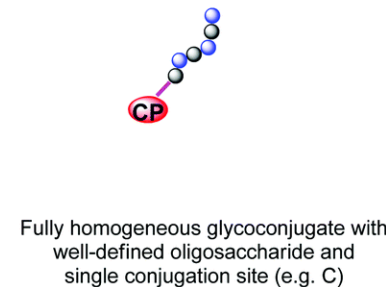
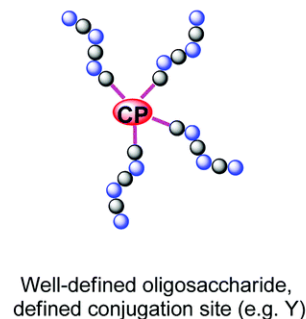
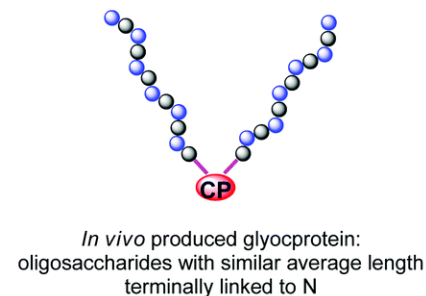
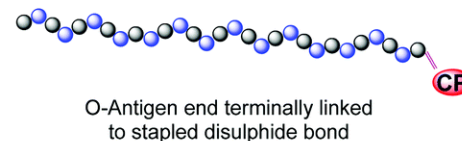
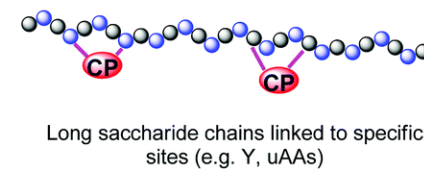
C)

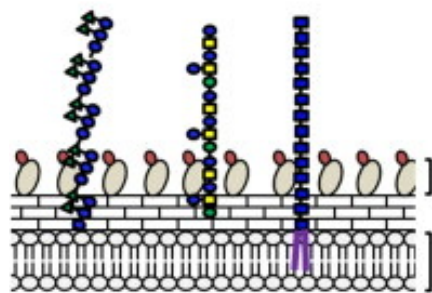


CP: Carrier Protein

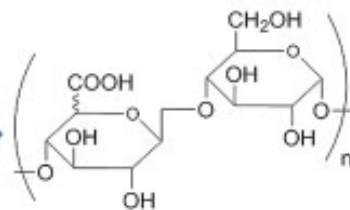
RANDOM CONJUGATION

SITE-SELECTIVE CONJUGATION





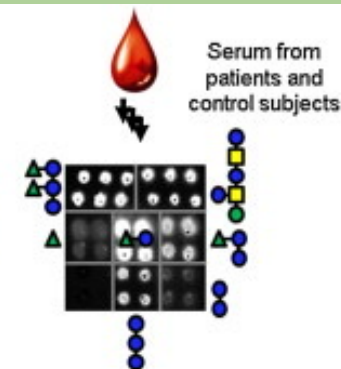
Cell surface glycans



Structural elucidation of Repeating units



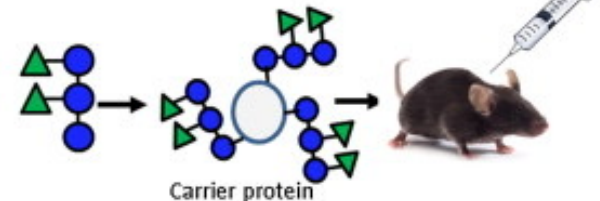
Chemical synthesis of Repeating units



Screening for antibodies against the synthetic haptens



Glycoconjugation and immunization

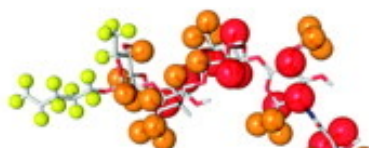


Carrier protein

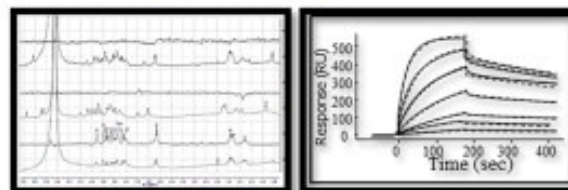


mAb

Monoclonal antibody development

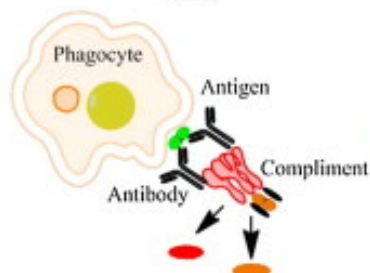


Epitope mapping*



STD-NMR

SPR



In vitro surrogate assay



Optimal design of carbohydrate antigen

Pneumococco: generalità

- **Patologie:**

- Malattie non invasive: **otite** (40-50%) / **polmonite**
- Malattie invasive: **meningite** / osteomielite / etc...

- **Persone a rischio:**

- **Bambini di età <2 anni**

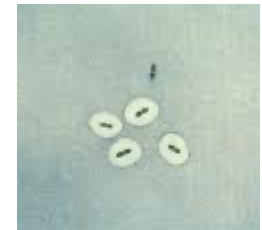
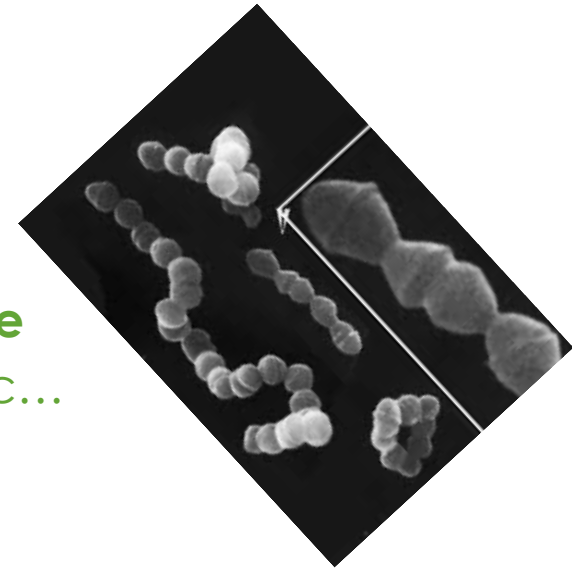
→ una delle prime cause di decesso nei Paesi in via di sviluppo

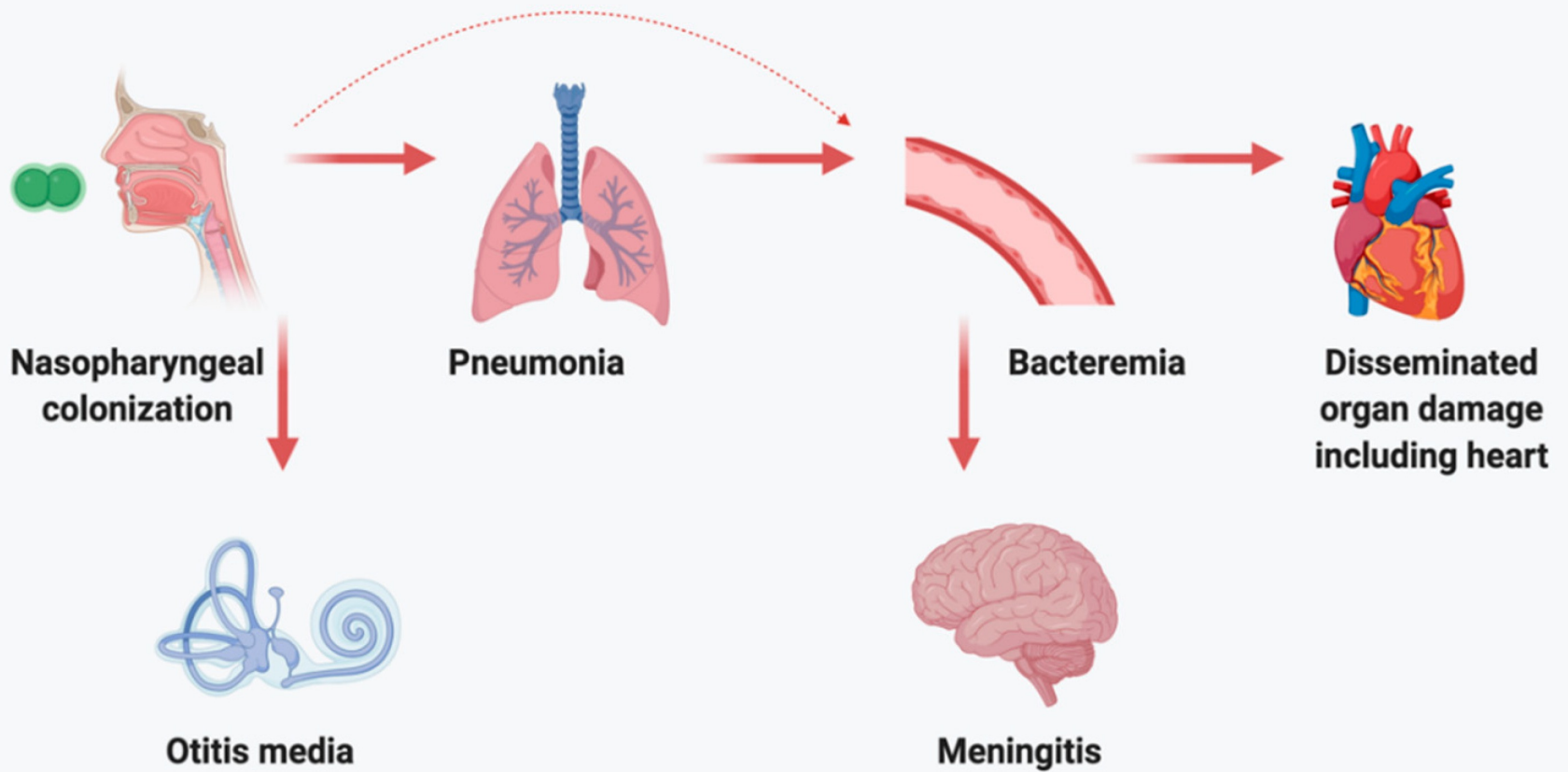
→ prima causa di meningite batterica nei Paesi industrializzati nei bambini <1 anno

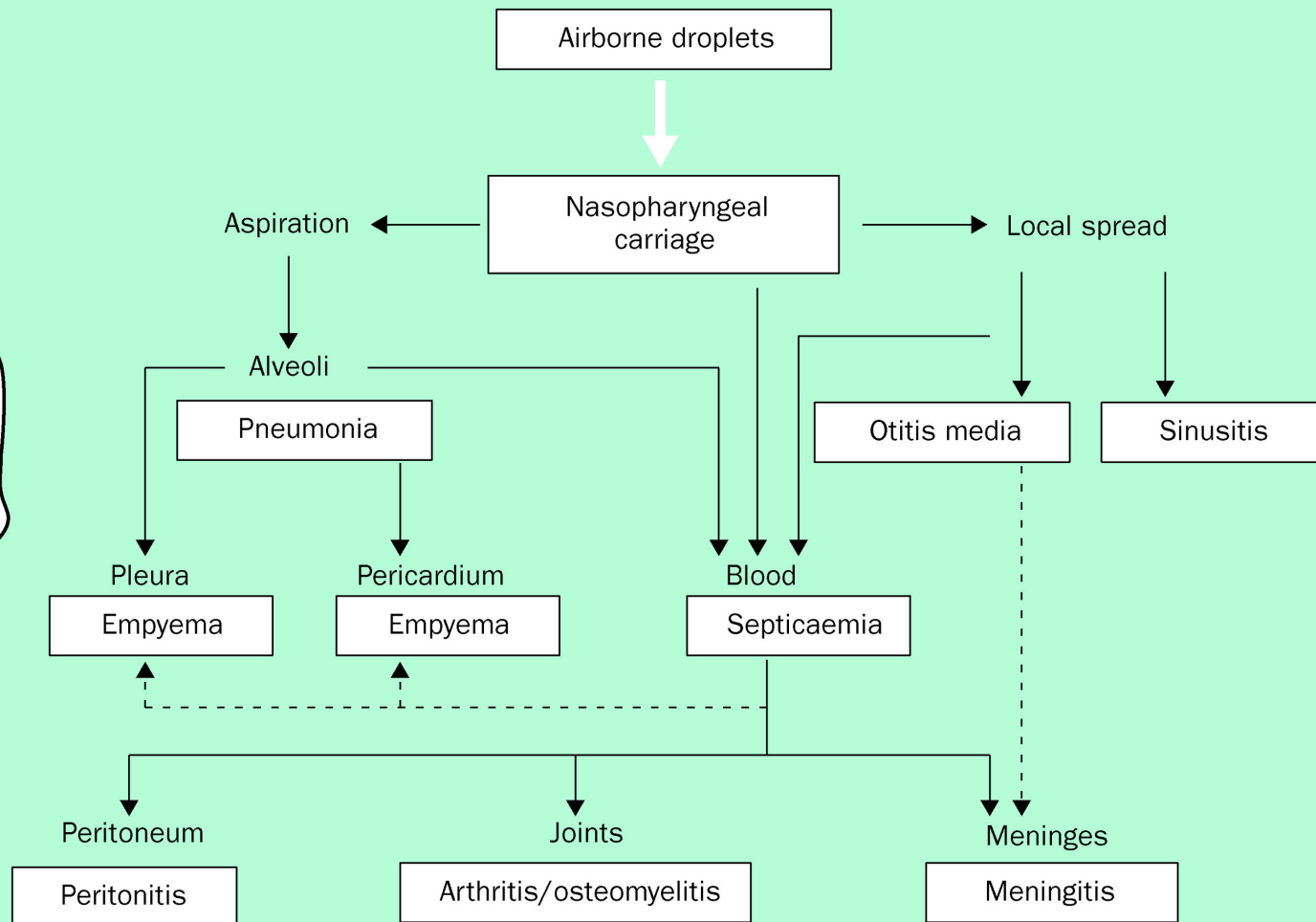
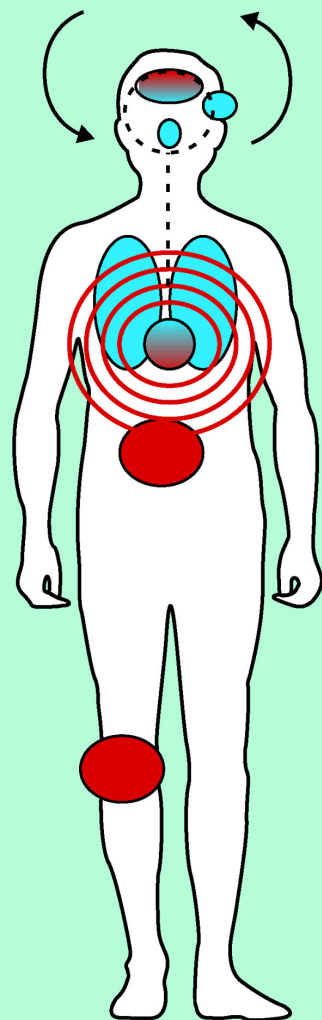
- **Adulti di età >65anni**

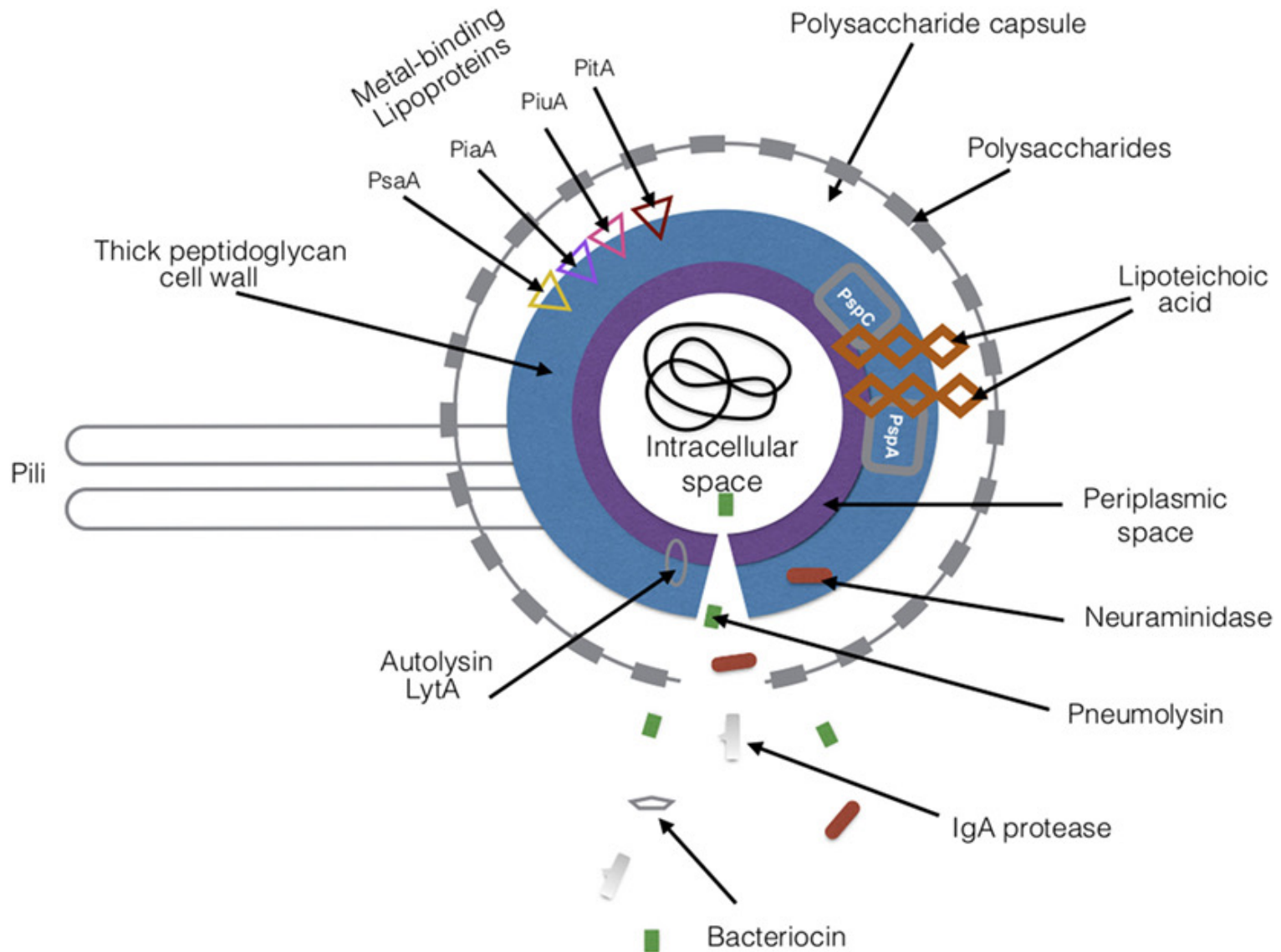
- ***Streptococcus pneumoniae***

- Diplococco Gram positivo
- Quasi tutti isolati clinici producono una capsula
- **93 sierotipi** classificati sulla base dei antigeni della capsula



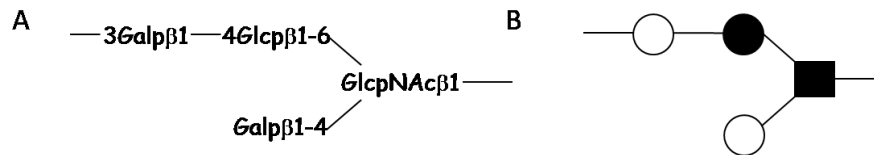






Pneumococco: la capsula

- Composta da ripetizioni di unità di zucchero
- Ogni unità può contenere fino a 8 residui di zucchero



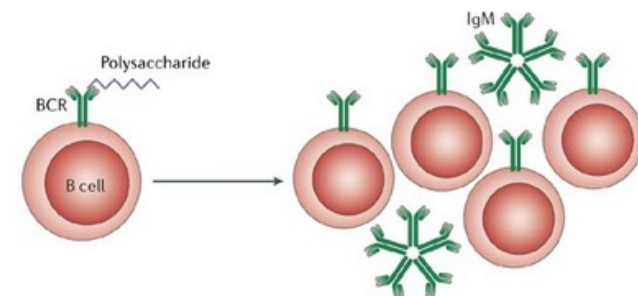
Unità tetrasaccaridica della capsula di
S. pneumoniae sierotipo 14



Nature Reviews | Genetics

- Il fattore di virulenza più importante
- Impedisce l'intrappolamento del batterio nel muco a livello delle vie respiratorie
- Inibisce l'opsonizzazione e la fagocitosi del batterio
- Anticorpi specifici contro la capsula sono essenziali per la protezione
- Immunità sierotipo specifico
- I saccaridi non attivano i linfociti T

Produzione di IgM
IgG bassi o inesistenti



Pneumococco: il vaccino (1)

- Vaccini polivalenti: polisaccaridi specifici a diversi sierotipi
- Polisaccaridi naturali: vengono purificati da colture batteriche
- Proteina « carrier » CRM₁₉₇
 - Mutante non tossico della tossina difterica.
 - Sostituzione di un solo amino acido (G52E)
 - Proteina ricombinante prodotta in *Pseudomonas fluorescens*

2002: Prevnar (Wyeth) **eptavalente** PCV-7
sierotipi 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F et 23F
→ sierotipi che erano i più frequenti nel bambino

Opzione emergente: uso di « neoglicoconiugati » : polisaccaridi sintetici

- *Evitare contaminazioni da agenti usati per la coltura batterica*
- *Conoscenza e controllo delle molecole introdotte nel vaccino*

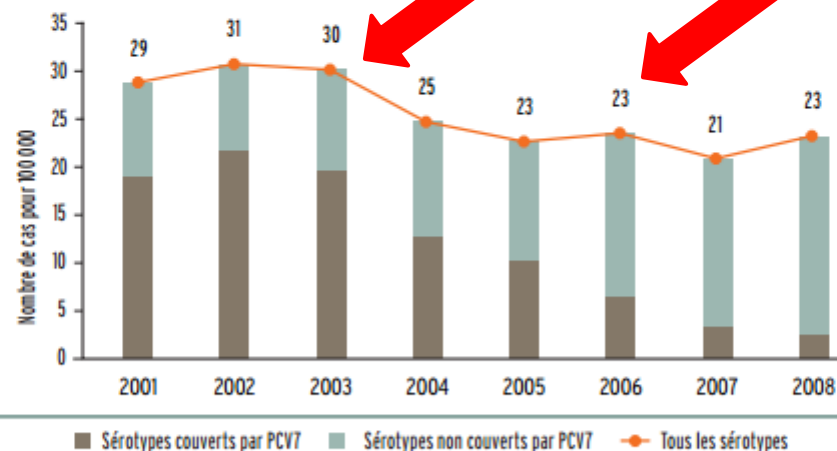
Pneumococco: il vaccino (2)

- 2003: raccomandato ai bambini a rischio di età <2 anni
- 2006: raccomandato a tutti bambini di età <2 anni
- Diminuzione del numero globale di infezioni invasive dovute a pneumococco fino al 2005
- Dal 2005 si è stabilizzato il numero di infezioni
- Cambio nella prevalenza dei sierotipi
- Importanza di seguire l'epidemiologia
- Importanza di includere altri sierotipi nel vaccino

2009: Synflorix (GSK)
decavalente PCV-10
1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C,
19F, and 23F

2010: Prevnar-13 (Pfizer- Wyeth)
tridecavalente PCV-13
1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14,
18C, 19A, 19F, and 23F

Incidence pour 100 000 enfants de moins de 2 ans des infections invasives à pneumocoque selon le sérotype vaccinal ou non vaccinal, France, 2001-2008



Source : réseau Epibac, CNRP, données non corrigées de la sous-notification

23-valente (PPSV23)



- Vaccino polisaccaridico
Composto dai polisaccaridi capsulari
- Protettivo nei confronti di 23 sierotipi responsabili del 90% dei casi di polmonite
- Utilizzabile solo per adulti e bambini di oltre 2 anni d'età → età inferiore non è efficace (risposta T-indipendente)
- Adulti immunocompetenti > 65 anni non vaccinati in precedenza, prima PCV13 e dopo 1 anno PPSV23.

7-valente (PCV7)



- Vaccino coniugato:
Polisaccaridi capsulari coniugato con tossina difterica, contiene alluminio fosfato
- Genera una risposta T-dipendente anche nei bambini < 2 anni
- Numero di dosi dipendono dall'età
- Di solito 1 richiamo dopo 5 anni nei >10

13-valente (PCV13)



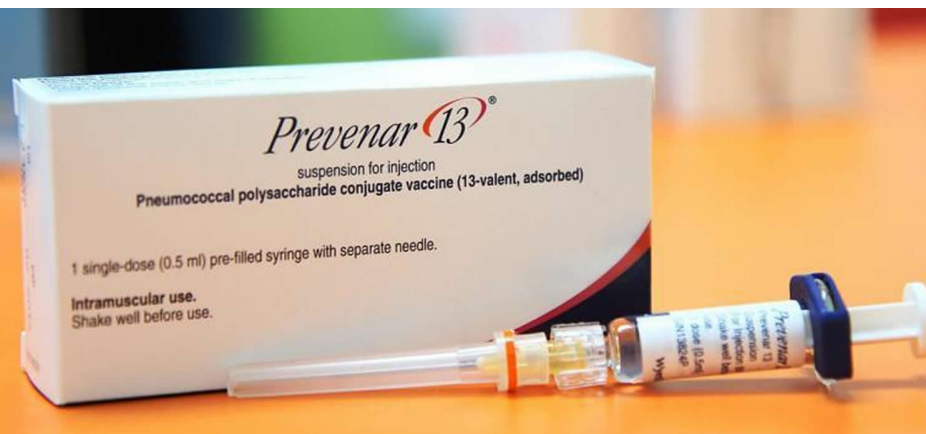
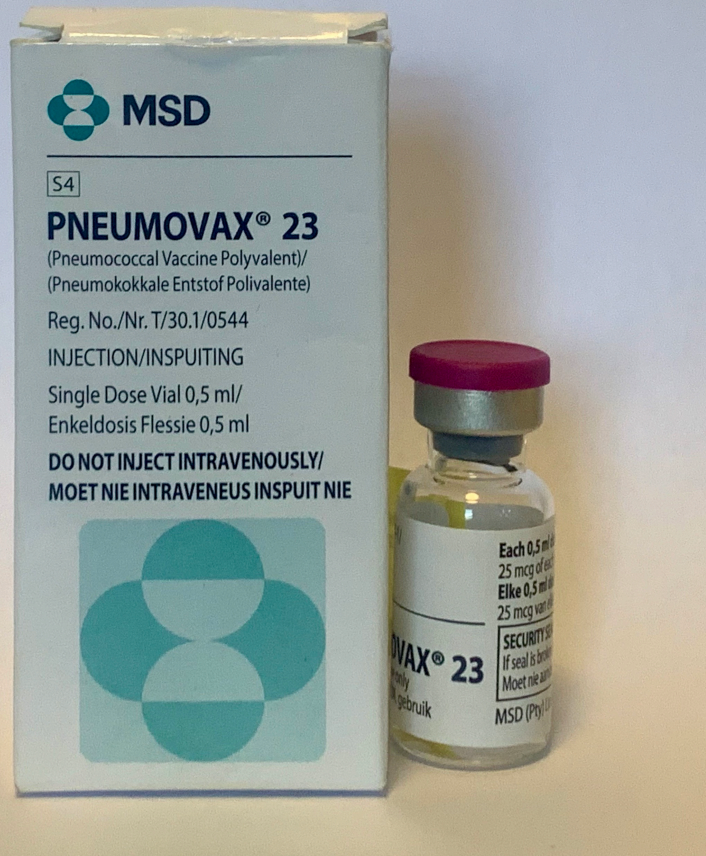
- Vaccino coniugato:
Polisaccaridi capsulari coniugato con tossina difterica, contiene alluminio fosfato
- Sostituisce il PCV7
- Protettivo contro 13 sierotipi in più tra cui il 6A
- Utilizzabile per bambini < 2 anni
- 3 dosi somministrate a intervalli diversi a seconda dell'età

Dal sito del Ministero della sanità.. 2019

•**Vaccinazione anti-pneumococco**

La vaccinazione anti-pneumococco può essere offerta simultaneamente alla vaccinazione anti-influenzale (che rappresenta in tale caso un'occasione opportuna), ma può anche essere somministrata indipendentemente e in qualsiasi stagione dell'anno, anche perché mentre l'anti-influenzale deve essere ripetuta ogni stagione, l'anti-pneumococco viene somministrata, secondo le attuali indicazioni, **una sola volta nella vita**. La vaccinazione anti-pneumococco prevede due dosi: una prima dose di vaccino coniugato e una seconda di vaccino polisaccaridico a distanza di almeno 2 mesi, stando attenti a non invertire l'ordine delle due vaccinazioni.

I vaccini contro pneumococco



Ricerca di nuovi antigeni

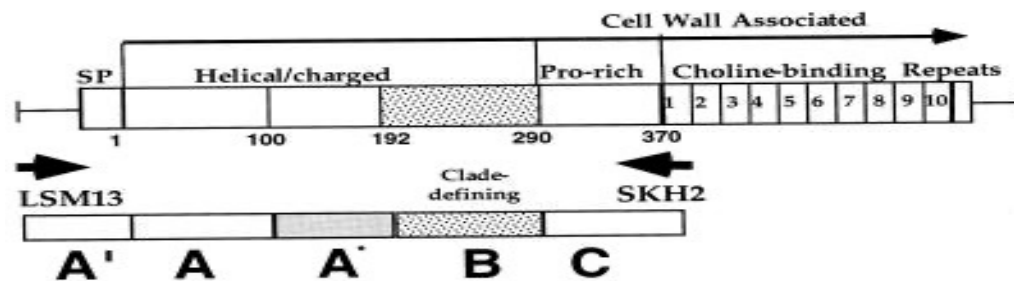
- Vastità dei sierotipi dei polisaccaridi capsulari
- Aumento dell'antibiotico resistenza

ricerca di potenziali proteine antigene:

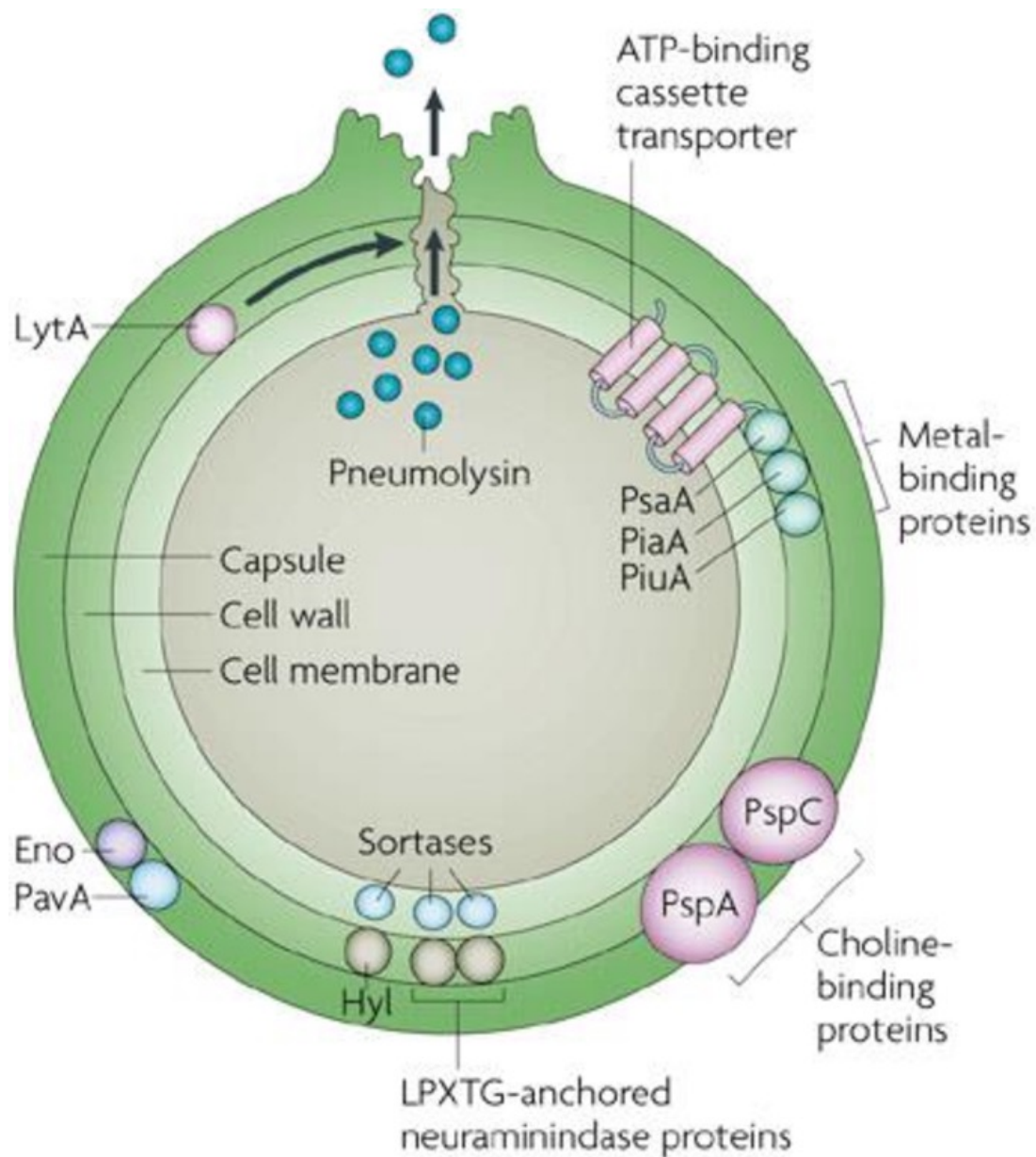
- Proteina di superficie pneumococco A (PspA)
 - Pneumolisina
 - Proteina del pilo

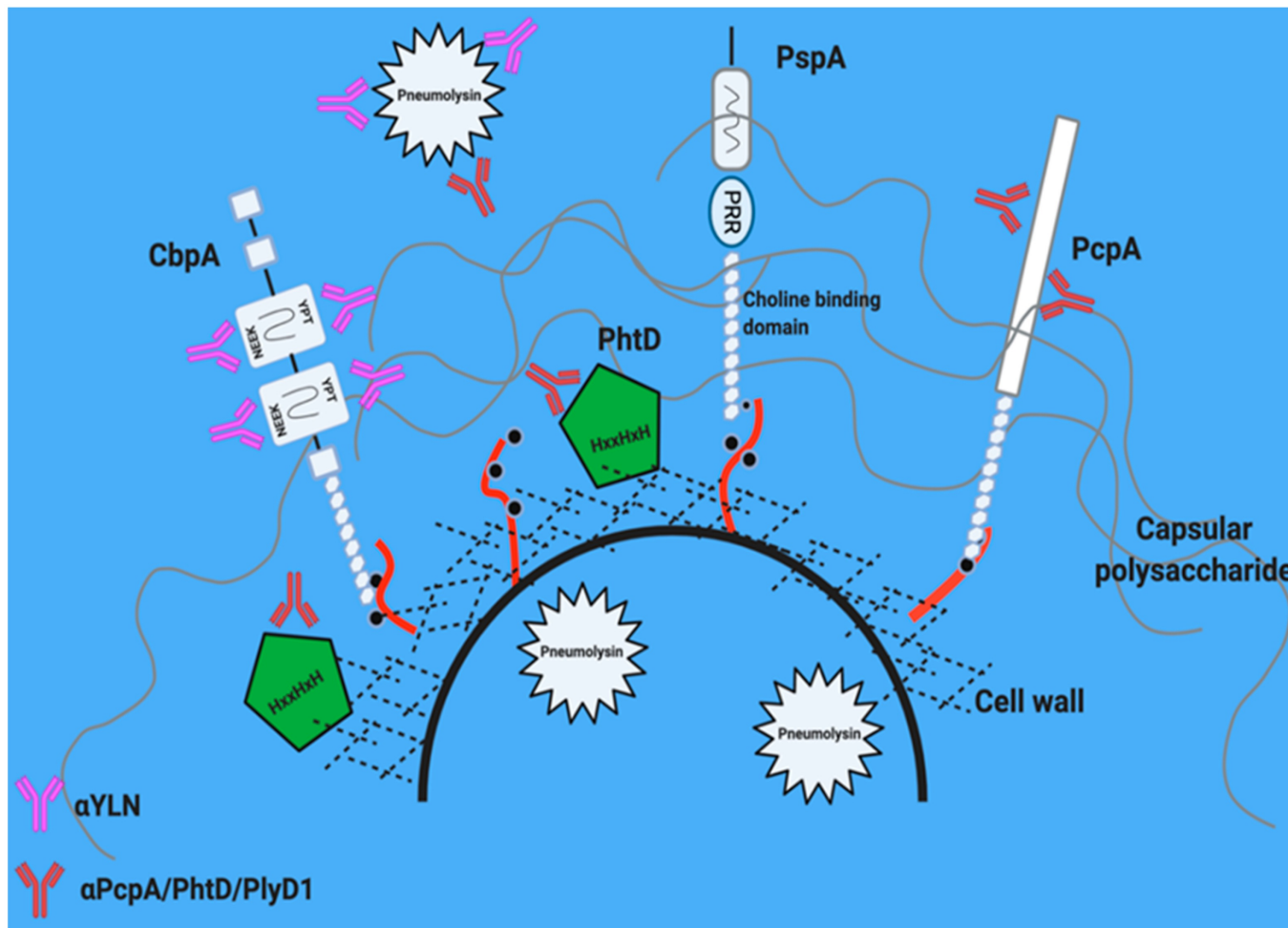
Pneumococcal surface protein A

- proteina di superficie legata non covalentemente all'acido teicoico e lipoteicoico della parete cellulare tramite i residui di colina
- ritrovata in tutti gli isolati batterici
- necessaria per la virulenza
- aiuta lo pneumococco a sfuggire alla fagocitosi inibendo:
 - la deposizione del complemento
 - l'uccisione del pneumococco dalle molecole di lactoferrina



Vaccino con la PspA attenuato sicuro in adulti sani





È stato dimostrato che gli anticorpi (a forma di Y rosa e rosso) che legano queste proteine sono protettivi nei modelli sperimentali di infezione. Su questa base sono stati formulati nuovi vaccini per studi clinici sull'uomo

Principali proteine candidate per i vaccini multivalenti. La **pneumolisina** (stella bianca), una tossina che forma pori, è localizzata all'interno del citoplasma, ma viene rilasciata durante la lisi cellulare.

La proteina di superficie A (**Pneumococcal surface protein A**, PspA), le proteine che legano la colina (**Choline binding protein A**, CbpA), (**Pneumococcal choline binding protein A**, PcpA) e (**Pneumococcal histidine triad D**, PhtD) sono tutte proteine di superficie che hanno domini conservati nei sierotipi e contribuiscono alla patogenesi del pneumococco.

Pneumolisina

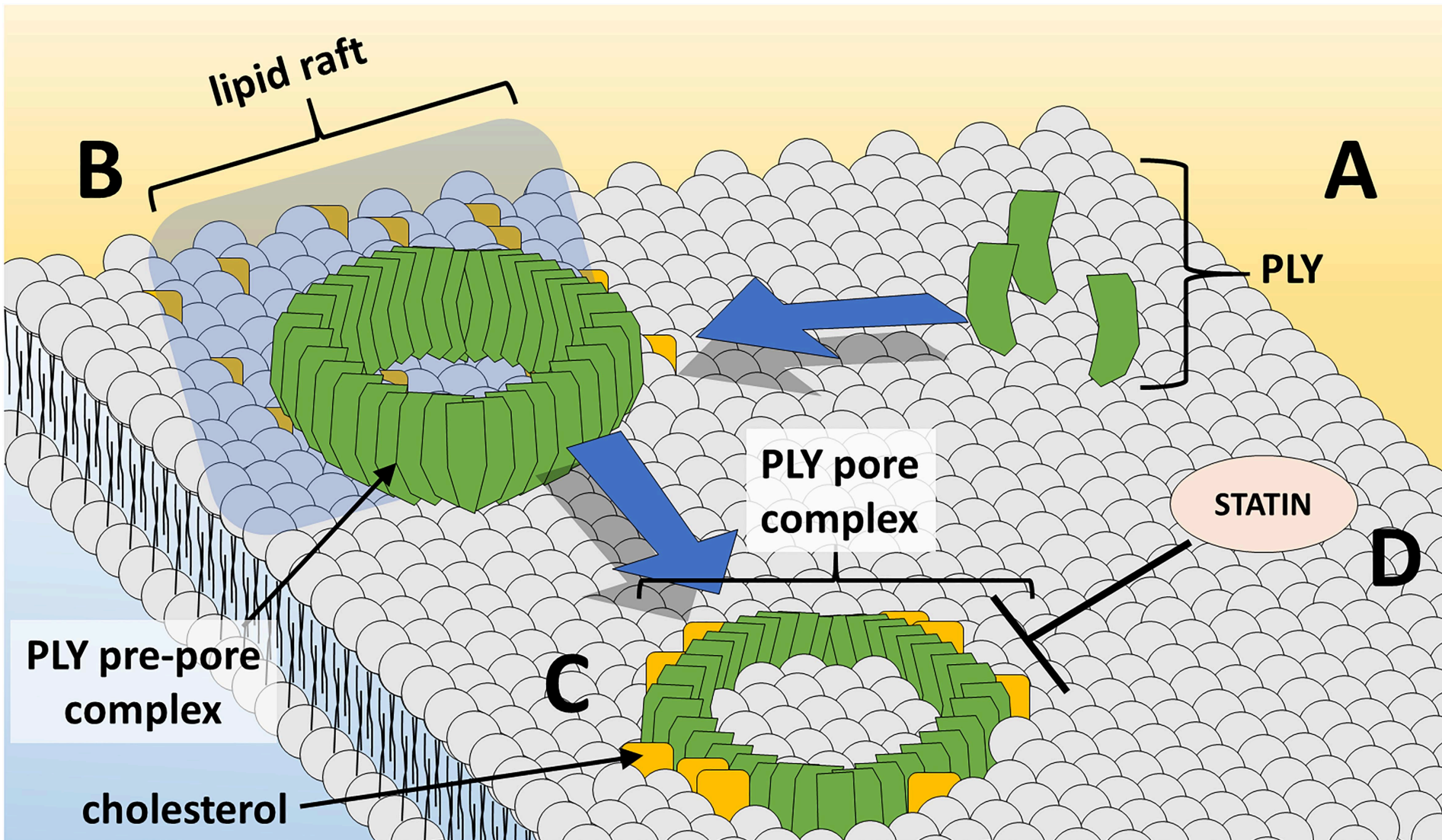
- È una tossina presente in tutti gli isolati batterici
- Interferisce con la funzione dei neutrofili nella risposta immunitaria
- Inibisce la produzione e la proliferazione delle cellule immunitarie, il battito ciliare delle cellule polmonari
- Per mutagenesi crea una variante meno tossica ma immunogenica
- Nel modello murino la vaccinazione con questo antigene risulta protettiva

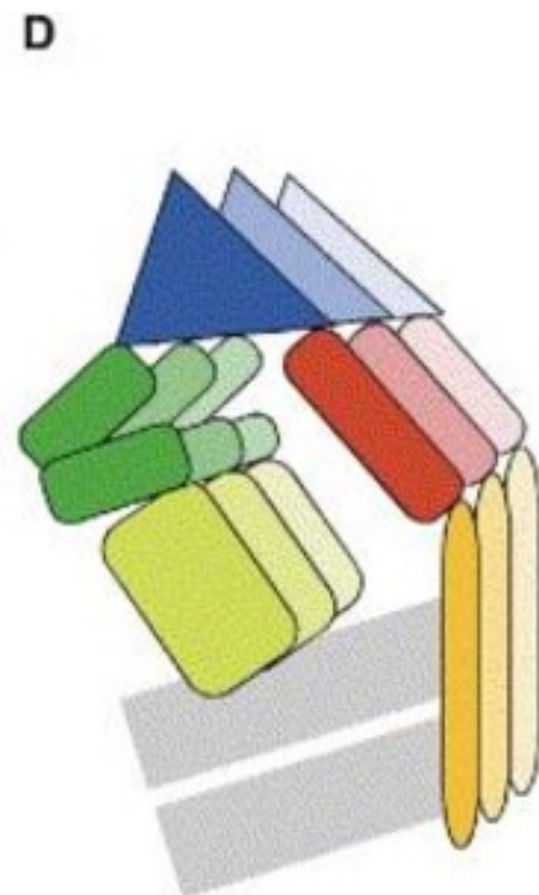
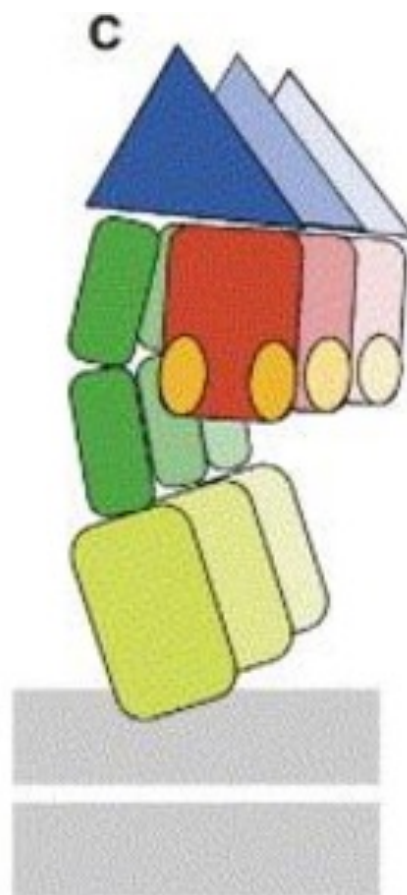
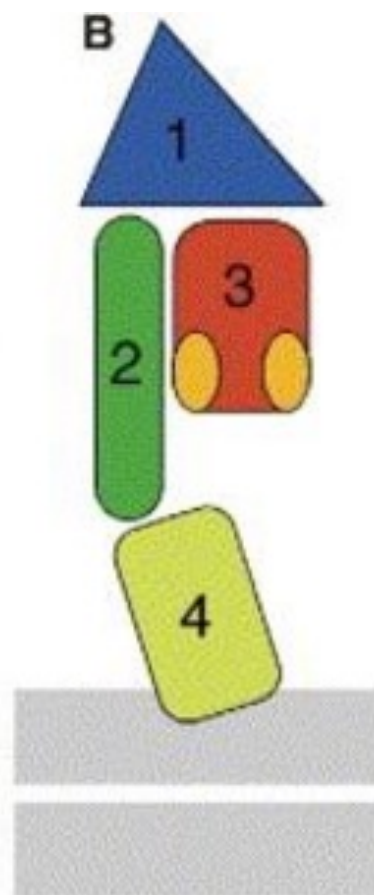
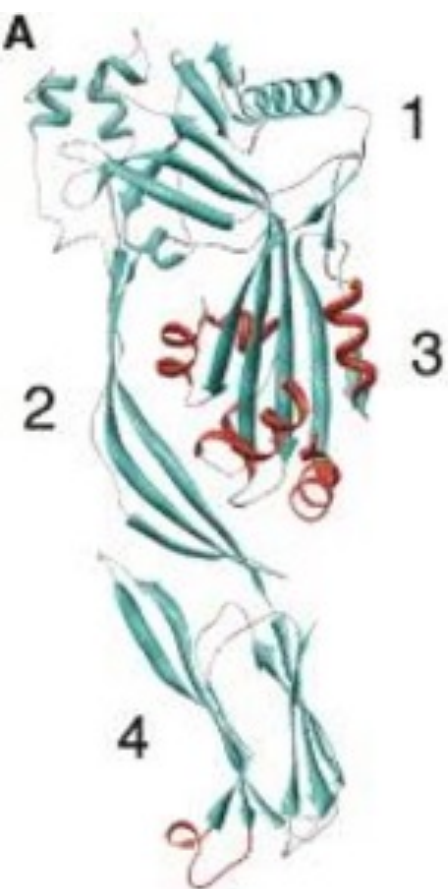
In Svizzera vaccino con pneumolisina inattivata in fase 1

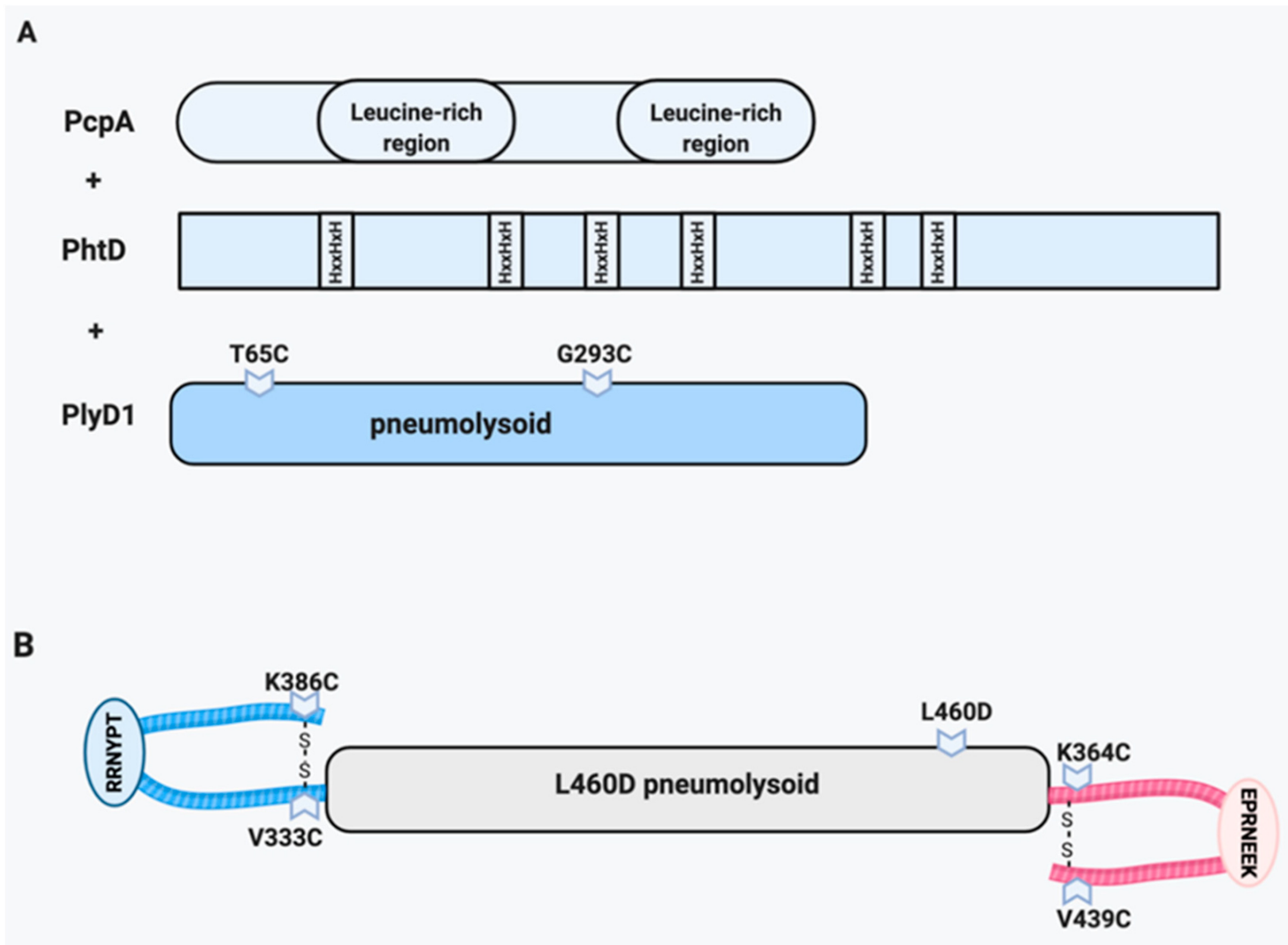
Possibili sviluppi futuri:

Vaccino proteico con diversi antigeni bersaglio

es: pneumolisina e PspA protettivo contro pneumococco







Vaccini proteici.

(A) Il vaccino multivalente PcpA, PhtD, PlyD1 costituito da PcpA ricombinante e PhtD insieme al tossoide della pneumolisina PlyD1.

(B) Costrutto ibrido YLN costituito dai domini conservati YPT e NEEK di CbpA fusi con N- e C-terminale, rispettivamente, del tossoide della pneumolisina L460D.

A

Vaccine components

CbpAR12:



L460D:

Pneumolysin toxoid

Combinations

YPT-L460D:



L460D-NEEK:



YLN:

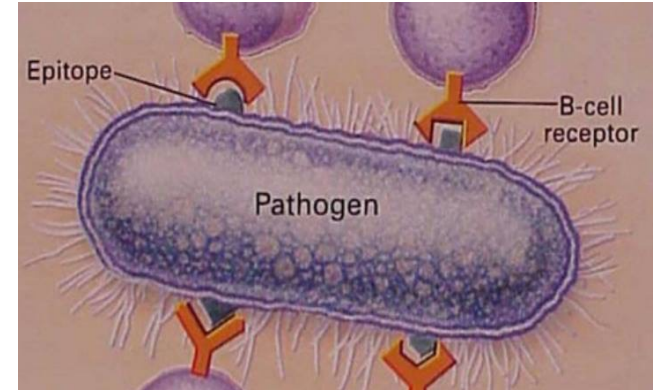


Proteina del pilo

- Fattore di virulenza
- Composto da tre subunità
- Incrementa adesione alle cellule epiteliali
- Ritrovata nella metà degli isolati batterici
- Proteina ricombinante con le tre subunità in topo è protettiva contro gli isolati pneumococcali contenenti il pilo
- Alta protezione sia con bassi che alti livelli di espressione del pilo

Analisi proteomica

- Identificazioni di due potenziali antigeni



PcsB proteina richiesta per la separazione dalla parete cellulare

StkP proteina serina-treonina chinasi

- Vaccino trivalente unito alla PspA protettivo nei modelli animali

Table 1 Glycoconjugate vaccines licensed by FDA^a

Pathogen	Commercial trade name/manufacturer	Carrier protein	Saccharide chain length	Conjugation chemistry
<i>Haemophilus influenzae</i> type B	ActHIB/Sanofi Pasteur (monovalent) (Multivalent formulations also containing Hib conjugate: pentacel, DTaP and inactivated poliovirus; Hexacima/Hexyon, DtaP, hepatitis B rDNA and inactivated poliomyelitis)	TT	Native polysaccharide	Information not available
	Hiberix/GSK vaccines	TT	Size-reduced polysaccharide	Information not available
	Quinvaxem/GSK vaccines (multivalent formulation containing DTP, HepB and Hib conjugate)	CRM ₁₉₇	Depolymerized polysaccharide	Active ester chemistry
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup C	PedvaxHIB/Merck	OMPC	Native polysaccharide	Information not available
	NeisVac-C/Pfizer	TT	Native polysaccharide	Reductive amination
	Meningitec/Nuron Biotech	CRM ₁₉₇		Reductive amination
	Menjugate/GSK vaccines	CRM ₁₉₇	Depolymerized polysaccharide	Active ester chemistry
	Menitorix/GSK vaccines (with Hib)	TT	Size-reduced polysaccharide	Information not available
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup CY	MenHibrix/GSK vaccines (with Hib)	TT		Information not available
<i>Neisseria meningitidis</i> serogroup ACWY	Menactra/Sanofi Pasteur	DT	Depolymerized polysaccharide	Information not available
	Menveo/GSK	CRM ₁₉₇	Depolymerized polysaccharide	Active ester chemistry
	Nimenrix/Pfizer	TT	Size-reduced polysaccharide	Active ester chemistry
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serogroup 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Prennar/Pfizer	CRM ₁₉₇	Native polysaccharide	Reductive amination
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serogroup 1, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F	Synflorix/GSK	NTHi PD, DT, TT	Size-reduced polysaccharide	Reductive amination
<i>Streptococcus pneumoniae</i> serogroup 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F, 23F	Prennar13/Pfizer	CRM ₁₉₇	Native polysaccharide	Information not available

^a <https://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/Vaccines/ApprovedProducts/ucm093833.htm> and EMA http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/epar_search.jsp&mid=WC0b01ac058001d124 up to 31 May 2018.