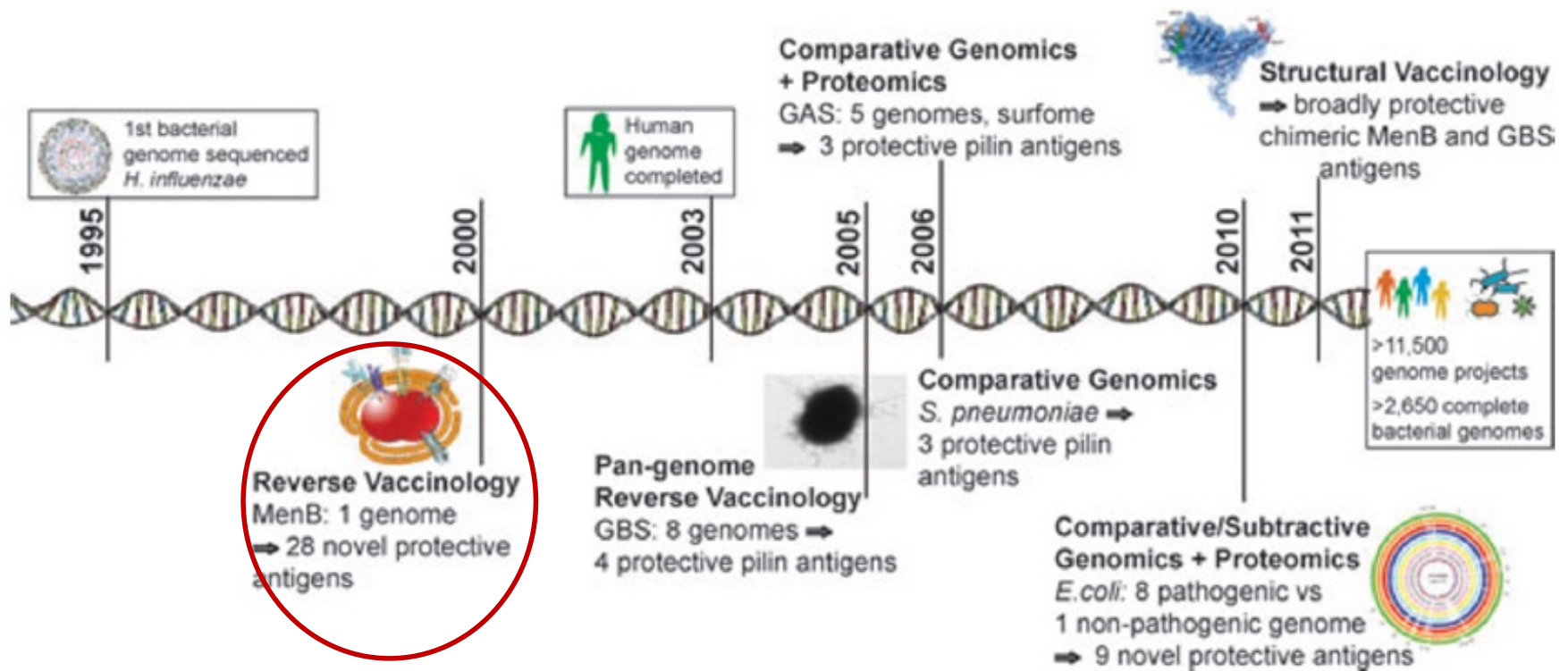


MCV 2023



La reverse vaccinology

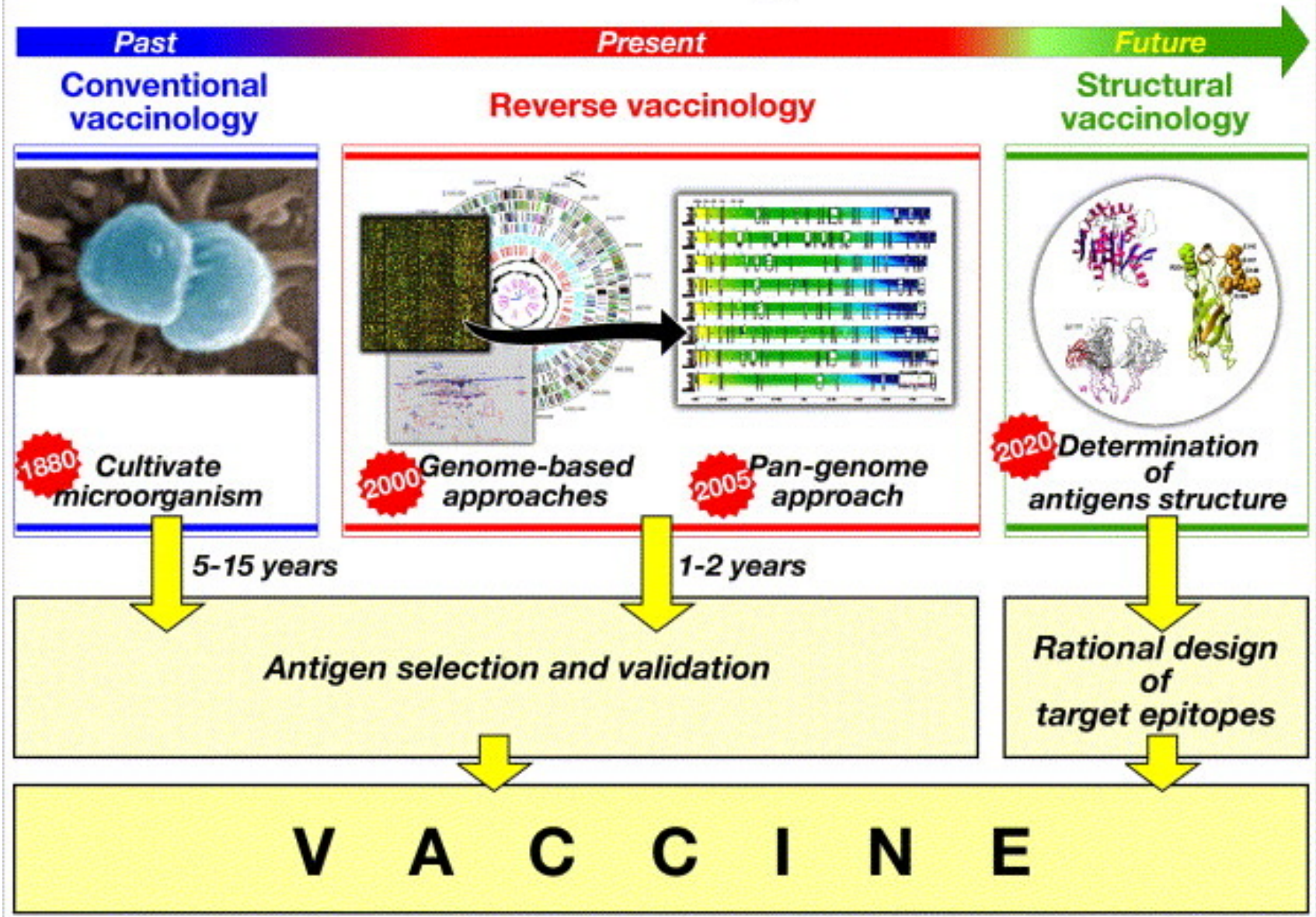




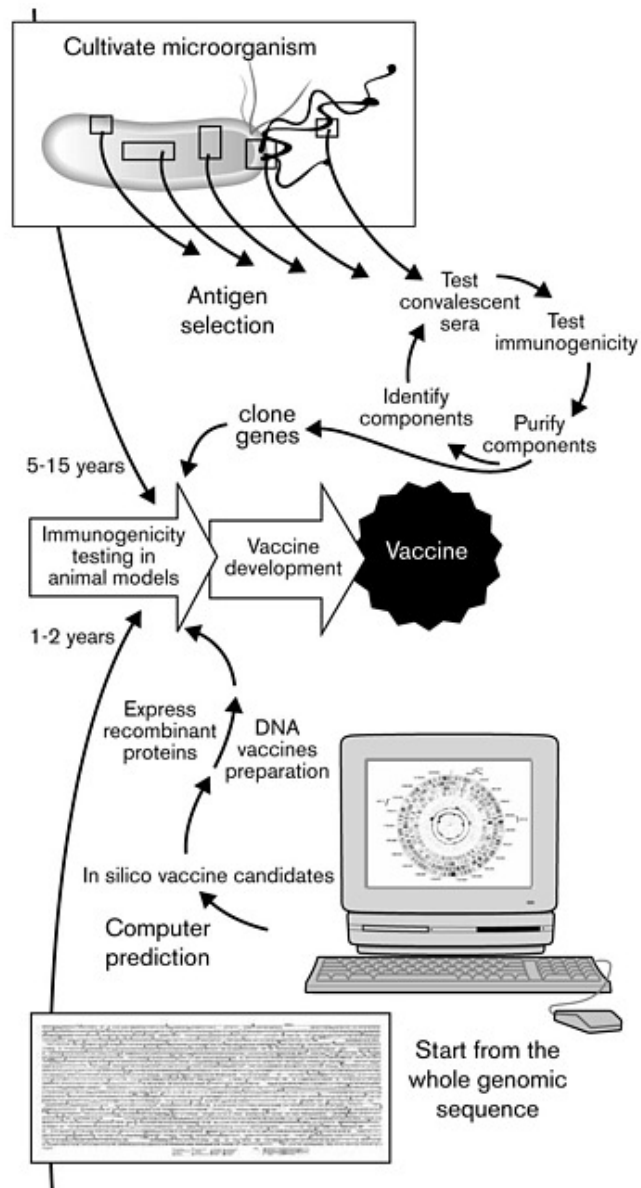
All subunit bacterial vaccines eliciting protective antibodies are based on secreted and/or surface-associated proteins

Vaccine	Stage	Antigen	Location		
			Secreted	Surface	cytoplasm
Hib	Market	Polysaccharide		★	
Men A, C, W, Y	Market	Polysaccharide		★	
<i>S. pneumoniae</i>	Market	Polysaccharide		★	
<i>B. pertussis</i>	Market	PT	★		
		FHA		★	
		Pertactin		★	
<i>V. cholerae</i>	Market	CT	★		
<i>C. tetani</i>	Market	TT	★		
<i>C. diphtheriae</i>	Market	DT	★		
<i>N. meningitidis</i>	Phase III	GNA2132		★	
		GNA1030		★	
		GNA2091		★	
		GNA1870		★	
		NadA		★	
<i>S. pyogenes</i>	Phase II	M protein		★	
<i>S. aureus</i>	Phase II	IsdB		★	
<i>S. agalactiae</i>	Phase I	Polysaccharide		★	
<i>C. difficile</i>	Phase I	TcdA-B	★		

Vaccinology



Conventional vaccine development



Reverse vaccinology

Lo sviluppo dei vaccini nell'era post-genomica: La Reverse Vaccinology

Reverse vaccinology

- IDENTIFICAZIONE SISTEMATICA DI TUTTI I POTENZIALI ANTIGENI DEL PATOGENO IN ESAME SULLA BASE DELLA SEQUENZA E DI PROGRAMMI DI BIOINFORMATICA
- APPLICAZIONI DELLE REVERSE VACCINOLOGY:

Neisseria meningitidis group B

Streptococcus pneumoniae

Porphyromonas gingivalis

Staphylococcus aureus

Chlamydia pneumoniae

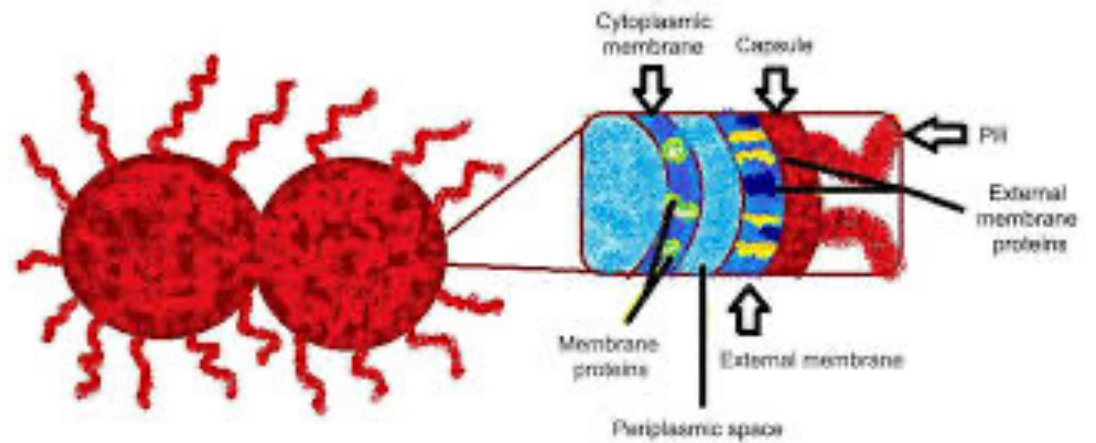
Bacillus anthracis

Escherichia coli

Neisseria meningitidis

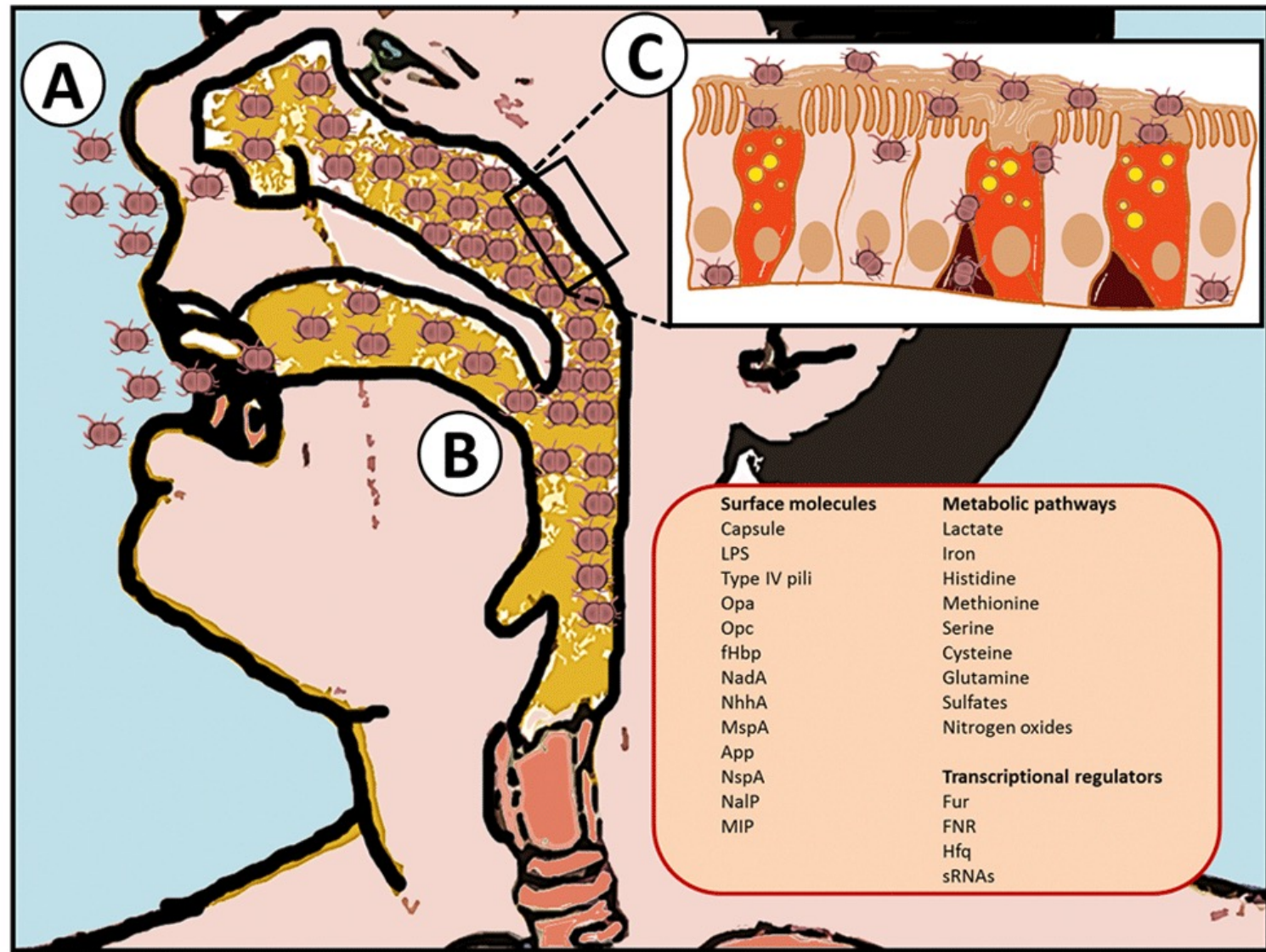


Structure of *Neisseria meningitidis*



Microb Perspect 10:1016(j.micr.p.2021.11.004)

Figure 1. From colonization to dissemination: graphical representation of *Neisseria meningitidis* pathogenesis.



(A) *N.m* si diffonde attraverso lo scambio di secrezioni respiratorie e della gola durante stretti contatti tra individui.

(B) Quindi accede al rinofaringe, dove aderisce alle mucose dell'epitelio mucociliare e risiede come microrganismo commensale fino a quando le condizioni ambientali non sono adatte alla disseminazione.

(C) L'attraversamento della barriera epiteliale della mucosa avviene per vie intra o intercellulari consentendo l'ingresso nel flusso sanguigno, dove prolifera rapidamente. Questo evento provoca sepsi e infine (dopo la traslocazione di un'ulteriore barriera fisiologica come la barriera emato-encefalica) meningite. Il pannello in basso a destra è un elenco di fattori/percorsi definiti da studi di genomica funzionale per essere determinanti durante le varie fasi della patogenesi di *N. meningitidis* come la colonizzazione del rinofaringe e la sopravvivenza nel sangue.



```
graph TD; A[Sequenza genomica] --> B[Programmi specializzati]; B --> C[Localizzazione delle ORFs]; C --> D[Predizione delle proteine associate alle superfici]; D --> E[Clonaggio delle sequenze relative per PCR]; E --> F[Espressione delle proteine]; F --> G[Purificazione delle proteine]; G --> H[Immunizzazioni dei topi]; H --> I[Analisi dei parametri associati alle immunizzazioni: western blot e citofluorimetria]; I --> J[Analisi in vitro ed in vivo dei candidati prescelti]; J --> K[Identificazione degli antigeni]; K --> L[Sviluppo del vaccino];
```

Sequenza genomica

Programmi specializzati

Localizzazione delle ORFs

Predizione delle proteine associate alle superfici

Clonaggio delle sequenze relative per PCR

Espressione delle proteine

Purificazione delle proteine

Immunizzazioni dei topi

Analisi dei parametri associati alle immunizzazioni: western blot e citofluorimetria

Analisi in vitro ed in vivo dei candidati prescelti

Identificazione degli antigeni

Sviluppo del vaccino

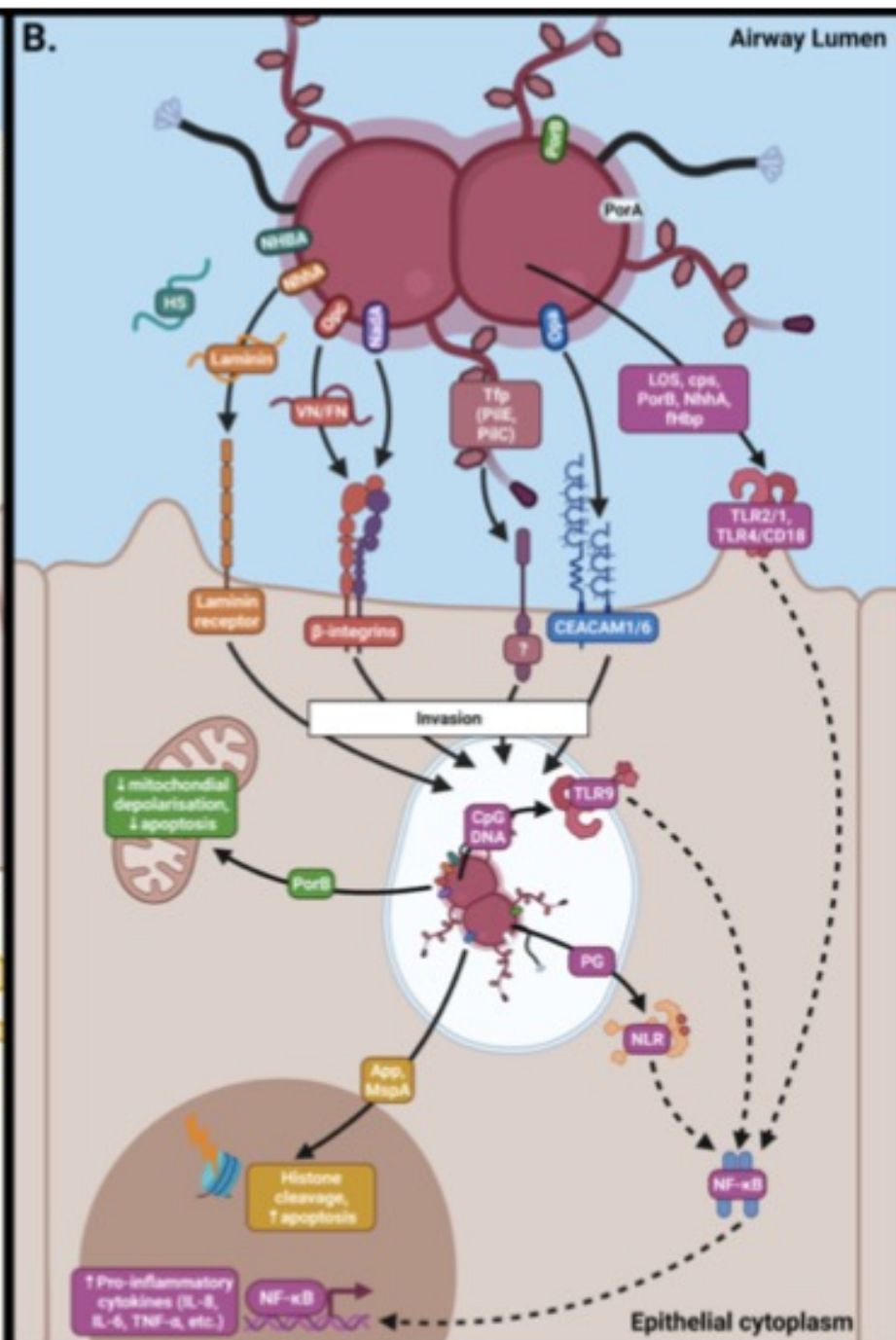
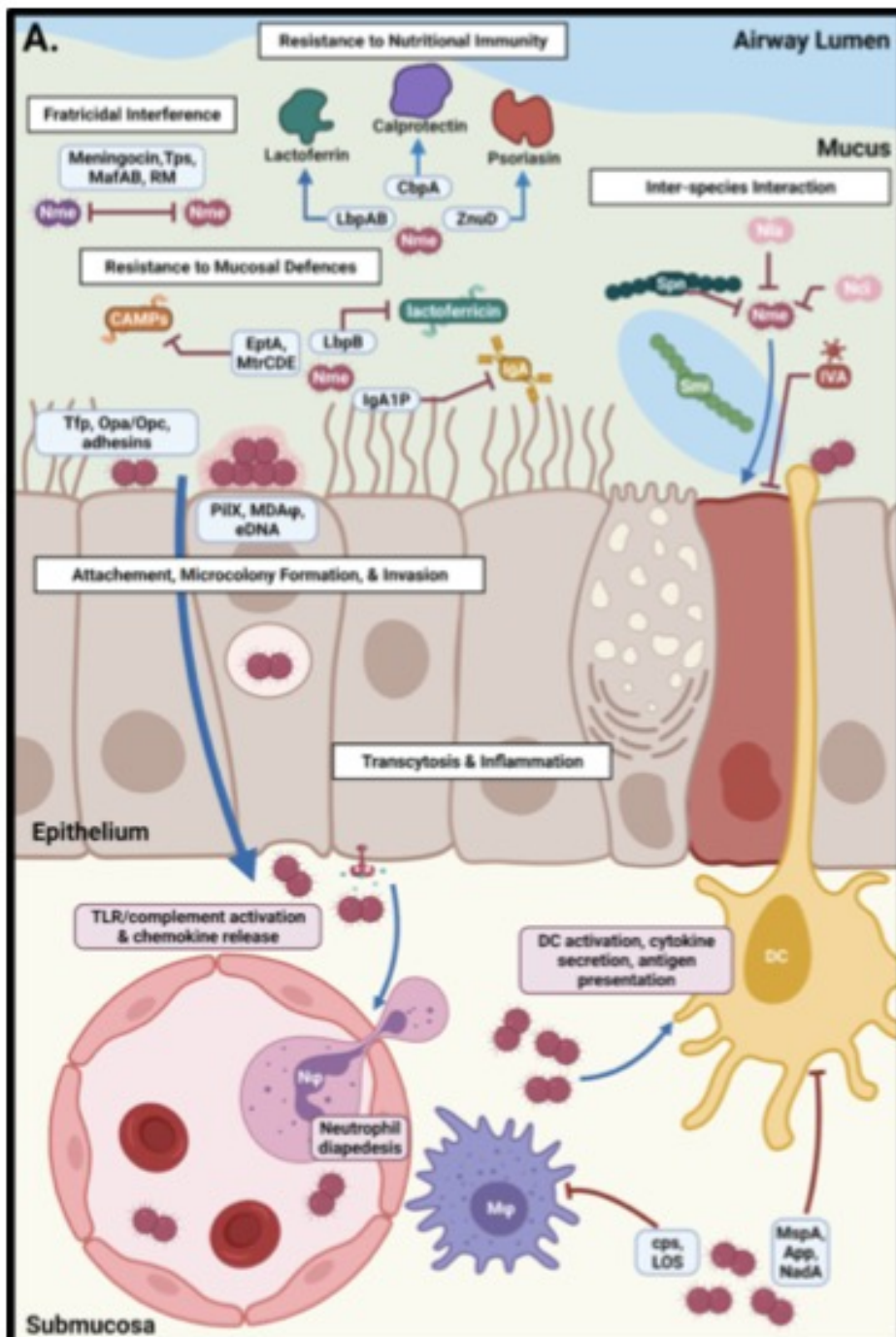
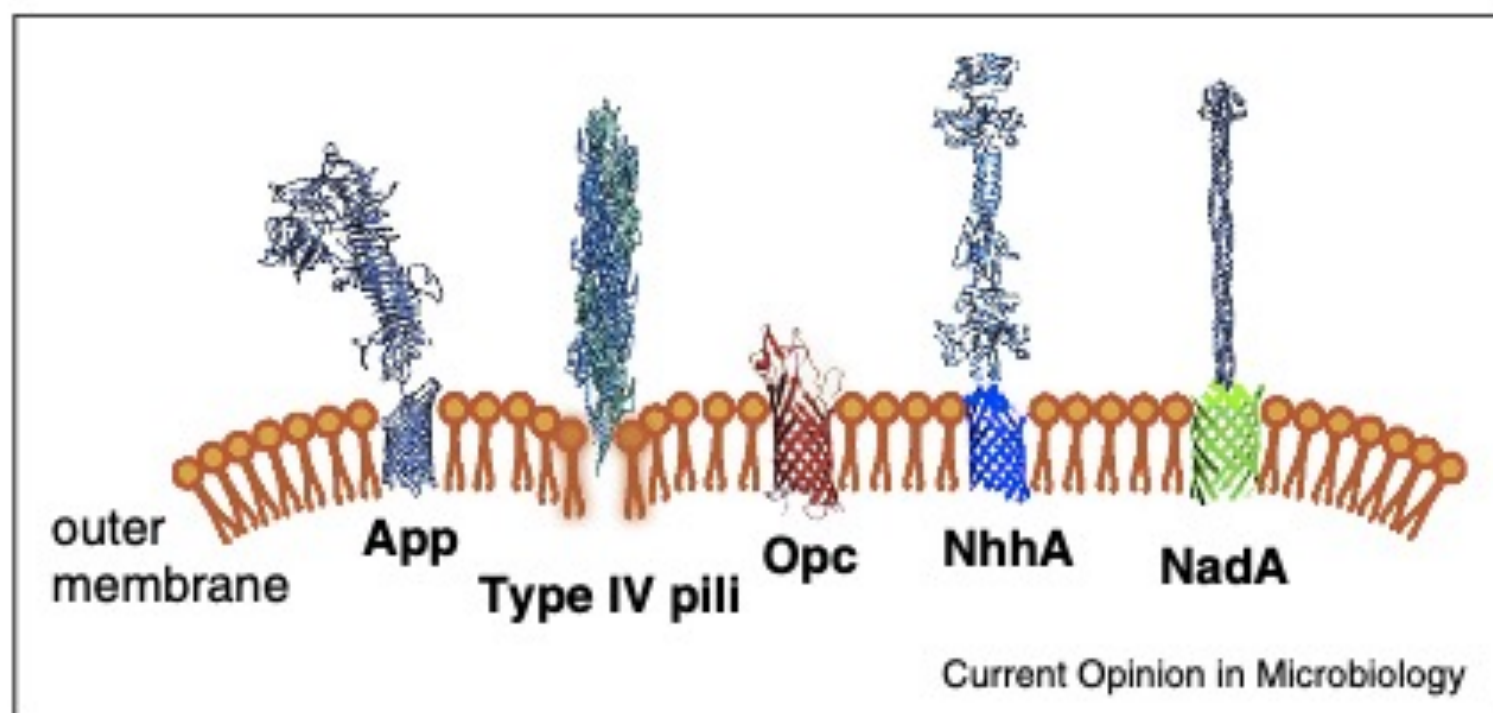
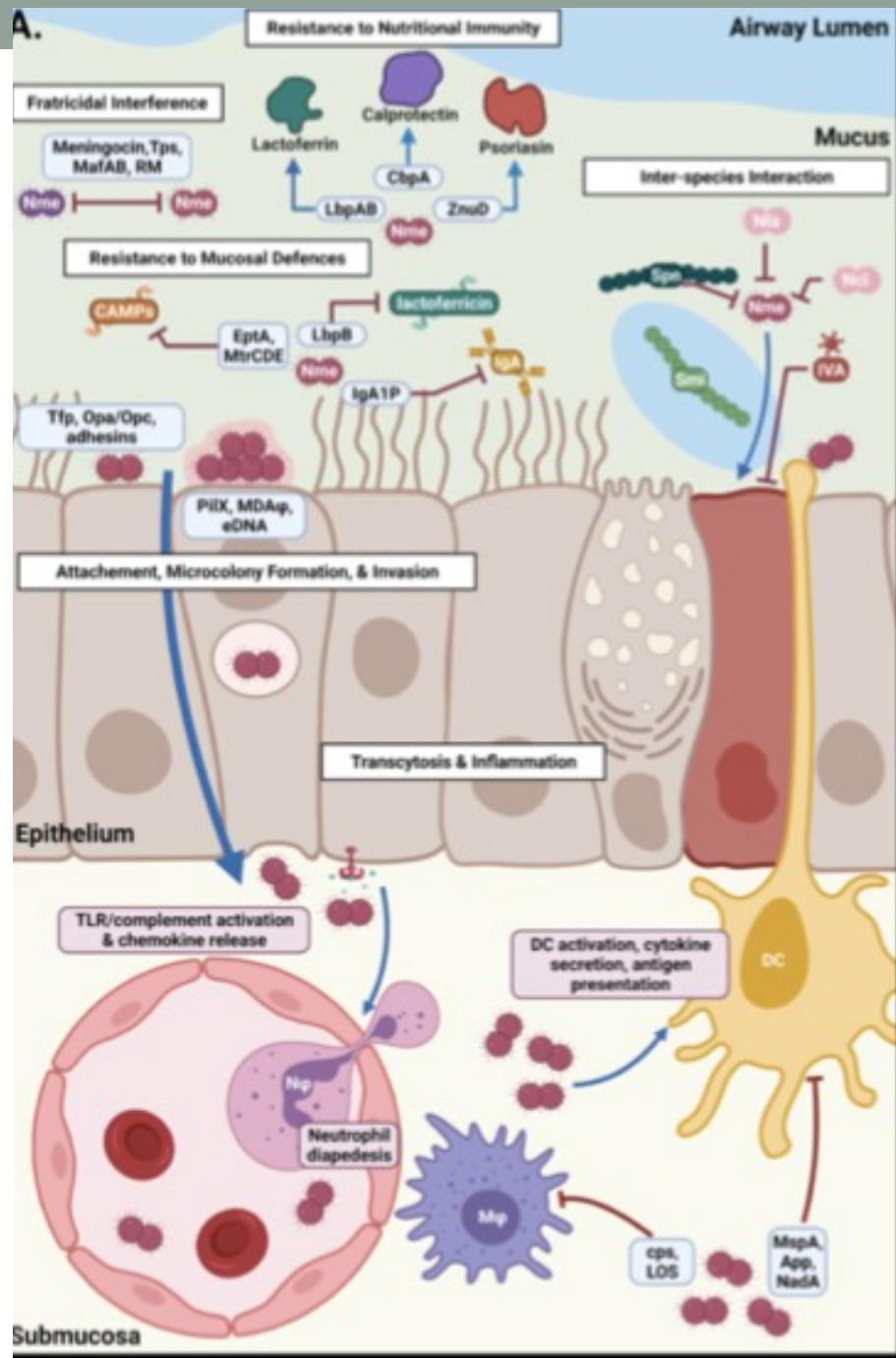


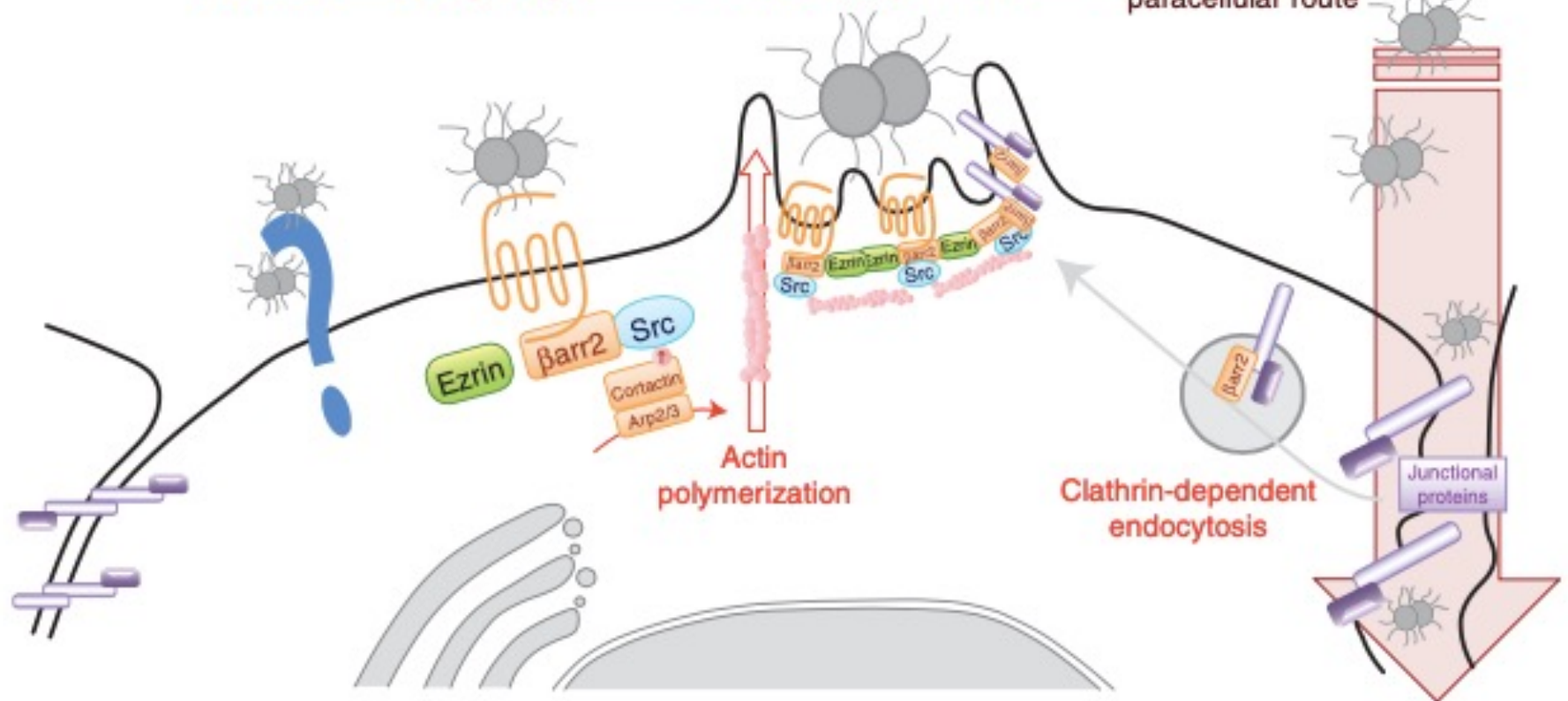
Figure 1



Schematic illustration of *Neisseria meningitidis* outer membrane proteins involved in colonization. App (adhesion and penetration protein); Type IV pili; Opc (opacity protein C); NhhA (*Neisseria* hia/hsf homologue); NadA (*Neisseria* adhesin A).

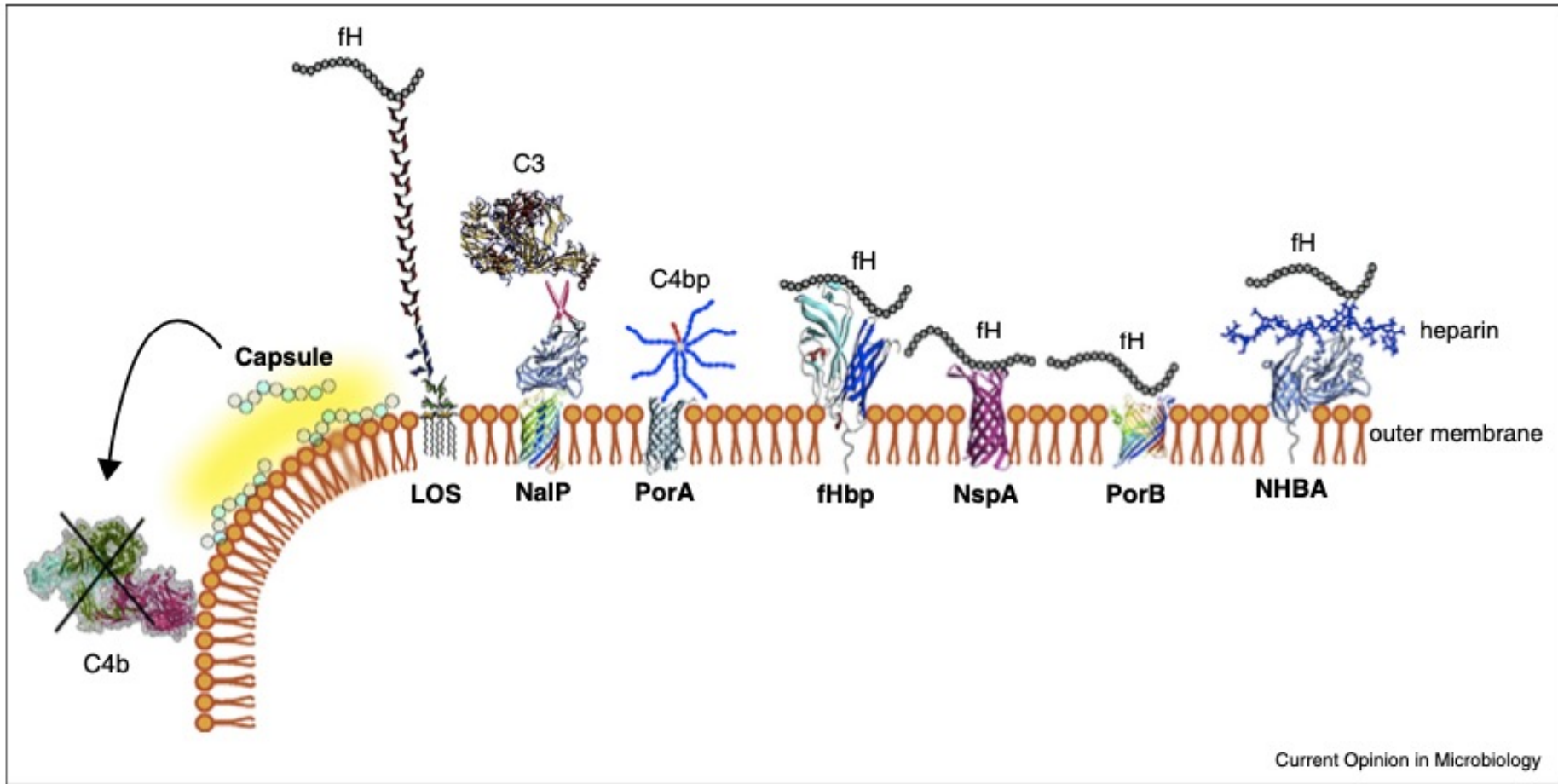


Adhesion → Signaling → Protein sequestration → Opening of the paracellular route



Interazione di *N. meningitidis* con cellule endoteliali.

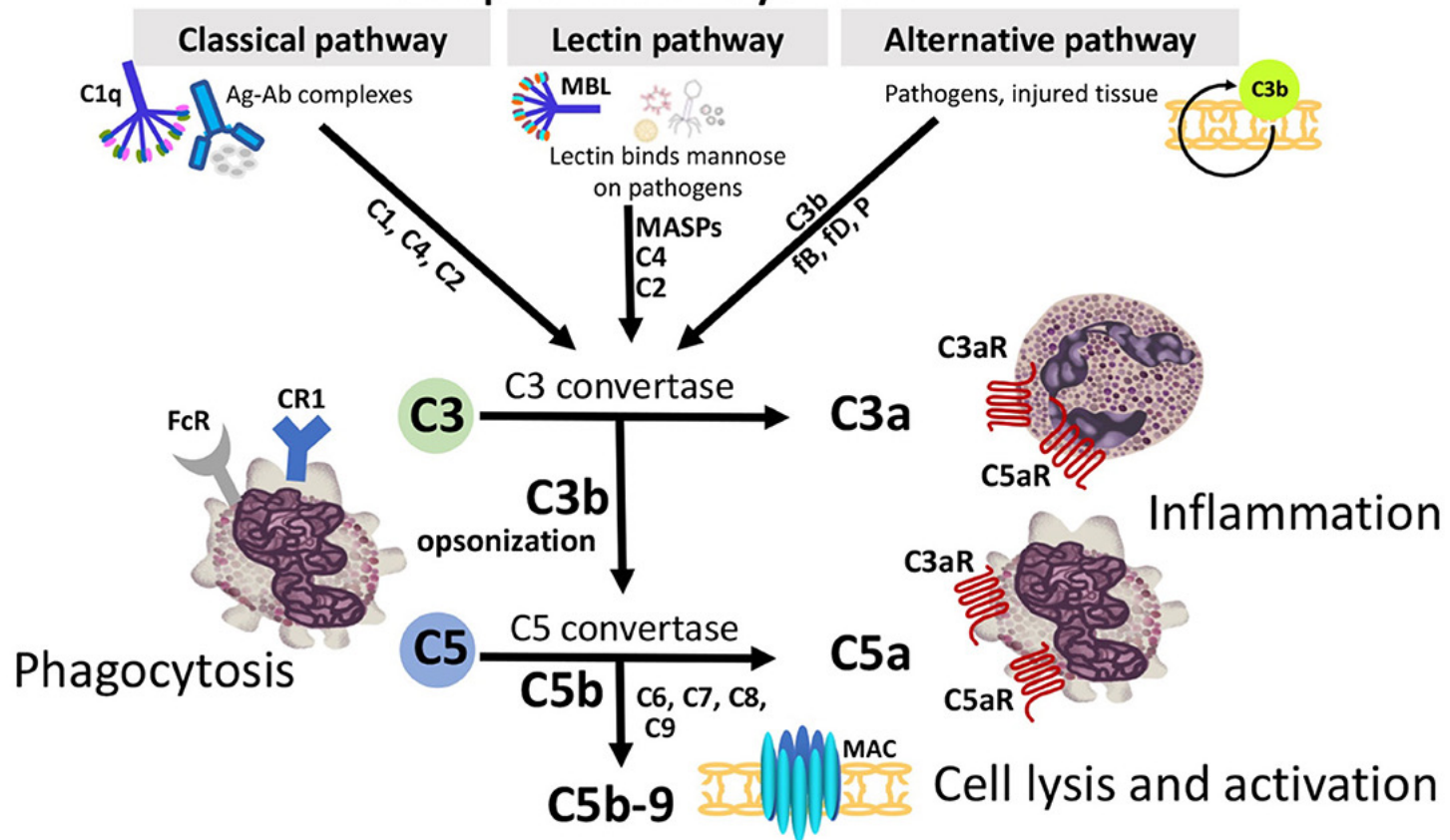
N. meningitidis aderisce alle cellule endoteliali microvascolari cerebrali attraverso un'interazione tra pili di tipo IV e un recettore di adesione sconosciuto. Dopo l'iniziale adesione batterica, i pili di tipo IV mediano il reclutamento e l'attivazione del β_2 -adrenocettore portando così all'organizzazione di uno specifico complesso molecolare citoplasmatico, denominato placche corticali. La formazione di placche corticali risulta (1) dall'accumulo locale di ezrina e delle proteine leganti l'ezrina, e (2) dall'accumulo di β -arrestins e molecole leganti β -arrestin come Src, che inducono la polimerizzazione attiva dell'actina, e quella delle proteine giunzionali p120-catenina e VE-caderina. Di conseguenza, ciò favorisce l'apertura delle giunzioni cellula-cellula e consente la tras migrazione dei batteri attraverso l'endotelio.



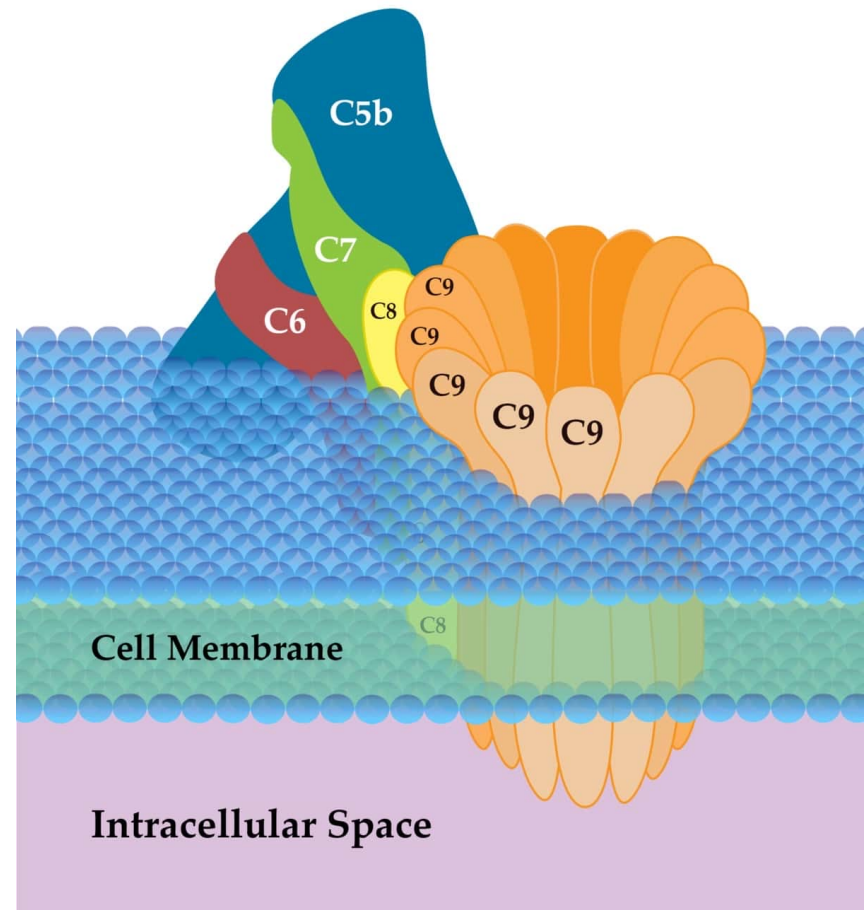
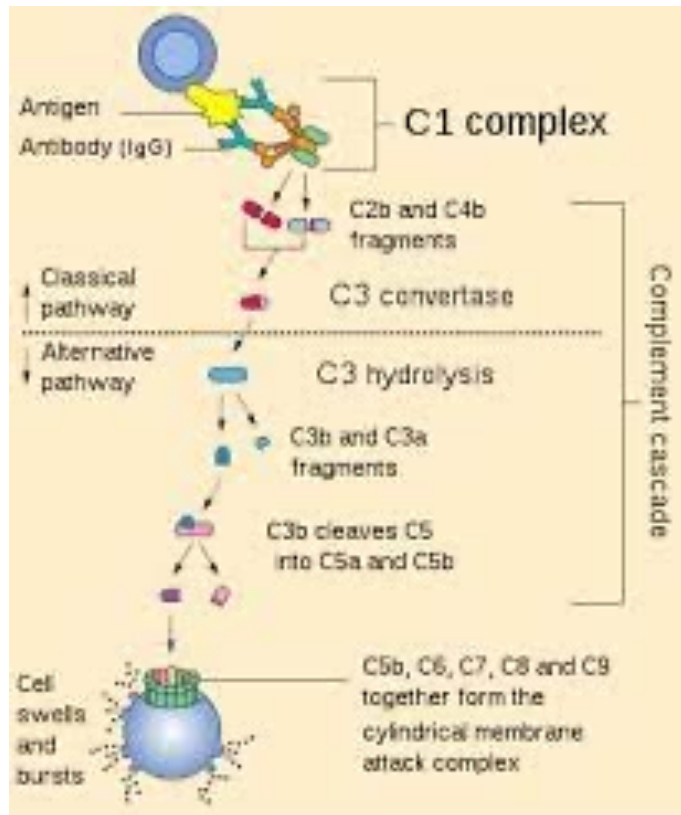
Schematic illustration of *Neisseria meningitidis* outer membrane proteins interacting with complement components. Capsule (capsular polysaccharide); LOS (lipooligosaccharide); NalP (*Neisseria* autotransporter serine protease); porA (porin A); fhbp (factor H binding protein); NspA (*Neisseria* surface protein A); porB2 (Porin B); NHBA (*Neisserial* heparin binding antigen).

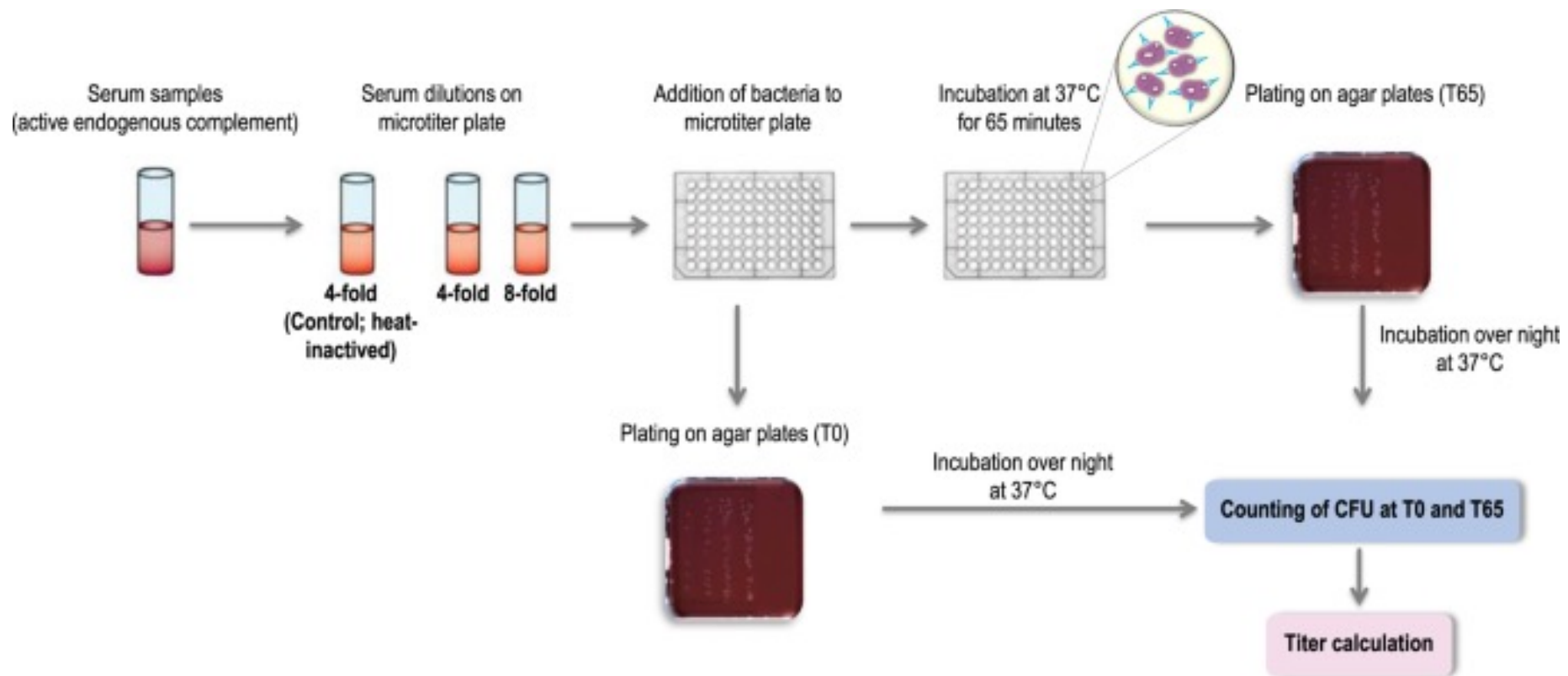
I tre pathways della cascata del complemento, quello classico, l'alternativo e quello della lectina, coinvolgono, la scissione del C3, il componente centrale della cascata del complemento, che a sua volta induce la formazione del complesso di attacco alla membrana (MAC) e formando un poro nella membrana della cellula batterica e inducendone la morte cellulare

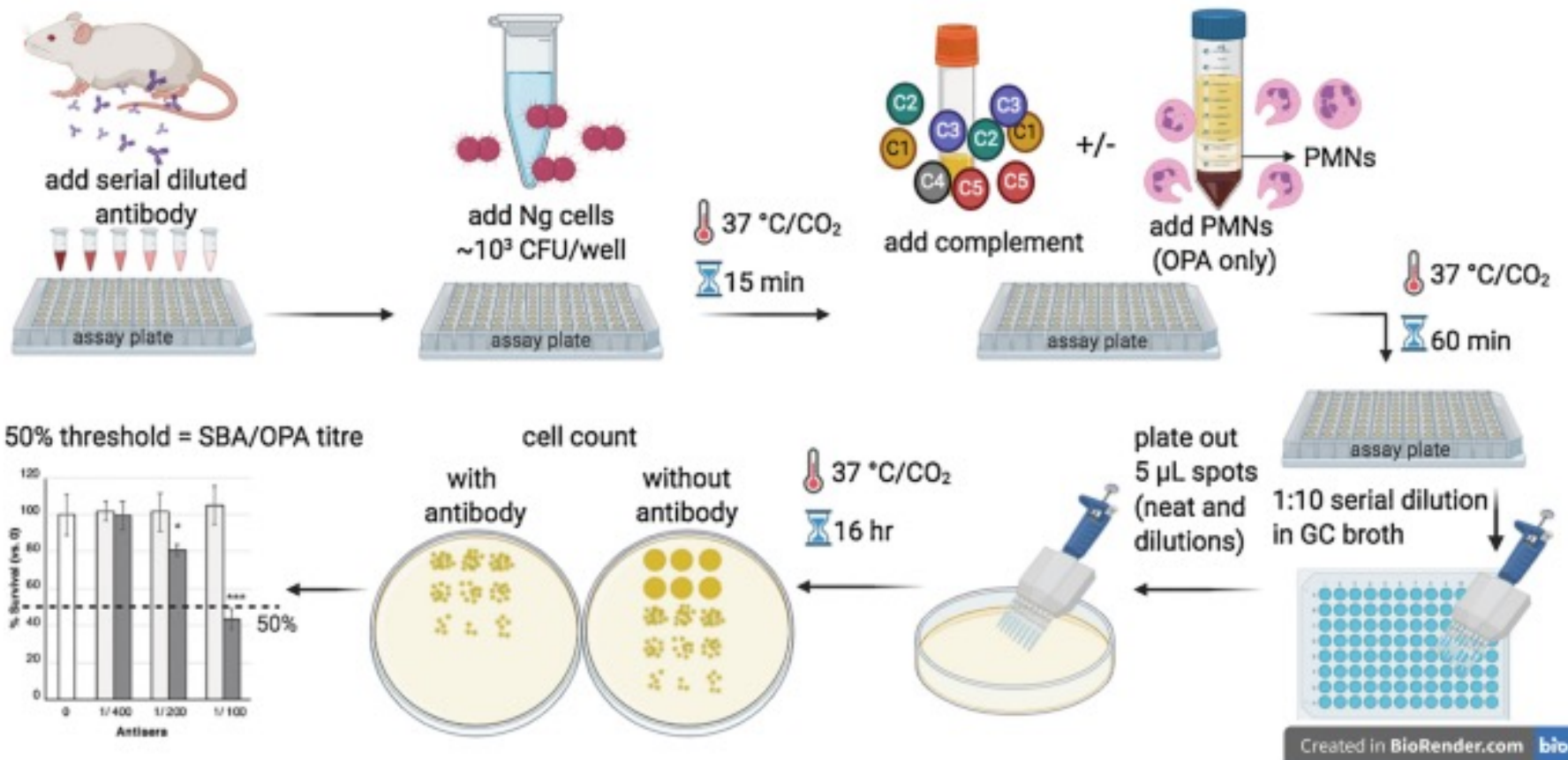
Complement system



Il Sistema del complemento

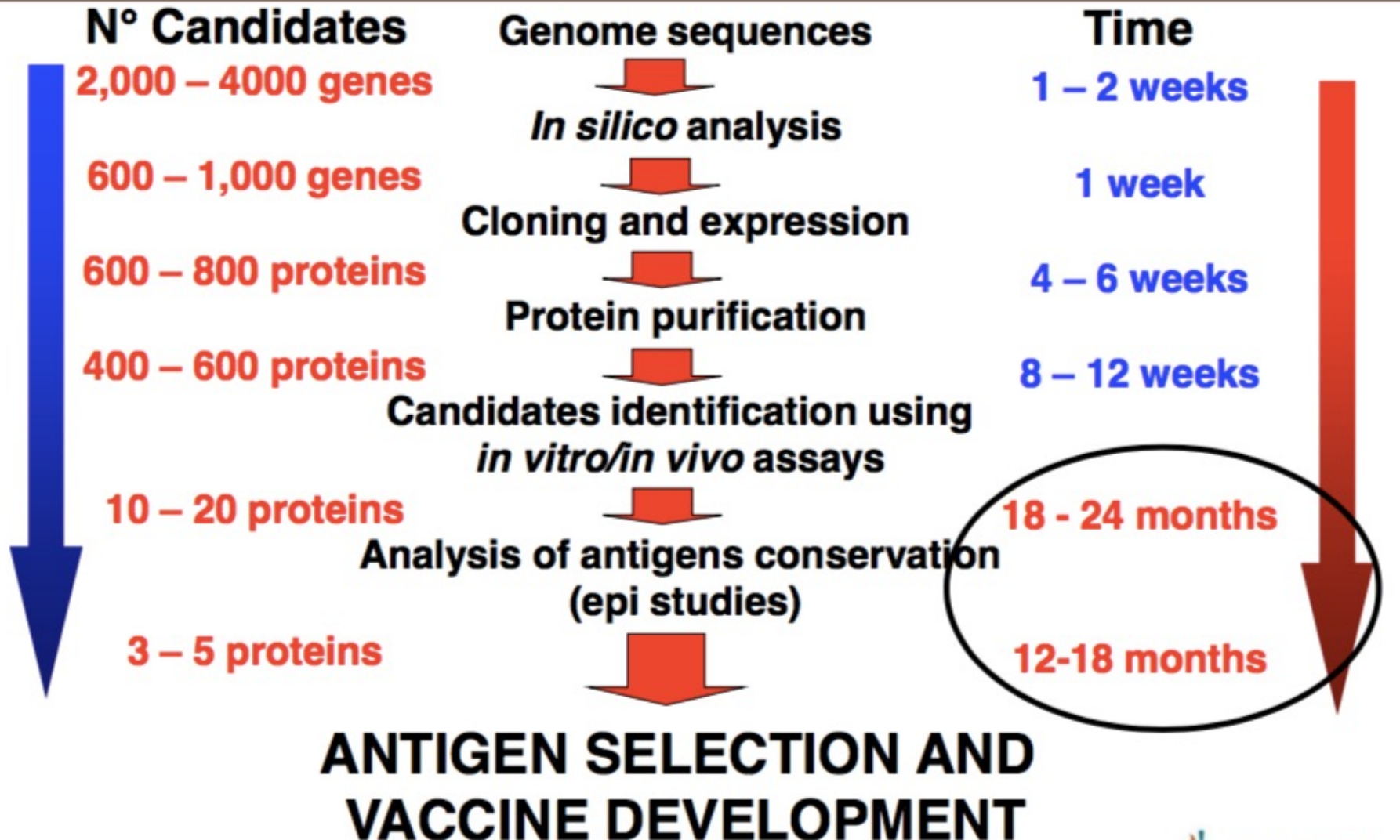




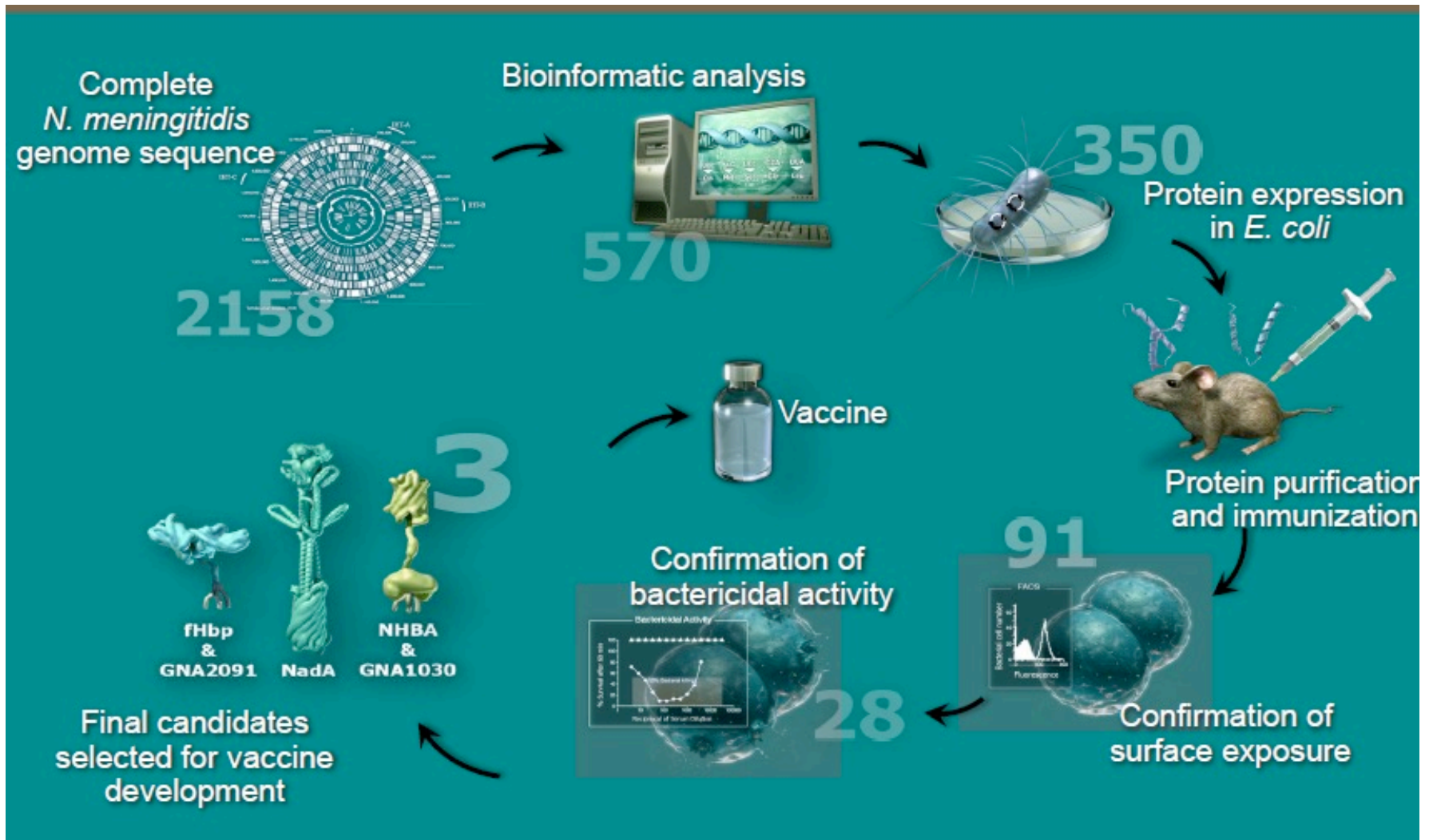


Reverse vaccinology

Bacterial Vaccine Discovery Platform: Reverse Vaccinology



Reverse vaccinology: l'approccio per i vaccini dal 2000



PanGenomics

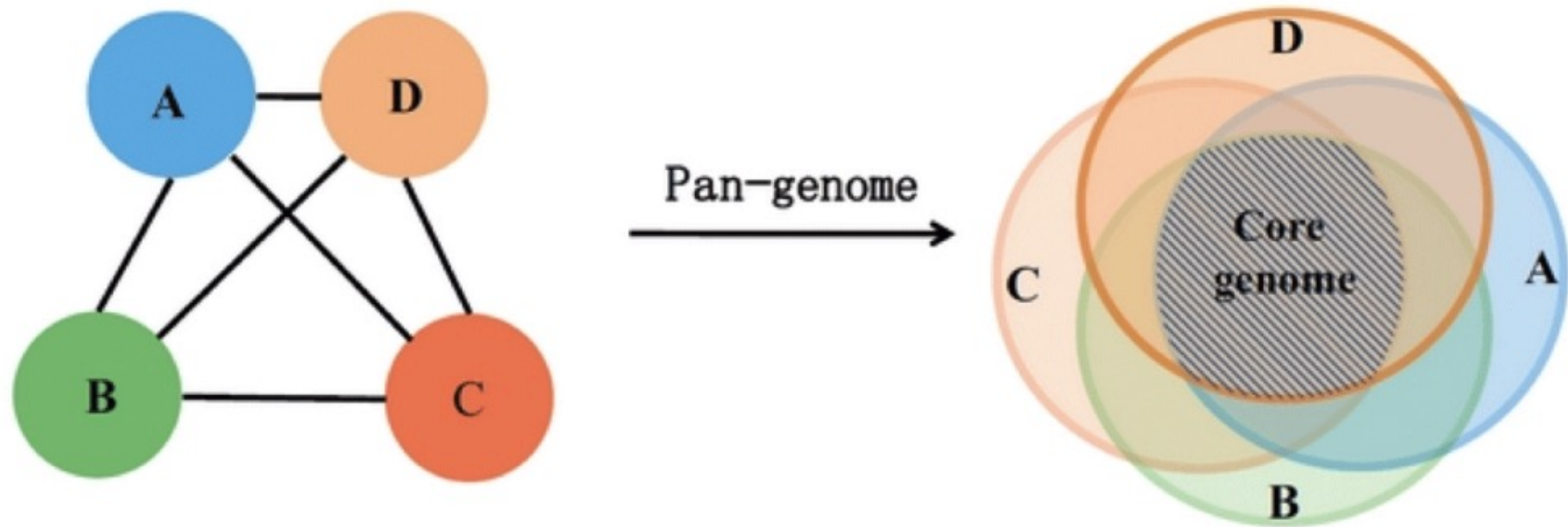


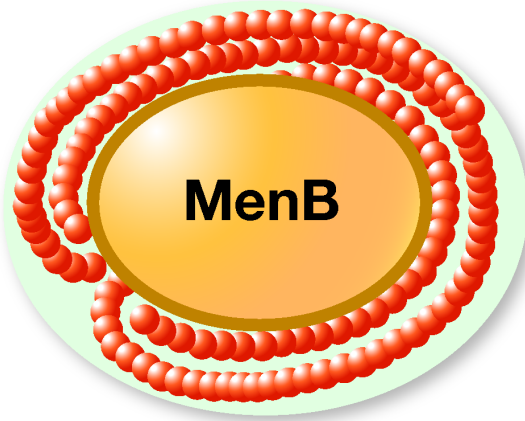
Figure 1. Construction of pan-genome.

Vaccini vs Meningococco

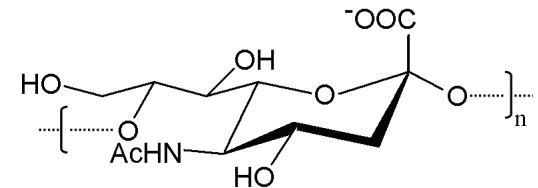


- Anni '60 sviluppo di vaccini contro sierotipi A,C,Y e W135 usando PCS purificati come antigeni
- Maggiore efficacia dei vaccini coniugati (MenC, Regno Unito 1999)
- Sviluppo dei vaccini quadrivalenti coniugati con proteine carrier (MenACYW-CRM)

E per il meningococco di sierotipo B ?

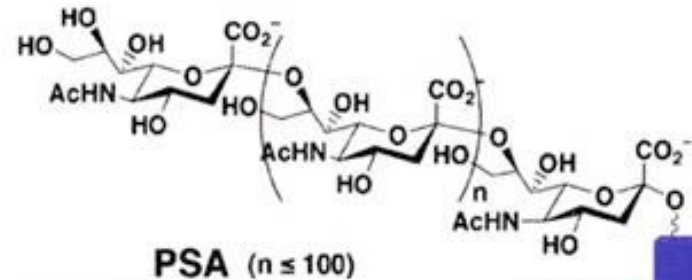


Non ci sono vaccini
universalmente
efficaci per
proteggere dal MenB

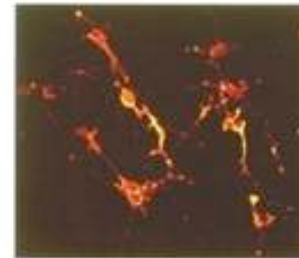


MenB

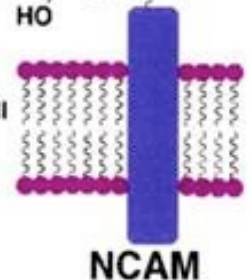
- Acido polisialico simile a una molecola presente sulla superficie del tessuto nervoso umano
 - Poco immunogenico



PSA ($n \leq 100$)



Neuron or tumor cell
membrane



NCAM

I vaccini contro meningococco 1.

- ✓ I vaccini contro meningococco di sierotipo A,C,Y e W135 sono basati su glicoconiugati
- ✓ La stessa strategia non è stata efficace contro meningococco B.
- ✓ Parallelamente al sequenziamento di Meningococco B (MC58) sono state identificate quelle sequenze che codificavano per proteine di superficie.
- ✓ Su 2158 sequenze esaminate 600 codificavano per proteine di superficie che comprendevano proteine di ME, proteine secrete, proteine di MI, proteine periplasmatiche e proteine con omologia di sequenza a fattori di virulenza già identificati in altri patogeni.
- ✓ L' effettiva posizione in superficie di queste proteine sui batteri veniva confermata attraverso FACS e ELISA.

I vaccini contro meningococco 2.

- ✓ Le sequenze identificate venivano amplificate tramite PCR e clonate in *Escherichia coli* in appositi vettori in grado di fonderle con un His-tag o GST.
- ✓ 350 di queste sequenze venivano espresse correttamente, purificate e usate per immunizzare i topi.
- ✓ Veniva effettuato uno screening sui sieri tramite Western blot usando sia lisati batterici totali sia vescicole.
- ✓ Infine i sieri erano saggiati in test che mettevano in evidenza la capacità battericida (la presenza di anticorpi battericidi).
- ✓ I risultati mostravano che 99 proteine erano esposte in superficie e che 28 di queste erano capaci di indurre anticorpi battericidi.

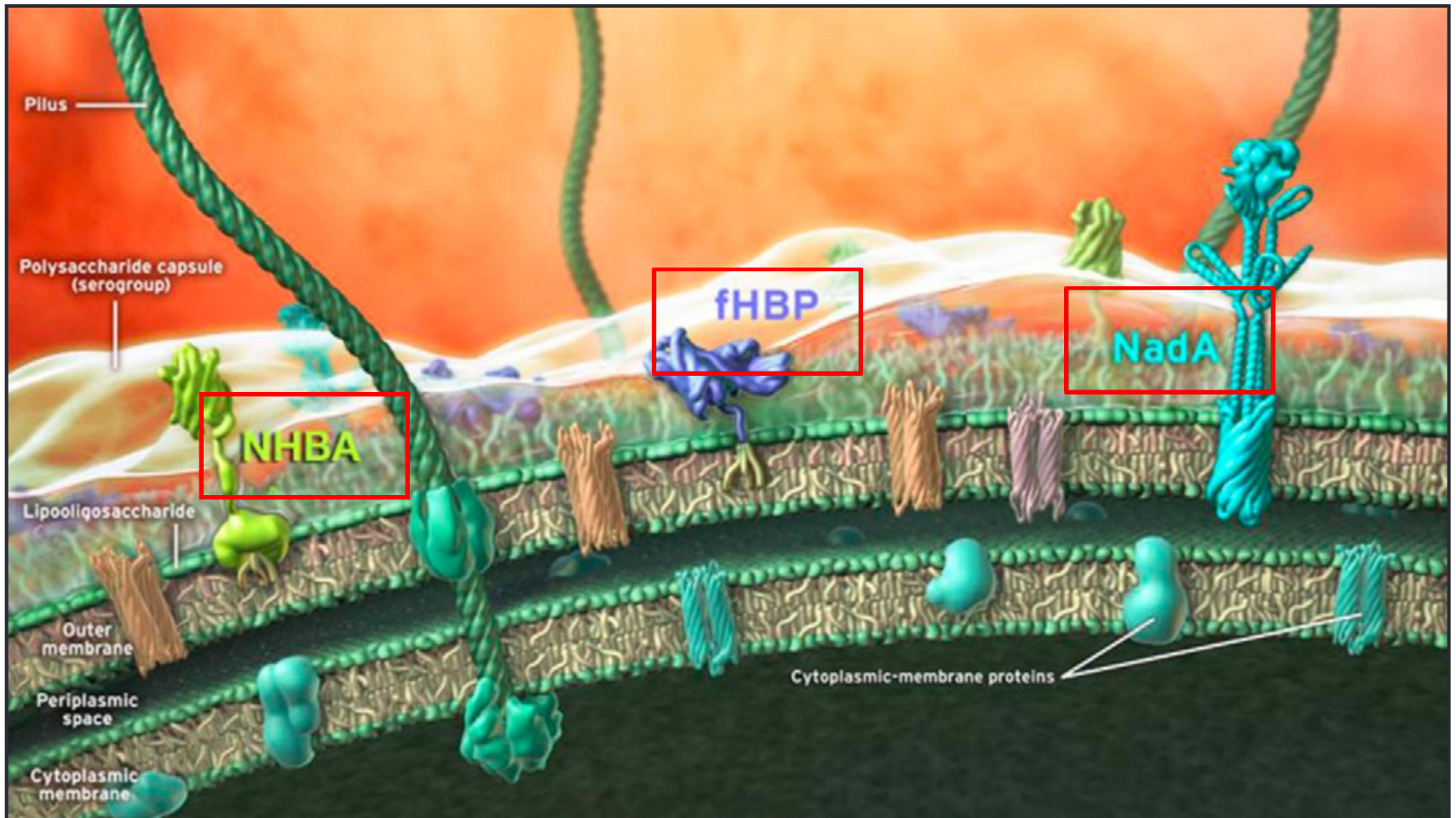
I vaccini contro meningococco 3.

- ✓ Molti antigeni identificati attraverso approcci più convenzionali sono stati individuati solo su alcune specie o alcuni sierotipi o localizzati in regioni variabili. Questo ha determinato una risposta immunitaria contro le specie omologhe ma non eterologhe.
- ✓ Al fine di risolvere questo problema le 21 sequenze putative di MenB identificate attraverso la reverse vaccinology per essere utilizzate come vaccino sono state soggette ad una analisi genomica su 31 altri ceppi di MenB.
- ✓ La maggior parte di queste sequenze erano presenti su tutti i ceppi.
- ✓ Molte di queste comprendevano proteine che non corrispondevano canonicamente ad antigeni: proteine con struttura globulare, lipoproteine e proteine scarsamente rappresentate nella cellula batterica.

I vaccini contro meningococco 4.

- ✓ Proteine ricombinanti incluse nel vaccino (4CMenB):
- ✓ **NHBA**-Heparin Binding Antigen: una proteina che gioca un ruolo nella resistenza all'attività battericida del siero
- ✓ **NadA**-adesina. NadA è omologa a YadA di *Yersinia*, una adesina, e UspA2 di *Moraxella catarrhalis*, una proteina coinvolta nella resistenza al siero. Sebbene la sequenza primaria di queste tre proteine presenti significative differenze, la struttura secondaria è altamente conservata. NadA conserva la capacità di aderire alle cellule.
- ✓ **fHbp**-Factor H binding protein. Una proteina che lega il fattore H del complemento e che agisce da inibitore del pathway alternativo del complemento e che permette a MenB di evadere l'attività di killing del complemento.
- ✓ Il vaccino contiene anche un componente costituito dalle vescicole delle ME di MnB contenenti varie altre proteine.

Ag presenti nel 4CMEnB

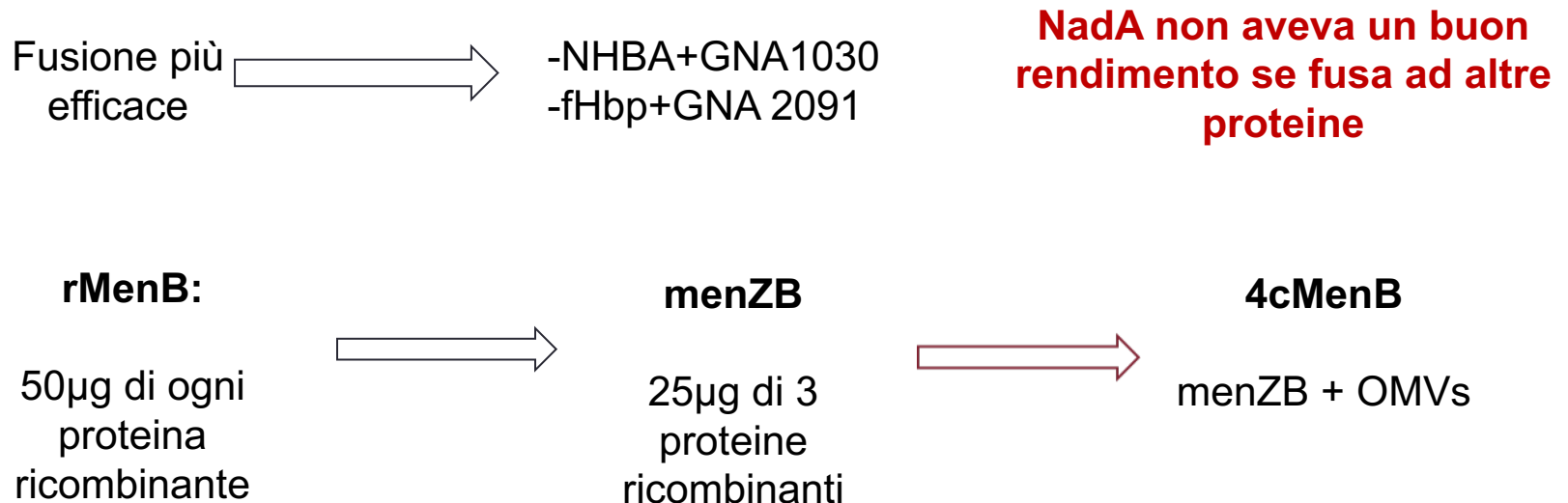


Ag identificati con la reverse vaccinology

Selezionati sulla base della loro abilità nell'indurre un'ampia protezione.

- NHBA(legante eparina);
- fHbp (legante il fattore H umano);
- NadA (adesina di Neisseria)

Aggiunta di Ag supplementari: GNA 2091; GNA1030



GNA 1030 = fattore coinvolto nello stress ossidativo (lega 2 molecole dell'ubinoquinone 8b).

GNA 2091= proteina coinvolta nella stabilità della membrana

NadA

Membro della famiglia delle **adesine trimeriche**



NadA

Costituito da:

- peptide leader all'N-terminale di 23 residui aa,
- dominio testa di 70 aa → importante per l'adesione
- un dominio C-terminale di 55 residui che somiglia a una sequenza di YadA (di Yersina)

NadA → 5 varianti (1,2,,3,4,5)

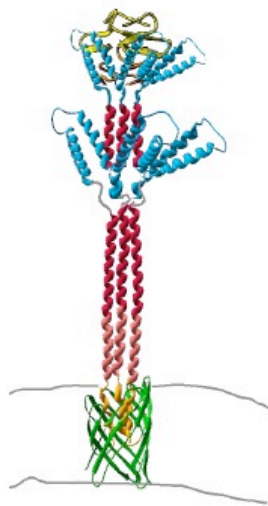
NadA promuove l'adesione batterica e l'invasione di cellule epiteliali umane.

Inclusa nel 4CMenB in forma solubile, priva del dominio di ancoraggio alla membrana.

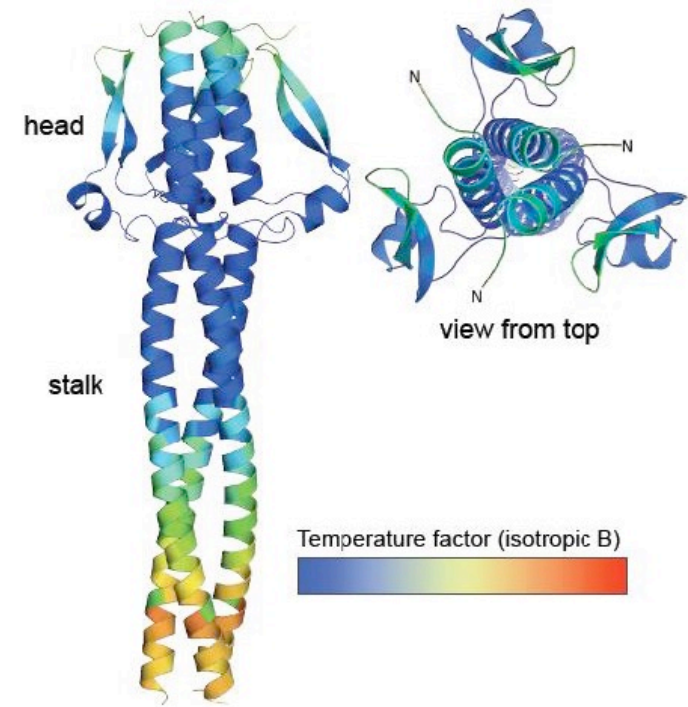
È espressa ed immunogenica durante l'infezione nell'uomo

Induce protezione passiva in ratti neonati infettati con diversi ceppi di Men B

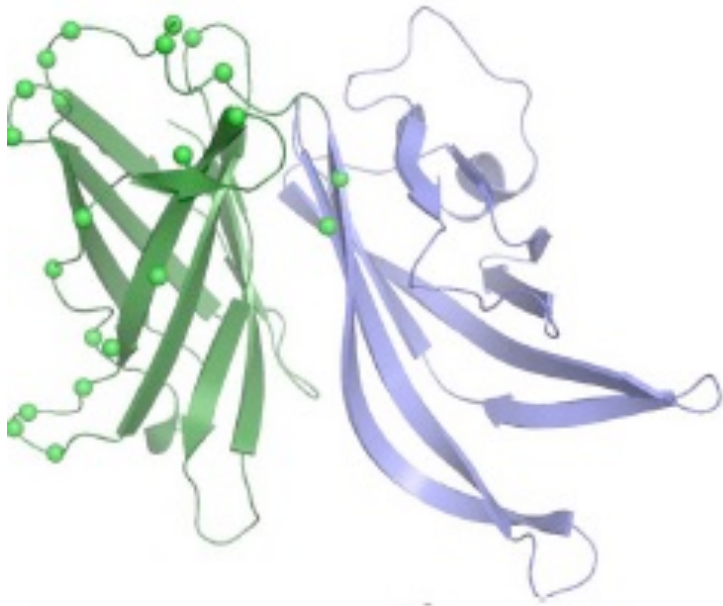
Espressione variabile di NadA durante la crescita batterica



In vitro l'Ag NadA può essere represso da Nadr



fHbp

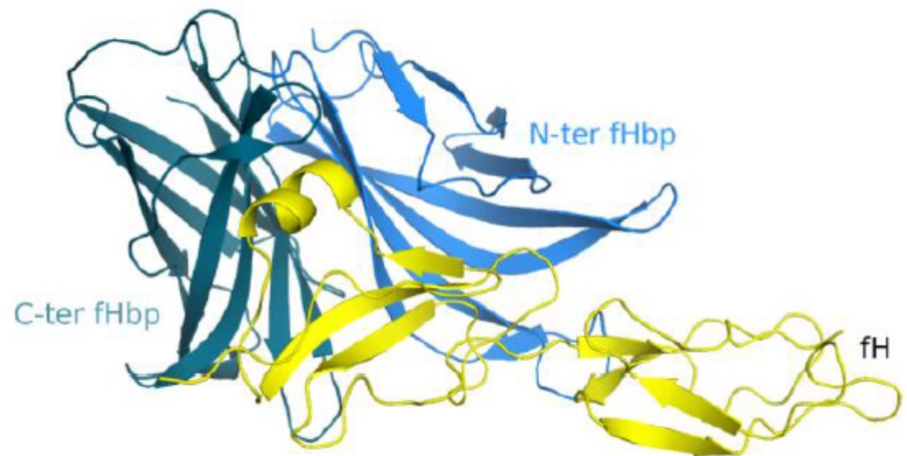


Lega il fattore H, un
inibitore della via del
complemento

Lipoproteina di 27 kDa espressa sulla
superficie

Identificata durante lo screening del
genoma di MC58.

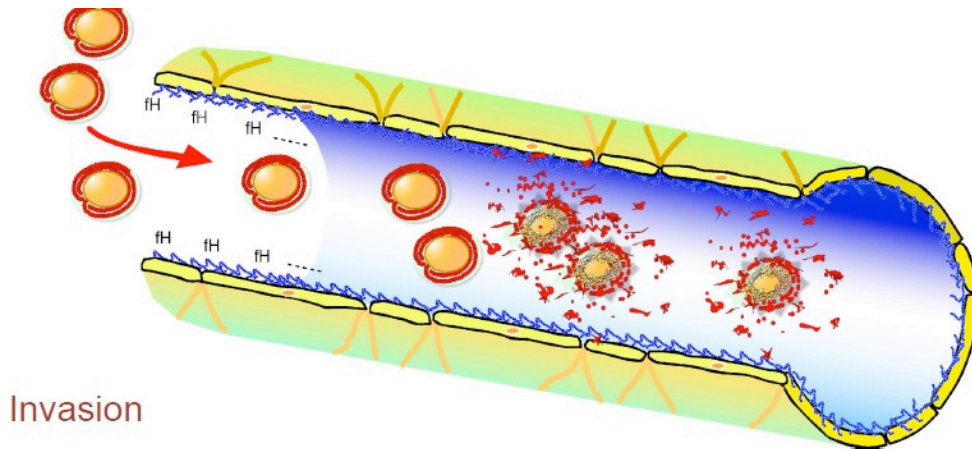
Espressione altamente variabile nei vari
ceppi



FLUID



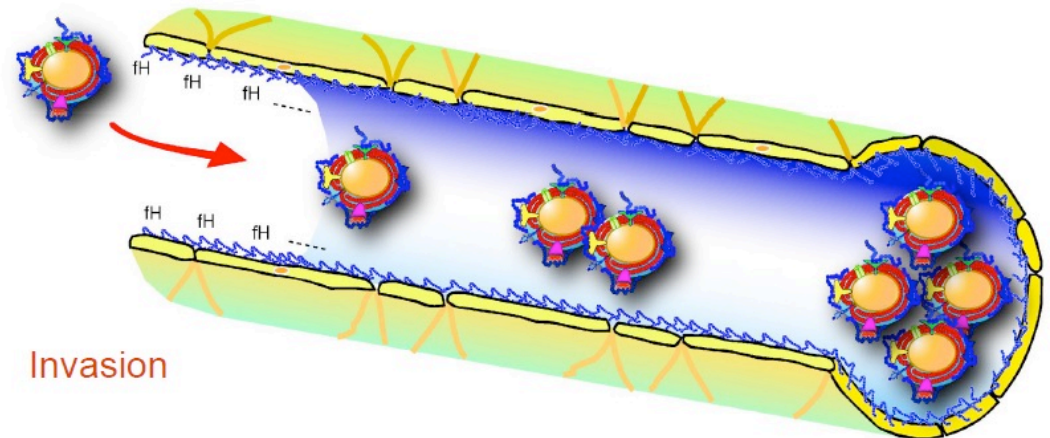
Il legame al fH è un meccanismo di sopravvivenza per Meningococco



Invasion

Complement mediated killing

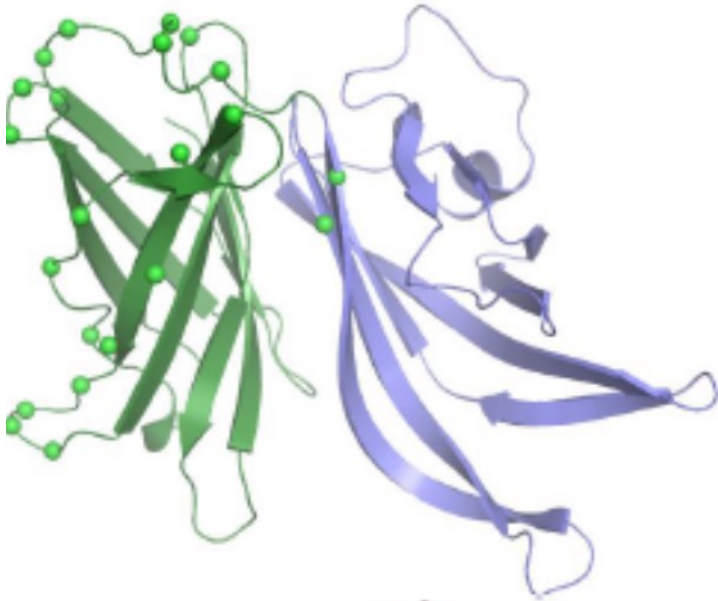
Non c'è il legame fHbp-fH → batterio muore



Invasion

Survival and growth

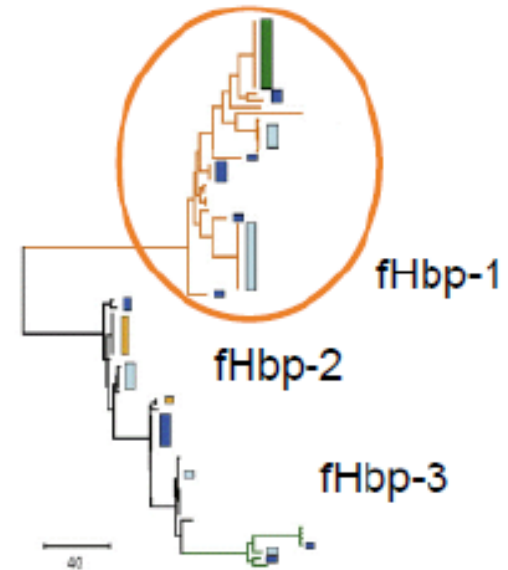
C'è il legame fHbp-fH → batterio sopravvive



- C-terminale a barile- β
- N-terminale a foglietto β
- Linker collega C- e N-terminale
- N-terminale ha un "lipo-box": (Leu-X-X-Cys).

Mostra una maggiore cross-reattività in adulti piuttosto che bambini

Induce Ab e conferisce protezione passiva in topi neonati



NHBA



NHBA

Lipoproteina esposta sulla superficie della membrana

Lega l'eparina grazie a una regione ricca in arginina

NHBA-eparina recluta inibitori del complemento

Sequenza primaria di 450 residui.

Motivo ricco di arginina tra il C- e N-terminale

Struttura a barile beta costituita da 8 foglietti anti-paralleli.

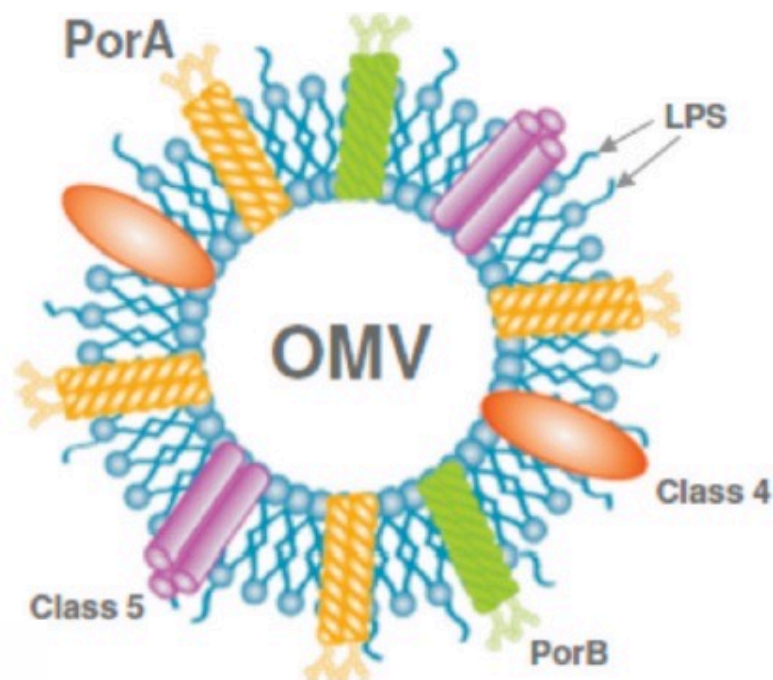
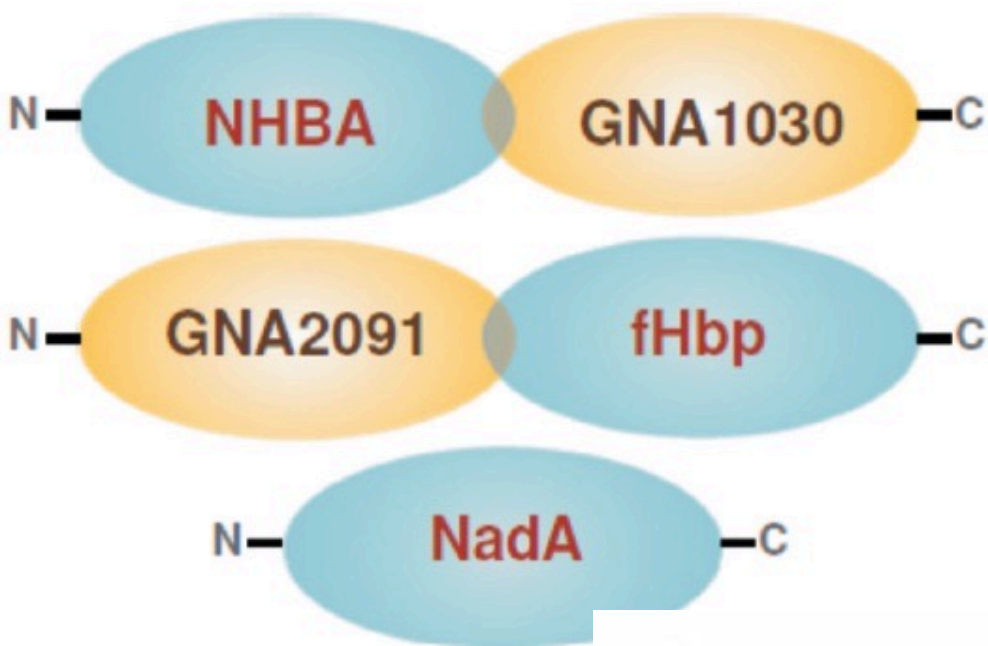
Presente in tutti i ceppi di *N.*
meningitidis

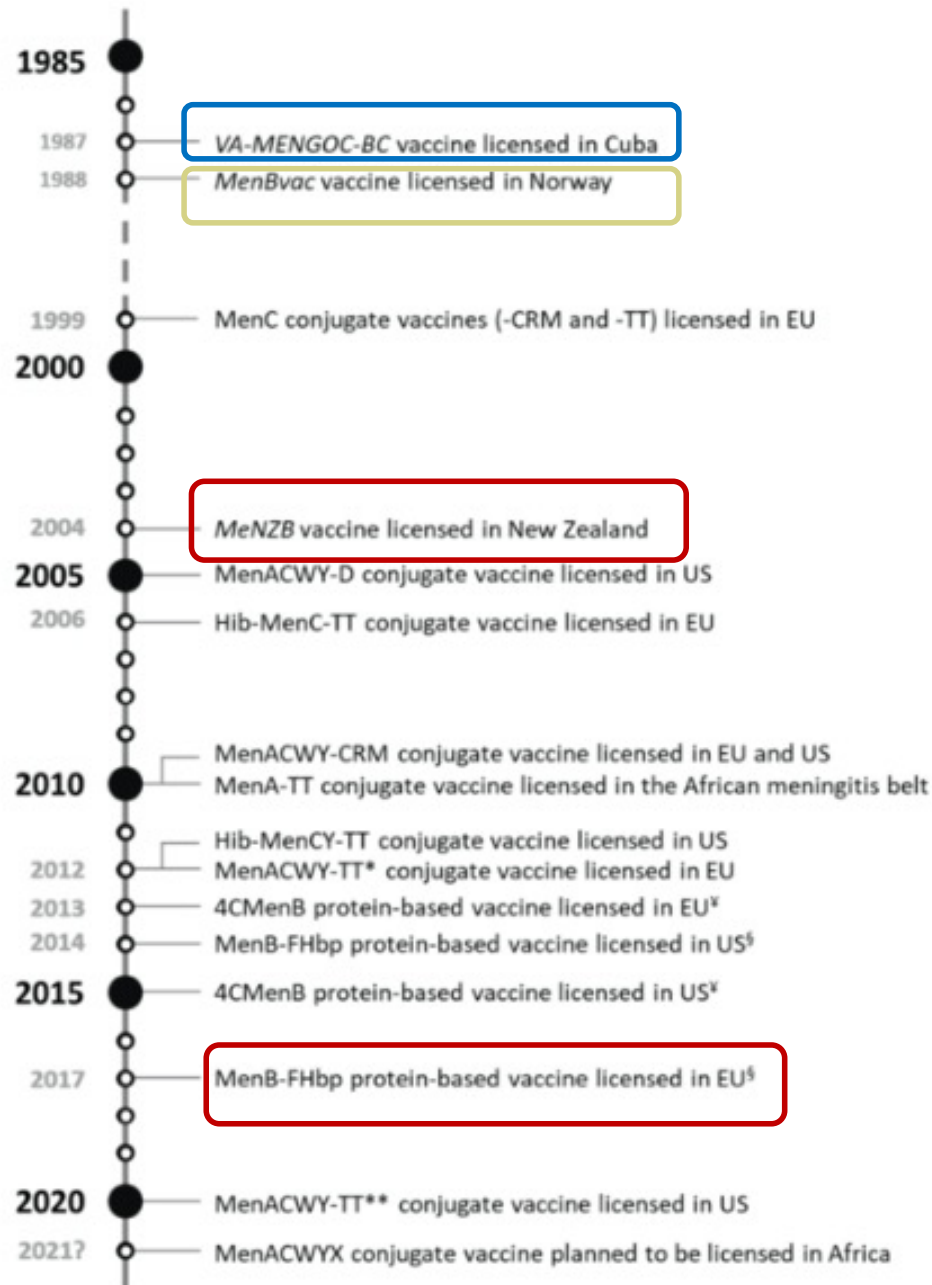
Ab provenienti da topi
immunizzati
suscitavano risposta
battericida mediata
dal complemento

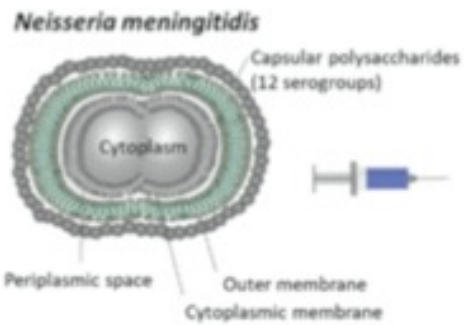


Induceva la
produzione di Ab
nell'uomo

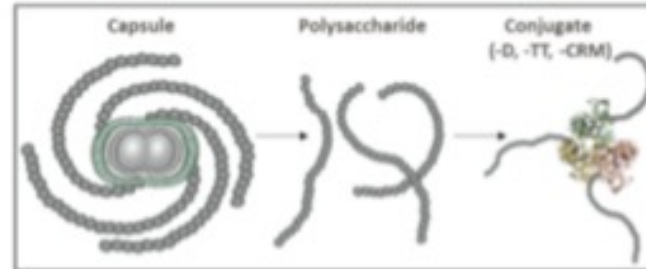
NHBA







MenACWY

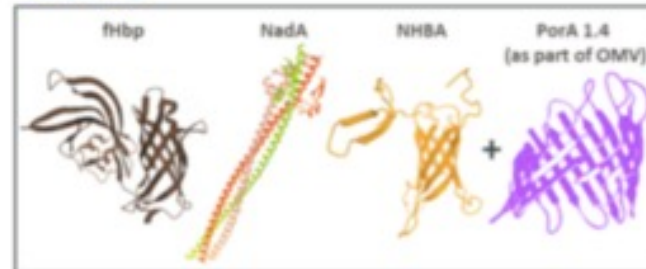


OMV

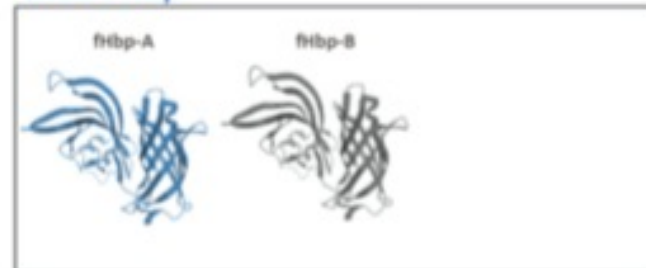
PorA 1.4 (as part of OMV)



4CMenB

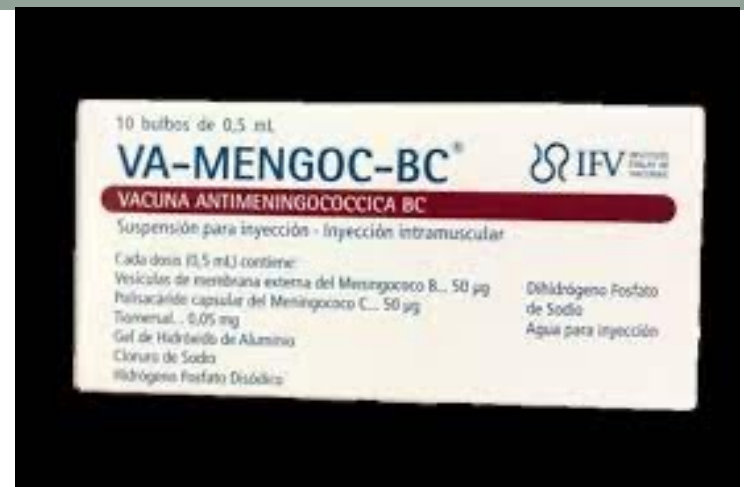


Men-FHbp





VA-MENGOC-BC (Finlay Institute) usato a Cuba fra ragazzi di 10-14 anni negli anni 1987-1989.



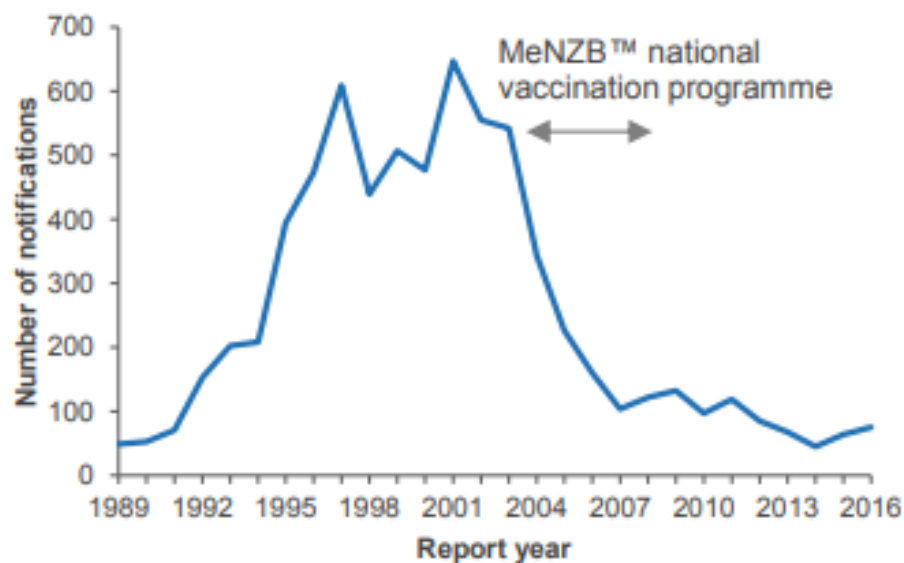
MenBvac è stato sviluppato in Norvegia dal Norwegian Institute of public health.

MenBvac è stato usato su ragazzi di 13-16 anni nel periodo 1988-1991

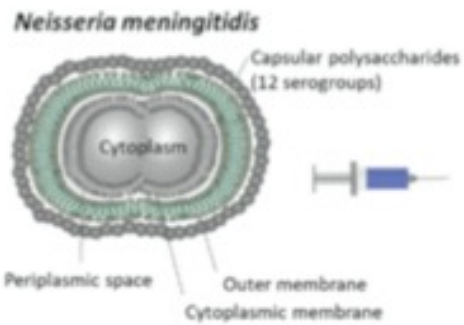
Entrambi questi vaccini hanno fornito una buona protezione contro gli omologhi ceppi di meningococco ma non contro i ceppi eterologhi, cioè un differente LOS e una diversa proteina PorA



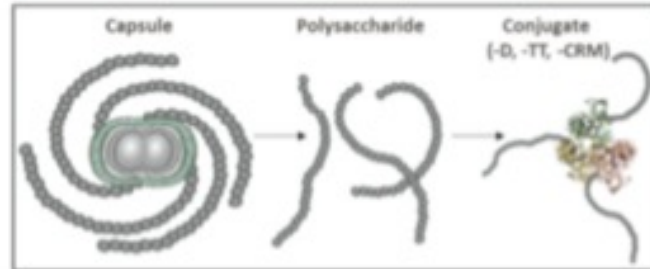
MenZB (Novartis) è stato usato in Nuova Zelanda con tre dosi dal 2004-2008 nei neonati e nei bambini dai 6 mesi di età. Nel 2016 ne erano state somministrate 3 milioni di dosi.



La limitazione era sempre relativa all'efficacia su ceppi eterologhi.



MenACWY

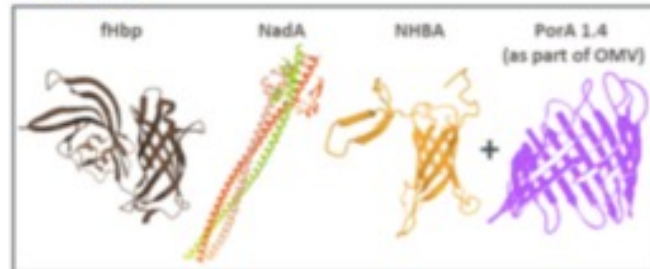


OMV

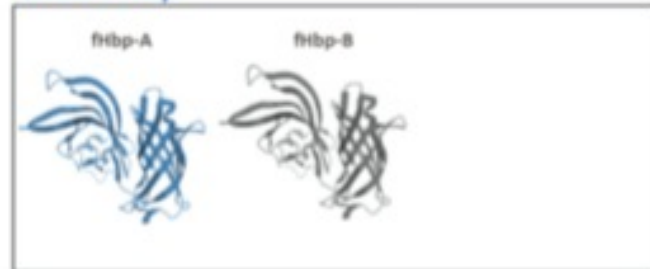
PorA 1.4 (as part of OMV)



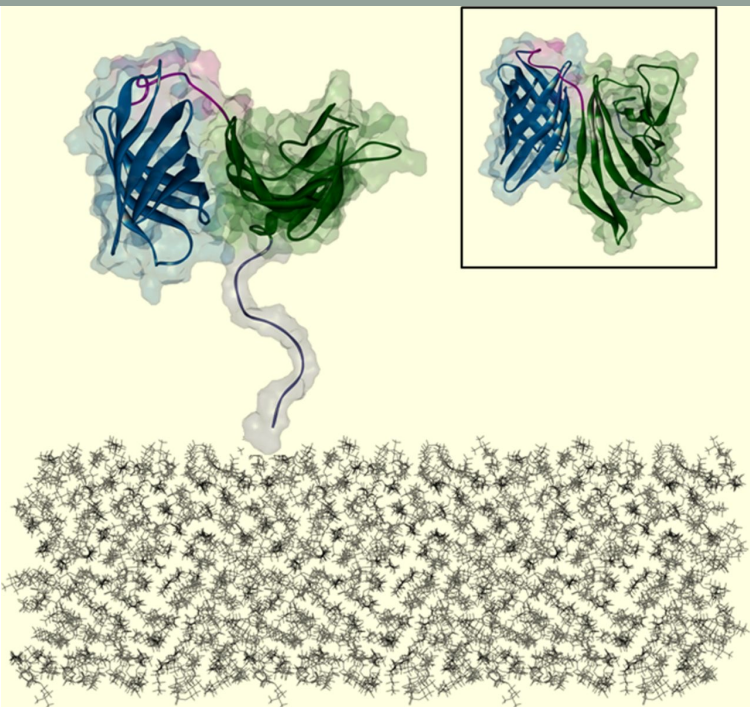
4CMenB



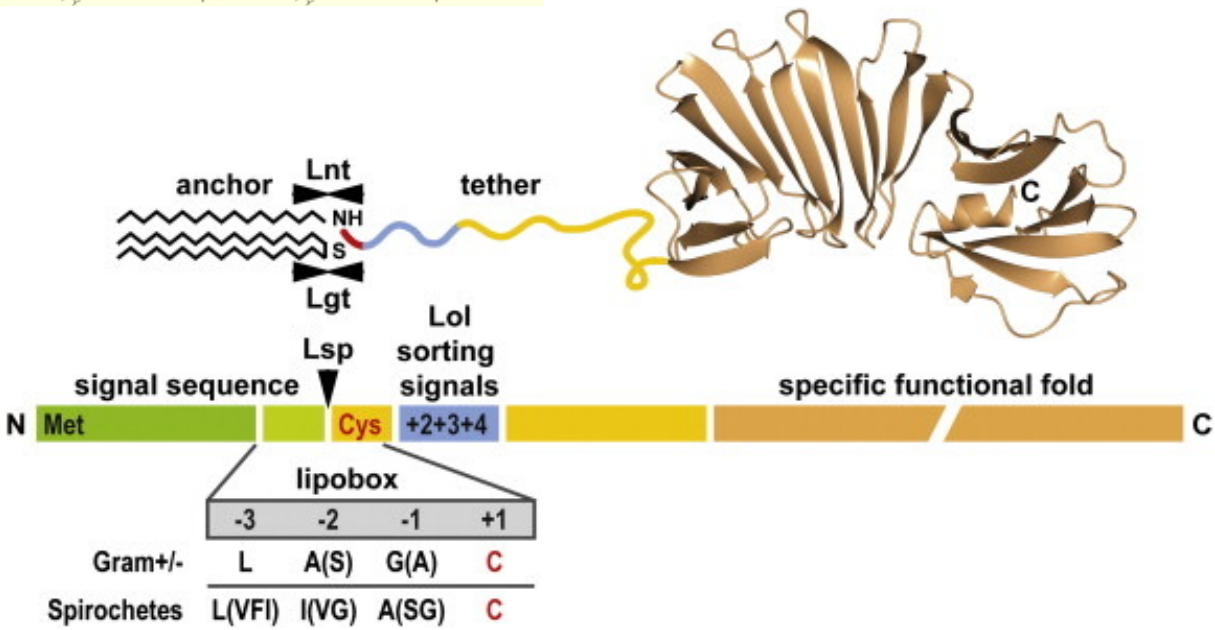
Men-FHbp







Il gene fHBP esprime un precursore proteico che contiene un segnale tipico delle lipoproteine, LXXC. La sequenza segnale viene scissa in modo tale che la cisteina (C) diventi l'estremità N dell'fHBP maturo e venga modificata cotraduzionalmente in un residuo tri-Pam-Cys che serve ad ancorare la proteina alla membrana esterna di *Neisseria*. 'fHBP matura ha una lunghezza compresa tra 253 e 266 amminoacidi; la maggior parte della variazione delle dimensioni è il risultato della lunghezza variabile di un segmento flessibile o spaziatore, composto da 2 a 15 residui di glicina e serina immediatamente dopo la cisteina N-terminale.



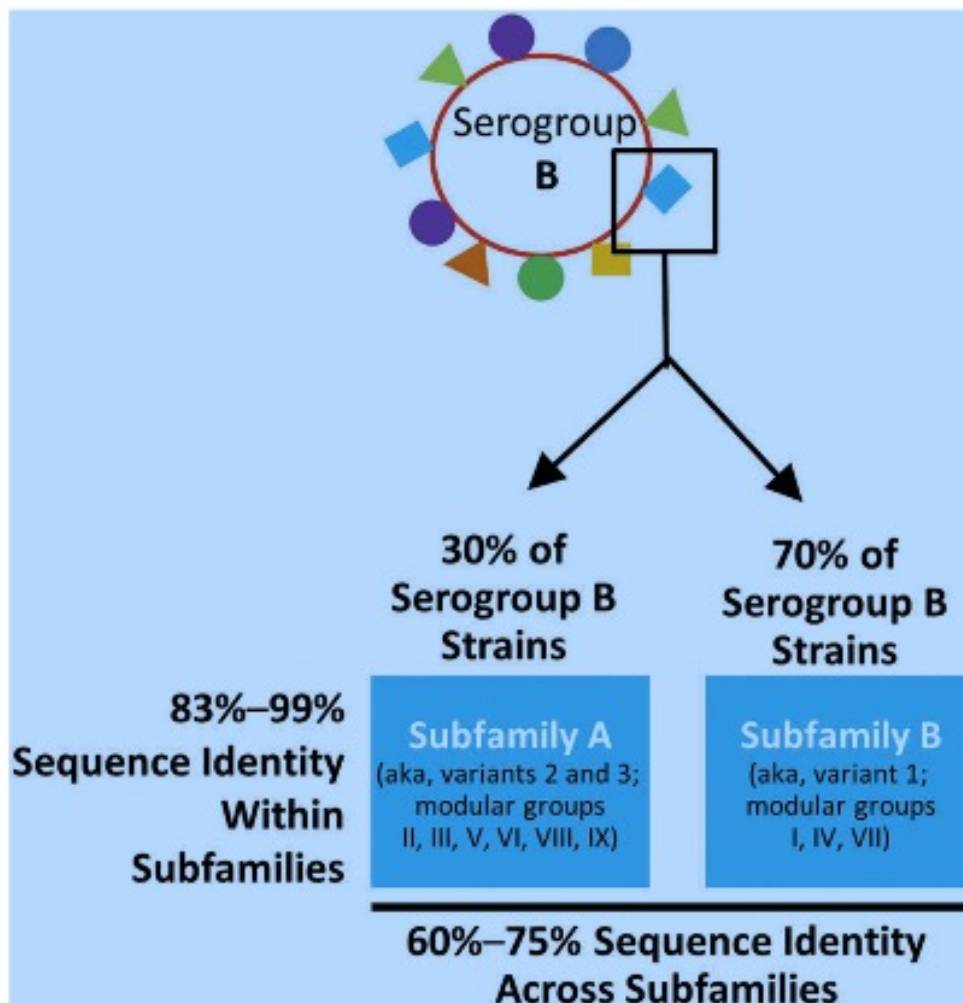
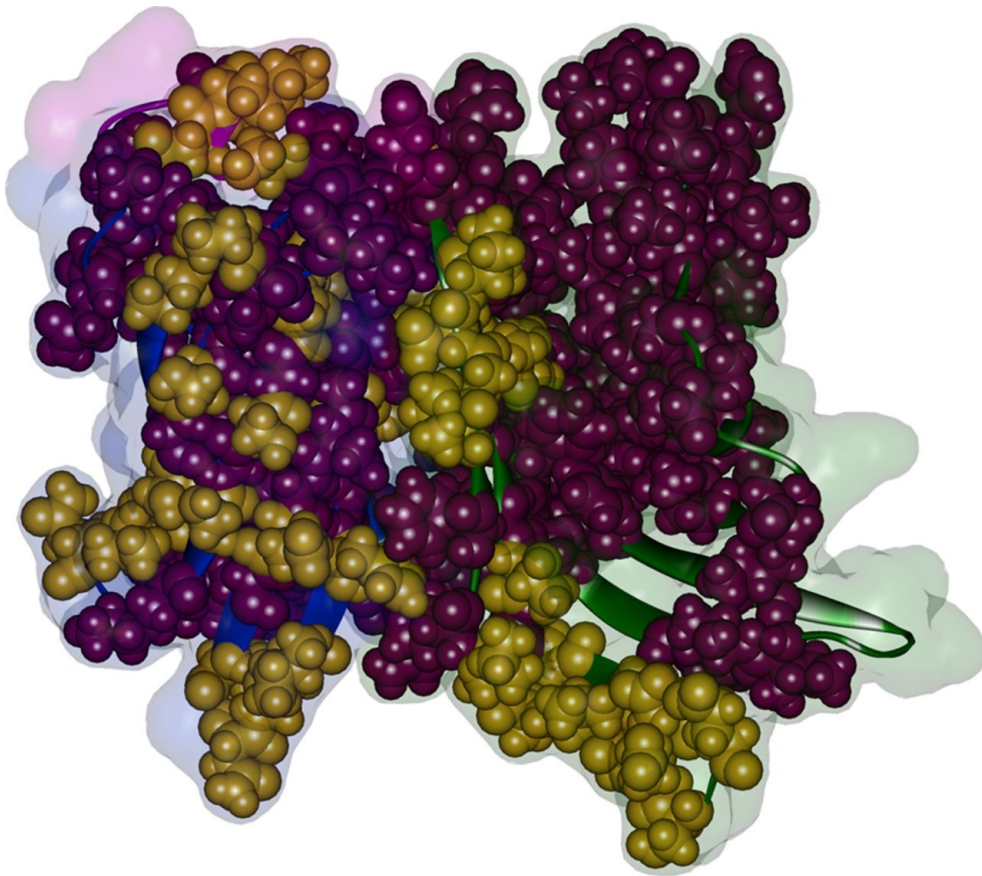


Figure 2. Meningococcal serogroup B factor H binding protein. MnB strains contain 1 of 2 distinct protein subfamilies of fHBP: subfamily A and subfamily B. Other groups also categorize fHBP into three variants (i.e. 1, 2, and 3) or 9 modular groups (i.e. I to IX).

fHBP: factor H binding protein; MnB: meningococcal serogroup B.



fHBP conservation within and across the A and B subfamilies. The residues defining the A and B subfamilies (gold) and the residues conserved in all A and B variants (purple) are shown as spheres on the B01 structure. Other residues are dimmed and colored according to structural regions: green, N-terminal domain; blue, C-terminal domain; pink, linker between the β -structures of two domains. The membrane-anchoring N-terminal flexible stem of fHBP is behind the structure.

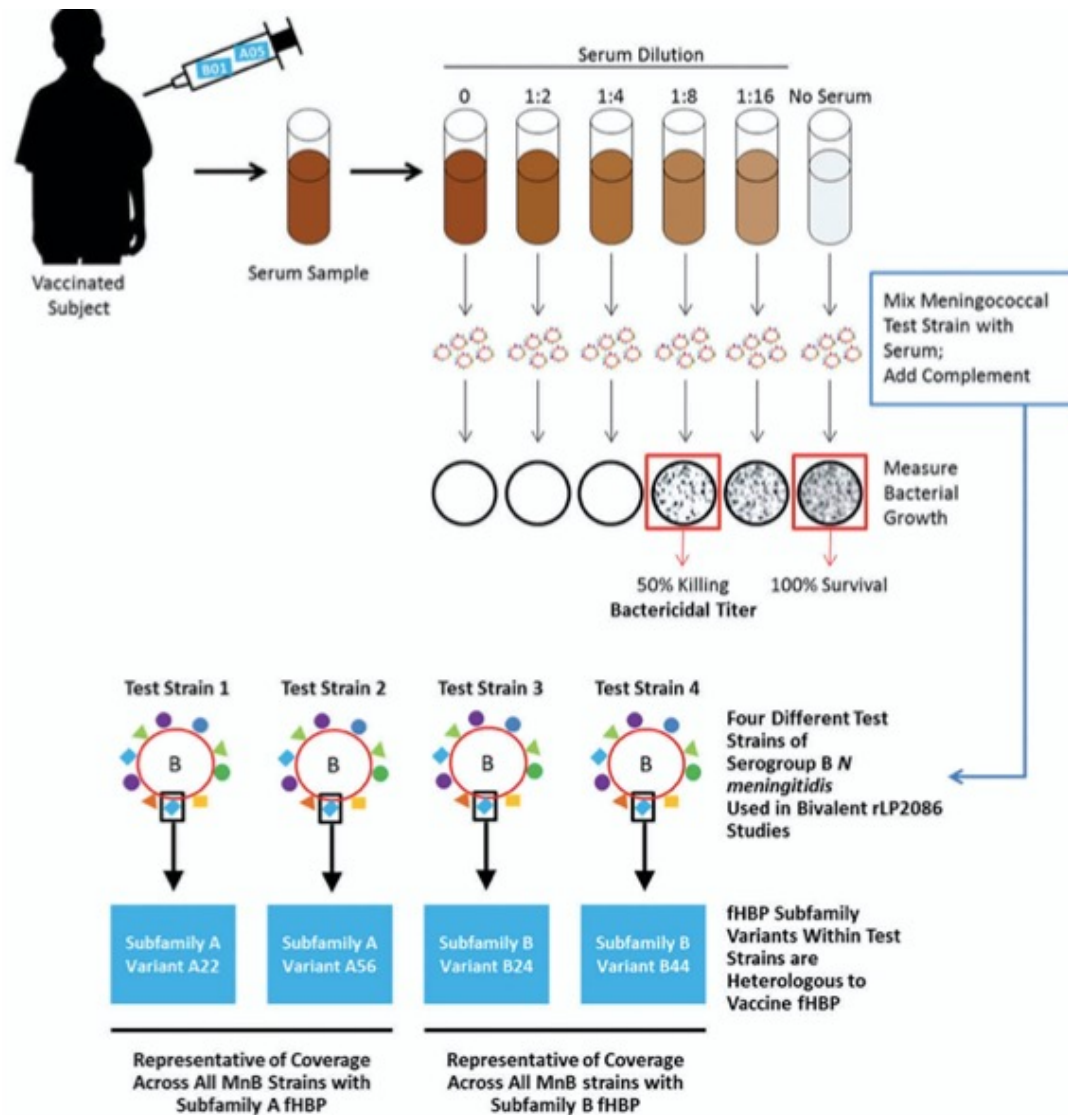
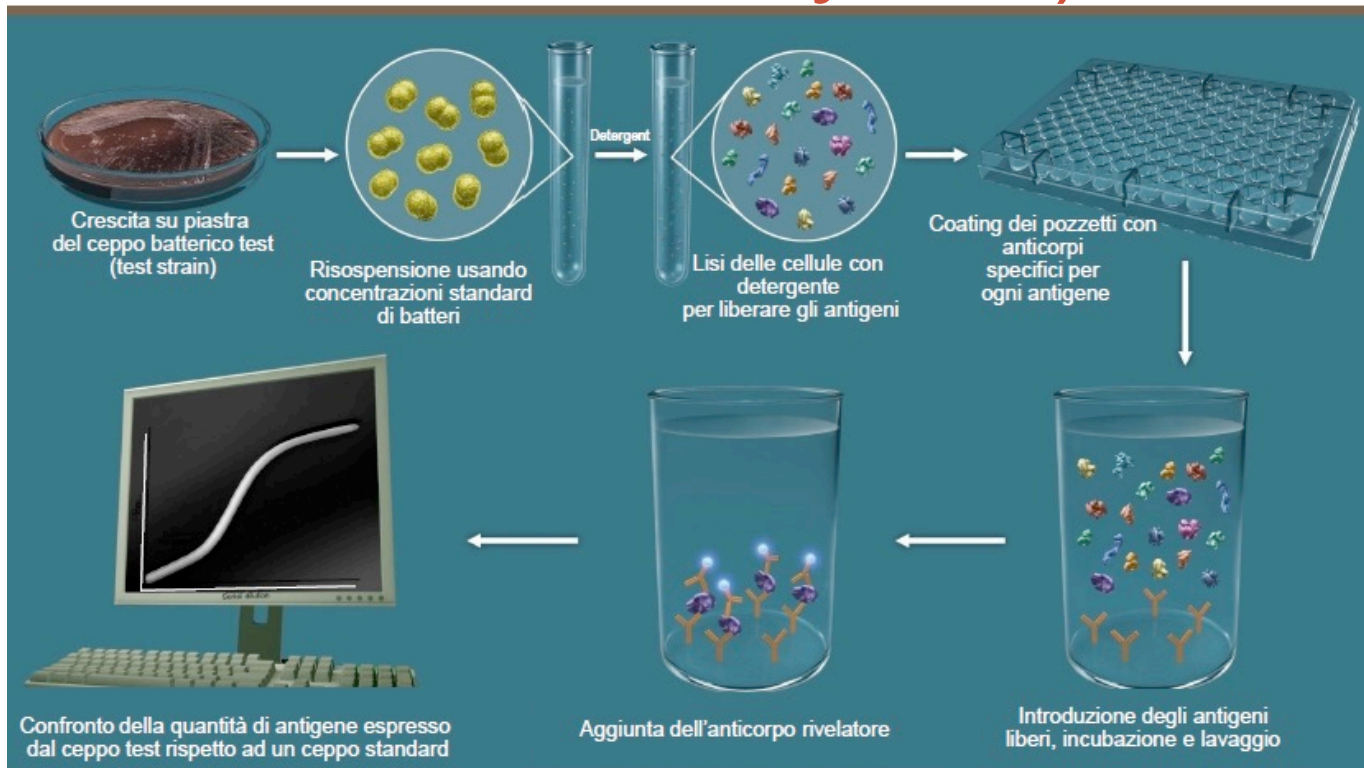


Figure 4. Serum bactericidal assay with 4 different test strains of serogroup B *N. meningitidis* used in bivalent rLP2086 studies. fHBP: factor H binding protein; MnB: meningococcal serogroup B.

MATS (Meningococcal Antigen Typing System)



Quantifica il livello di espressione degli antigeni

Sieri di bambini vaccinati con 4CMenB sono risultati battericidi contro il 78% di ceppi invasivi in 5 paesi europei

REVERSE VACCINOLOGY

The GBS Vaccine

Streptococcus di gruppo B

