IL VACCINO PANDEMICO: PROBLEMI E NUOVE STRATEGIE DI PRODUZIONE

Laura Campitelli, Francesca Beneduce, Laura Calzoletti e **Isabella Donatelli**
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

Anche in situazione di emergenza da pandemia il vaccino è considerato lo strumento più efficace per prevenire e combattere la malattia, come peraltro evidenziato in tutti i piani pandemici fin qui elaborati (vedi articolo "Il Piano Pandemico Italiano" a pag. 27-29).

Al momento lo sviluppo di un vaccino pandemico prevede l'impiego delle stesse metodologie utilizzate per l'allestimento del vaccino stagionale, tenuto conto della complessità dei processi produttivi e delle difficoltà di introduzione di nuove tecnologie (vaccini su colture cellulari, liposomiali, ecc.).

Caratteristiche dei vaccini influenzali stagionali

I vaccini attualmente prodotti e commercializzati in Italia e nel resto d'Europa sono prodotti in uova embrionale di gallina e sono costituiti da virus inattivato, ossia ucciso dopo trattamento con formaldeide o β-propiolattone, e successivamente purificato.

Esistono diverse tipologie di preparazioni vaccinali. Il vaccino a "virus intero", cioè costituito da particelle virali intere, pur essendo ancora registrato, non viene più commercializzato a causa della sua elevata reattogenicità.

Questo vaccino è stato sostituito dai vaccini cosiddetti "subvirionici", che subiscono ulteriori processi di purificazione che portano all'allontanamento della componente lipidica, spesso associata a reazioni collaterali ("vaccini frazionati" o *spilt*), o all'eliminazione pressocché totale di tutte le proteine virali interne. Questi ultimi vaccini ("vaccini a subunità") sono particolarmente ben tollerati e sono quindi indicati per la profilassi in età pediatrica.

Per aumentare il potere immunogeno dei vaccini influenzali, negli ultimi anni sono stati messi in commercio vaccini adiuvati, che contengono cioè sostanze in grado di indurre una risposta immunitaria più elevata e più duratura. Gli adiuvanti attualmente utilizzabili per uso umano sono costituiti da alcuni sali di alluminio o da emulsioni olio/ ▶

acqua, come l'MF59 (derivato dal lipide squalene), impiegato dalla Chiron.

Problemi legati allo sviluppo di un vaccino pandemico

Il primo problema che si incontra nell'allestimento di un vaccino pandemico è la difficoltà di produrre un numero di dosi sufficiente a soddisfare l'aumentato fabbisogno generale in caso di pandemia (1). Il principale fattore limitante è costituito dallo stesso substrato di crescita del virus: la quantità di uova embrionali oggi disponibili in tutto il mondo è infatti limitata, essendo programmata in modo da garantire la produzione del numero di dosi (circa 300 milioni) attualmente utilizzate. Inoltre, qualora il virus fosse di origine aviaria e ad alta patogenicità, come nel caso del ceppo H5N1, le uova non consentirebbero la crescita al loro interno di un ceppo patogeno per il pollo e gli stessi allevamenti di pollame potrebbero essere a rischio di contagio.

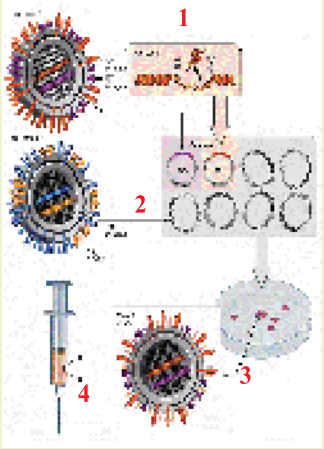
Inoltre, trattandosi di un virus nuovo contro cui la popolazione è totalmente suscettibile (*naive*), la quantità di antigene (per ciascuno dei tre ceppi vaccinali) attualmente contenuta nel vaccino stagionale (15mcg di emagglutinina-HA) potrebbe non essere sufficiente a indurre una risposta anticorpale protettiva (2). Le capacità produttive di un vaccino pandemico monovalente potrebbe non essere pari a tre volte quello stagionale (trivalente): sono necessari studi clinici per stabilire il contenuto di HA/dose capace di indurre una sufficiente risposta immunitaria in una popolazione immunologicamente *naive*.

Un ulteriore problema è costituito dal tempo tecnico minimo necessario per la produzione su larga scala di un vaccino pandemico, stimato attualmente in 6-8 mesi.

Sviluppo di nuove tecnologie e ottimizzazione di quelle esistenti

Per risolvere questi e altri problemi legati allo sviluppo e all'impiego di un vaccino pandemico, l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha intrapreso una serie di iniziative in collaborazione con gruppi di ricerca, autorità regolatorie nazionali e transnazionali e industrie produttrici, al fine di sviluppare nuove tecnologie produttive in grado di aumentare la capacità di produzione o addirittura renderla possibile, e al contempo di massimizzare le potenzialità del sistema di produzione corrente, abbreviandone i lunghi tempi richiesti (3). Tra gli avanzamenti tecnologici compiuti o *in progress* e le misure introdotte o da intraprendere, i più rilevanti sono i seguenti:

- tecnica della *reverse genetics* basata su plasmidi. Questa particolare tecnologia di DNA ricombinante (Figura), sviluppata nel 1999-2000 per i virus influenzali, ha permesso di rimuovere la porzione di HA responsabile dell'alta patogenicità e di rendere quindi possibile la propagazione virale nelle uova embrionale di pollo di un ceppo altrimenti non coltivabile in questo substrato (4). Il ceppo vaccinale H5N1, ottenuto con questa tecnologia presso i laboratori di collaborazione dell'OMS del National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC) di Londra ha conservato la stessa specificità antigenica del ceppo originale ed è stato distribuito alle ditte produttrici interessate allo sviluppo di vaccini pandemici sperimentali;
- impiego di colture cellulari. L'uso di colture cellulari di rene di scimmia (cellule Vero, già impiegate per la produzione di vacci-



1 Clonaggio dei geni HA ed NA del virus altamente patogeno isolato (es. H5N1) in vettori plasmidici dopo aver eliminato gli aminoacidi che ne determinano la virulenza

2 Clonaggio in vettori plasmidici dei rimanenti 6 geni provenienti da virus influenzale umano adattato

3 Isolamento e crescita del virus "modificato" in coltura cellulare

4 Allestimento del vaccino prepandemico

Figura - Tecnica della *reverse genetics*, applicata alla produzione di ceppi vaccinali pandemici apatogeni

ni virali) o di rene di cane (cellule MDCK, più sensibili al virus influenzale), virtualmente disponibili in quantità illimitate, potrebbe risolvere il problema della limitata disponibilità di uova e quindi permettere un consistente incremento del numero di dosi ottenibili. Tuttavia, le rese virali non ancora ottimali e la necessità di riconvertire gli impianti con grande dispendio di tempo e costi fanno sì che questa opzione non sia ancora utilizzabile su scala industriale;

- impiego di adiuvanti e strategie di somministrazione volte a "economizzare" il contenuto di antigene necessario. L'OMS ha sollecitato la messa in campo di progetti di ricerca finalizzati a identificare adiuvanti e strategie alternative di somministrazione più efficaci per stimolare una forte risposta immunitaria e allo stesso tempo ridurre la quantità di antigene da includere nella formulazione vaccinale. A questo fine è necessario che i dati preclinici e clinici vengano condivisi e confrontati per arrivare a dei protocolli concordati;
- espansione della capacità produttiva del vaccino stagionale. I dati annuali di copertura vaccinale dimostrano che la vaccinazione non raggiunge il target desiderato: infatti, solo una parte della popolazione a rischio a cui la vaccinazione è annualmente raccomandata (soggetti di età pari o superiore a 65 anni, soggetti di qualsiasi età con condizioni patologiche predisponenti alle complicanze, personale sanitario di assistenza e addetti a servizi pubblici di primario interesse collettivo), si sottopone alla profilassi vaccinale. Interventi di promozione volti ad aumentare la copertura vaccinale nel periodo interpandemico comporterebbero un'espansione delle capacità produttive delle ditte vaccinogene, con evidenti conseguenze positive in termini di numero di dosi disponibili in caso di pandemia;
- armonizzazione delle procedure regolatorie per l'autorizzazione all'immissione in commercio di vaccini pandemici. È auspicabile che i requisiti per la concessione di un'autorizzazione per un vaccino pandemico siano il più possibile omogenei tra i vari Paesi produttori, così da accelerarne la disponibilità in tutto il mondo. L'OMS sta definendo, insieme alle autorità regolatorie nazionali e internazionali (European Agency for the Evaluation of Medicinal Products-EMEA) e alle industrie, delle procedure accelerate (*fast track procedures*) sia per la produzione che per il *licensing*. Tra queste vi è la possibilità che i controlli sul prodotto finito effettuati dall'autorità di controllo, che di solito vengono eseguiti dopo che il vaccino è stato controllato dal produttore, vengano effettuati in parallelo con il produttore.

Vaccini pandemici sperimentali

Pur sottolineando che il vaccino pandemico può essere prodotto solo in una situazione di pandemia dichiarata, la maggior parte delle industrie produttrici stanno allestendo vaccini cosiddetti *mock up*, cioè "prototipo", che serviranno a ottimizzare i processi di produzione e al contempo a condurre trial clinici in grado di fornire utili informazioni sulla tipologia e sulle caratteristiche che il vaccino pandemico dovrà avere, in termini di contenuto antigenico, numero di dosi richieste, necessità di adiuvanti, ecc.

Questa iniziativa, sollecitata primariamente dall'OMS, è molto importante per le seguenti ragioni:

- questo vaccino sperimentale sarà utilizzato in trial clinici fondamentali per valutare in anticipo la risposta alla vaccinazione di una popolazione *naive*. Le informazioni ottenute permetteranno di ottimizzare la strategia vaccinale in termini di quantità di antigene/dose e numero di dosi-vaccino/soggetto da somministrare per avere una risposta immunitaria tale da garantire immunità ▶

e come tale risposta possa essere migliorata con l'utilizzo di adiuvanti;
- la messa a punto sperimentale del vaccino prototipo è accompagnata in parallelo dalla preparazione del dossier di registrazione del vaccino, considerato un prodotto nuovo a tutti gli effetti, e dalla sua presentazione alle autorità regolatorie competenti, per la valutazione dei processi e dei dati preliminari. In Europa l'autorità preposta è l'EMEA, che ha stilato le linee guida sulla struttura e sul contenuto della documentazione da presentare da parte dalle ditte produttrici per ottenere l'autorizzazione alla immissione in commercio del vaccino influenzale pandemico, al fine di valutarne l'innocuità, la tollerabilità e l'immunogenicità (5).

L'altro requisito generalmente valutato, l'efficacia clinica ossia la capacità di ridurre l'insorgenza della malattia, non potrà essere comunque valutata in questa fase ma solo a posteriori. Nonostante ciò, questo esercizio è fondamentale per capire i punti critici e i problemi che possono insorgere, in modo da snellire le procedure nel caso di evento pandemico reale.

Il controllo di Stato dei vaccini influenzali

Le attuali direttive europee stabiliscono che tutti i lotti di vaccino antinfluenzale prima dell'immissione in commercio vengano sottoposti a controlli volti a garantire "la qualità e sicurezza" del prodotto da parte degli organismi di controllo preposti (6, 7). In ottemperanza a tali direttive l'Istituto Superiore di Sanità esegue attività di *batch release* su tutti i lotti prodotti, per poter rilasciare i certificati che ne autorizzano la commercializzazione.

Tale attività di controllo prevede l'esecuzione di saggi (8-10) che misurano, rispettivamente:
- il contenuto antigenico. Viene espresso come mcg HA/ceppo/dose (*potency test*) mediante un saggio di di immunodiffusione radiale singola (SRID), utilizzando reagenti di referenza forniti dall'OMS. Il contenuto nominale di antigene per ciascun ceppo è di 15 µg HA/dose, con un limite fiduciale inferiore della stima dell'antigene emagglutinina non inferiore all'80% della quantità dichiarata in etichetta per ciascun ceppo, cioè 12 mcg;
- il contenuto endotossico. Le endotossine derivano da batteri gram-negativi, presenti nei vaccini come residuo del processo di produzione. La concentrazione di endotossina ammessa dalla Farmacopea Europea per i vaccini antinfluenzali è pari a 100 UI/dose (Unità Internazionali);
- la purezza dell'antigene vaccinale. Viene eseguito solo nel caso di vaccini a subunità. Il test verifica, tramite elettroforesi su gel di poliacrilammide-SDS (PAGE), l'eliminazione delle componenti proteiche interne del virus.

È importante tenere presente che queste metodiche verrebbero impiegate anche nel controllo del vaccino pandemico. L'unica differenza si avrebbe nel caso in cui il vaccino pandemico fosse costituito da virus intero inattivato, in quanto non sarebbe applicabile il test per la purezza. ■

Riferimenti bibliografici

1. Wood JM, Robertson JS. From lethal virus to life-saving vaccine: developing inactivated vaccines for pandemic influenza. *Nat Rev Microbiol* 2004;2(10):842-7.
2. Treanor JJ, Campbell JD, Zangwill KM *et al*. Safety and Immunogenicity of an Inactivated Subvirion Influenza A (H5N1). *Vaccine NEM* 2006;354: 1343-51.
3. WHO. Responding to the avian influenza pandemic threat. WHO/CDS/CSR/GIP/2005.8. 2005.
4. Webby RJ, Perez DR, Coleman JS *et al*. Responsiveness to a pandemic alert: use of reverse genetics for rapid development of influenza vaccines. *Lancet* 2004;363(9415):1099-103.
5. European Committee for Proprietary Medicinal Products. Guideline on dossier structure and content for pandemic influenza vaccine marketing authorisation application (CPMP/VEG/4717/03).
6. Commission of European Communities. Ad Hoc Working Party on Biotechnology/Pharmacy. Control authority batch release of influenza vaccine. III/3775/92-EN.
7. Note for Guidance on Harmonisation of requirements for influenza vaccines (CPMP/BWP/214/96).
8. European Pharmacopoeia 5. edition. Monographs 2.6. Bacterial Endotoxins.
9. D. ACIS 14 novembre 1957. Controllo di Stato sul vaccino antinfluenzale. *Gazzetta Ufficiale* n. 31 del 5 febbraio 1958.
10. DM del 7 aprile 1997. Procedure tecniche per il controllo di Stato per il vaccino antinfluenzale. *Gazzetta Ufficiale* n. 144 del 23 giugno 1997.