



KEYWORDS

Coronavirus, vaccine, Sars-Cov-2, antibodies, Adenovirus, viral vector

Focus sui vaccini Covid 19: facciamo chiarezza

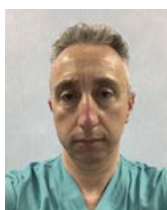
CARATTERISTICHE DEL SARS-COV-2

SARS-CoV-2 è un virus a RNA a singolo filamento, positivo, appartenente al genere dei Betacoronavirus, gruppo che riunisce i coronavirus di rilievo clinico come SARS-CoV, responsabile della Sindrome Respiratoria Acuta Grave, MERS-CoV, responsabile della Sindrome Respiratoria Mediorientale e SARS-CoV-2, responsabile dell'attuale pandemia di COVID-19. Il virione di SARS-CoV-2 ha forma rotondeggiante con diametro di poco superiore ai 100 nanometri e superficie punteggiata da spicole (spike) di glicoproteine sporgenti per circa 20 nanometri dalla membrana di rivestimento (envelope).

IL CICLO DI REPLICAZIONE DEL VIRUS

Conoscere le modalità con cui il virus si riproduce è essenziale per progettare farmaci o vaccini che possono interrompere la propagazione dell'infezione. L'acido nucleico dei Coronavirus è un RNA a singolo filamento, di grosse dimensioni a polarità positiva, il che significa che i ribosomi del citoplasma della

cellula ospite possono tradurre immediatamente il codice nelle sue proteine. Come tutti i virus, anche SARS-CoV-2 sfrutta gli apparati della cellula umana per creare copie di sé stesso. Il suo genoma è quindi per 2/3 della sua lunghezza caratterizzato da geni che codificano per le proteine necessarie alla replicazione e per il restante terzo occupato dai geni codificanti le pro-



Dott. Domenico Cesi

Laureato in Farmacia presso l'Università degli Studi di Perugia, Dirigente Ospedaliero, Specializzato in Farmacologia Oncologica, Docente a contratto presso l'Università degli Studi dell'Aquila, Laurea in Scienze e Tecnologie Erboristiche.
nico.cesi@yahoo.it

teine che costituiscono il virus. Il virus SARS-CoV-2 entra nella cellula umana grazie al legame della proteina S delle spicole presenti sulla sua superficie (spike) col recettore ACE-2 presente nella parte apicale delle cellule epiteliali degli alveoli polmonari, negli enterociti dell'intestino tenue, nelle cellule endoteliali vascolari e nei reni, tutti organi bersaglio nella patogenesi della malattia. Una volta entrato nella cellula umana il virus replica il suo genoma e produce le proteine strutturali con le quali costruire i nuovi virus utilizzando sia proteine codificate nel suo genoma che proteine e altri materiali della cellula ospite.

VACCINI A MRNA

La ricerca di vaccini specifici per il COVID-19 ha portato per la prima volta alla realizzazione di vaccini a mRNA. Questi vaccini non contengono l'agente infettivo, ma solo le istruzioni genetiche per produrre direttamente all'interno delle cellule umane proteine che fungono da antigeni. Nel caso specifico, l'mRNA, prodotto con tecnologie di trascrizione in vitro, veicola la parte di genoma necessaria per la produzione della proteina S da parte delle cellule umane. Come si è visto, la proteina S virale può esistere in due configurazioni: una di pre-fusione, instabile, e una di post-fusione stabile. La prima è quella più immunogena ma, nelle preparazioni ricombinanti, tende ad assumere la seconda conformazione. Per questa ragione, l'mRNA utilizzato nei diversi vaccini è modificato in modo da produrre proteina S contenente molecole di prolina in due precise posizioni della molecola, che ne stabilizzano la conformazione. Nei vaccini attualmente in commercio, l'mRNA è racchiuso all'interno di nanoparticelle di liposomi (LNP) che consentono il passaggio del filamento di mRNA attraverso le membrane cellulari per endocitosi.

Gli LNP sono spesso costituiti da quattro componenti:

- Un lipide cationico ionizzabile, che promuove l'autoassemblaggio in particelle delle dimensioni del virus (~ 100 nm) e consente il rilascio del mRNA;
- Polietilenglicole (PEG) legato ai lipidi, che aumenta l'emivita delle formulazioni;
- Colesterolo, che funziona da agente stabilizzante;
- Fosfolipidi, che sostengono la struttura del doppio strato lipidico.

Fatto molto importante: l'mRNA rilasciato nel citoplasma non è in grado di attraversare la membrana nucleare e non è possibile la sua fusione/integrazione con il DNA cellulare.

VACCINI A DNA

I vaccini a DNA sono prodotti a partire da plasmidi batterici purificati. Il plasmide batterico funziona come un veicolo per introdurre il gene codificante per l'antigene di interesse. In linea generale, questi vaccini possono essere somministrati per via intramuscolare, intradermica e sottocutanea. A differenza dei vaccini a mRNA, dopo l'ingresso nella cellula umana il plasmide deve attraversare la membrana nucleare. Il DNA del plasmide trascrive l'mRNA per la proteina S, che attraversa nuovamente la membrana per andare a produrre la proteina stessa all'interno del citoplasma. Attualmente non esistono vaccini a DNA autorizzati per l'impiego nell'uomo, mentre ne sono stati approvati quattro per uso veterinario. Uno studio preclinico sui primati ha dimostrato che la somministrazione di un vaccino a DNA codificante per il gene della proteina S del virus SARS-CoV-2 provoca risposte immunitarie umorali e cellulari e che i titoli degli anticorpi neutralizzanti

indotti consentono un'efficace protezione dall'infezione.

L'impiego di vaccini a DNA ha sollevato il timore che il plasmide possa integrarsi in modo stabile nel DNA dell'ospite e che possano svilupparsi anticorpi anti-DNA e reazioni autoimmunitarie. Per quanto è noto, i rischi di integrazione del plasmide sono ritenuti molto inferiori a quelli delle mutazioni random naturali. Inoltre, gli studi sulla distribuzione del vaccino dopo somministrazione intramuscolare dimostrano che i plasmidi rimangono localizzati al sito di iniezione e sono rapidamente degradati da enzimi endogeni (nucleasi) dopo pochi minuti, riducendo ulteriormente il rischio di integrazione. Anche per quanto riguarda la formazione di anticorpi anti-DNA, gli studi condotti su modelli animali non hanno dimostrato una connessione tra la somministrazione di plasmidi e risposte autoimmuni. Anche questo tipo di vaccino non può provocare infezione da SARS-CoV-2.

VACCINI A DNA NON REPLICANTI

Un virus vettore largamente impiegato è l'adenovirus, di cui si conoscono almeno 50 diversi sierotipi che infettano l'uomo. Le infezioni possono provocare disturbi respiratori acuti, faringiti, congiuntiviti e gastroenteriti, ma i virus utilizzati come vettori sono non replicanti e non possono causare infezioni. Gli adenovirus hanno un genoma di DNA lineare a doppia elica e infettano molte specie animali. I recettori adenovirali sono espressi sulla superficie della maggior parte delle cellule umane, consentendo un ampio tropismo tissutale del virus. Caratteristica di questo virus è che può essere facilmente coltivato in linee cellulari umane o animali (scimmia, cavia, insetti) per produrre grandi quantità di virus. Può inoltre essere modificato, riducendone o annullandone completamente la capacità di replicarsi.

Sino ad ora sono stati impiegati il sierotipo 5 (Ad5) e 26 (Ad26) dell'adenovirus umano e adenovirus dello scimpanzé, completamente inattivati e quindi non infettivi. Una volta iniettato, il vettore virale entra nella cellula ospite e attraversa la membrana nucleare. Qui il suo DNA viene trascritto nell'mRNA del gene codificante per la proteina S, che passa nel citoplasma e viene tradotta nella proteina S.

L'Università di Oxford ha utilizzato l'esperienza acquisita nello sviluppo di un vaccino per MERS-CoV e l'ha applicata a SARS-CoV-2. Questo approccio utilizza un vettore modificato dell'adenovirus Oxford 1 (ChAdOx1) dello scimpanzé per produrre la proteina spike di SARS-CoV-2. ChAdOx1 è un virus carente di replicazione che causa un comune raffreddore negli scimpanzé, diminuendo così la preoccupazione per la preesistente immunità umana al vettore virale. Il vaccino sviluppato industrialmente da AstraZeneca è il primo vaccino di questo tipo di cui siano stati pubblicati i risultati preliminari della fase 3. Un vaccino a vettore ricombinante dell'Adenovirus tipo 26 (rAd26) e un vettore ricombinante dell'Adenovirus di tipo 5 (rAd5) entrambi "caricati" con il gene della proteina S sono utilizzati dalla russa Gamaleya.

Questa vaccinazione eterologa ha dimostrato un buon profilo di sicurezza e lo sviluppo di una forte risposta anticorpale. La precedente risposta immunitaria agli adenovirus non ha influenzato i titoli degli anticorpi specifici. Un altro vaccino a vettore virale non replicante che utilizza l'Adenovirus sierotipo 26 ha terminando la fase 3 di sperimentazione e i risultati attesi per fine gennaio 2021 hanno avviato l'immissione in commercio (Vaccino Janssen/Johnson & Johnson).



VACCINI A VETTORE VIRALE REPLICANTI

I vaccini a vettori virali replicanti sono basati su un virus vivo attenuato (il vettore) che esprime antigeni eterologhi. Sono caratterizzati dalla combinazione della forte immunogenicità dei vaccini vivi attenuati e della sicurezza dei vaccini a subunità. Come virus vettori si utilizzano virus che già vengono utilizzati in forma attenuata in vaccini commerciali, come ad esempio i virus della febbre gialla, del morbillo o dell'influenza.

Ad esempio, il virus della febbre gialla YF17D vivo attenuato ha una elevata capacità di indurre rapidamente un'ampia risposta immunitaria innata, umorale e cellulo-mediata. Questa proprietà viene mantenuta anche quando si inseriscono nel suo genoma geni di altri virus (es. virus dell'encefalite giapponese e virus Dengue). Un vaccino sperimentale con questo vettore e nel cui genoma è inserito il gene per la proteina S diretto contro il SARS-CoV2 è attualmente in fase di studio pre-clinica.

A differenza di vaccini a base di acidi nucleici o a vettori virali, dove la produzione della proteina S avviene nella cellula umana e garantisce la giusta conformazione della proteina, il processo di produzione in cellule di procarioti potrebbe portare a proteine S con una conformazione impropria degli epitopi. Per evitare questo problema sono in fase di sviluppo vaccini ricombinanti con proteina S nella forma trimérica, simile a quella nativa, prodotta in colture cellulari di mammifero, che forniscono proteine con la corretta conformazione. In generale, questo tipo di vaccino è più facile da produrre, ma le proteine o i peptidi isolati sono scarsamente immunogenici e provocano una scarsa attivazione dei linfociti T CD8+. Generalmente richiedono una somministrazione ripetuta e l'impiego di un adiuvante, il che li rende inadatti per la vaccinazione della mucosa respiratoria. I vaccini a subunità in fase di sviluppo da GlaxoSmithKline e Novavax utilizzano come adiuvanti rispettivamente AS0311 e Matrix-M12, privi di alluminio.

CONSIDERAZIONI FINALI

Al momento si hanno a disposizione tre vaccini approvati per l'impiego in vari paesi occidentali e un vaccino sviluppato in Russia in base ai risultati degli studi di Fase 3. Non essendo questi studi ancora conclusi, sono state concesse autorizzazioni per l'impiego "condizionali" (EMA) o in condizioni di "emergenza" (FDA). Due vaccini utilizzano la tecnologia del mRNA (vaccino della ditta Pfizer-BioNTech e vaccino della ditta Moderna) e due vaccini con tecnologia a vettori virali non replicanti (vaccino della ditta AstraZeneca-Università di Oxford e vaccino Gamaleya Research Institute - Ministero della Sanità Russo dove i vettori virali sono costituiti da adenovirus. Questi due ultimi vaccini si differenziano però per la soluzione adottata per superare il rischio di una riduzione di efficacia dovuta alla presenza, in molte persone, di anticorpi diretti anti-adenovirus: il vaccino AstraZeneca-Università di Oxford impiega un virus vettore animale (adenovirus da scimpanzé) mentre il vaccino Gamaleya utilizza due diversi tipi di adenovirus umani (Ad26 per la prima dose di vaccino e Ad5 per il richiamo). In tutti e tre gli studi l'efficacia dimostrata dai vaccini è risultata superiore al 30% nel proteggere dalla malattia secondo quanto richiesto dalle Agenzie sanitarie, mentre ancora incerta è la protezione dall'infezione asintomatica.

Sotto questo aspetto, l'unico studio che fornisce dati preliminari è quello relativo al vaccino AstraZeneca-Università di Oxford. Un'anomalia verificatasi nel corso della sperimentazione di questo vaccino lascia una forte incertezza sull'entità dell'efficacia, che è risultata variabile fra il 62-90%, contro un'efficacia > del 90% degli altri tre vaccini. Se il dato del 90% sarà confermato anche per il vaccino AstraZeneca-Università di Oxford, il vaccino potrà essere considerato sostanzialmente equiparabile agli altri tre, con il vantaggio di utilizzare una dose dimezzata al primo inoculo, aumentando così il numero delle persone che potranno essere vaccinate nel mondo. Una differenza che ha contribuito a determinare il ritardo del rilascio dell'autorizzazione alla commercializzazione del vaccino AstraZeneca-Università di Oxford è il minor numero di vaccinati nel gruppo di età >55 anni. Da questo punto di vista, i due vaccini a mRNA sono quelli che hanno la sperimentazione più solida nelle persone di età > 55 anni. In generale, il numero di persone vaccinate e di cui si conoscono gli esiti di efficacia è minore per il vaccino AstraZeneca-Università di Oxford, il cui protocollo sperimentale è stato modificato diverse volte in corso d'opera. I quattro vaccini hanno utilizzato tempistiche diverse per quanto riguarda la somministrazione della seconda dose e

per la rilevazione dei soggetti COVID-positivi dopo la seconda dose del vaccino: 21 giorni e 7 giorni per il vaccino Pfizer-BioNTech; 28 giorni e 14 giorni per il vaccino Moderna e il vaccino AstraZeneca-Università di Oxford e, infine, 21 giorni e zero giorni per il vaccino Gamaleya. Quest'ultimo vaccino potrebbe, teoricamente, aver risentito maggiormente degli effetti di una immunità non ancora completamente sviluppata, ma il dato sperimentale dimostra un'efficacia assolutamente comparabile a quella degli altri vaccini. L'immunità dopo la prima somministrazione dei vaccini comincia a svilupparsi in modo sensibile dopo 12-18 giorni. Solo nella sperimentazione del vaccino AstraZeneca-Università di Oxford si sono verificati casi di somministrazione della seconda dose fino a 12 settimane dalla prima, ma i dati di efficacia non sarebbero diversi da quelli che hanno maggiormente rispettato i tempi previsti dal protocollo. Probabilmente è sulla base di questo "incidente di percorso" che negli UK è stato proposto di allungare a 12 settimane il periodo intercorrente tra le due somministrazioni e assicurare così una prima protezione ad un maggior numero di persone. I quattro vaccini non hanno presentato sino ad ora differenze sostanziali nella sicurezza, per quanto riguarda tipologia e gravità delle reazioni avverse.



Seppur molto frequenti, le reazioni locali e sistemiche che compaiono subito dopo le somministrazioni del vaccino sono per la maggior parte lievi-moderate e di breve durata. Reazioni anafilattiche sono state segnalate dopo la conclusione degli studi di fase 3 per i vaccini a mRNA, ma non per quello a vettore virale AstraZeneca-Università di Oxford; tuttavia la presenza di derivati di PEG anche nella formulazione di questo vaccino potrebbe fare emergere casi di anafilassi con il procedere delle campagne vaccinali. Non è noto, al momento,

se il vaccino russo contenga PEG o polisorbati. Tutti i vaccini hanno escluso dalla sperimentazione le donne in gravidanza, in allattamento e i bambini/ragazzi. La differenza del limite inferiore di età dei soggetti vaccinati 16 anni per il vaccino Pfizer-BioNTech o 18 anni per gli altri due vaccini potrebbe in teoria influire sulla preferenza per il primo per indurre una immunità più precoce nella popolazione scolastica. Tuttavia, è possibile che prima che vi sia la disponibilità di vaccino per tutti, siano disponibili nuovi dati anche per gli altri due vaccini. Al momen-

to, una differenza importante tra i quattro vaccini sono le diverse condizioni di stabilità che obbligano ad una distribuzione e conservazione del vaccino Pfizer-BioNTech decisamente svantaggiosa (-75°C) rispetto al vaccino Moderna (-20°) e ancor più rispetto al vaccino

AstraZeneca-Università di Oxford e al vaccino liofilizzato Gamaleya (+2-+8°C). Anche in questo caso non si può escludere che vi possano essere miglioramenti nella stabilità di uno o più vaccini nel prossimo futuro.

ABSTRACT

Characteristics of the SARS-CoV-2, SARS-CoV-2 is a positive single-stranded RNA virus belonging to the Betacoronavirus genus, a group that brings together clinically relevant coronaviruses such as SARS-CoV, responsible for Severe Acute Respiratory Syndrome, MERS-CoV, responsible for Respiratory Syndrome

Middle Eastern and SARS-CoV-2, responsible for the current COVID-19 pandemic. The SARS-CoV-2 virion has a rounded shape with a diameter of just over 100 nanometers and a surface dotted with spicules of glycoproteins protruding about 20 nanometers from the envelope.

BIBLIOGRAFIA

La bibliografia relativa a vaccini e vaccinazioni è molto vasta e l'indicazione puntuale delle varie referenze sarebbe stata piuttosto complicata, poiché spesso una referenza affronta più aspetti del tema oggetto di questo contributo. Ho scelto quindi di riportare solo link che possono essere utili e documenti di riferimento.

1. www.salute.gov.it/portale/vaccinazioni/homeVaccinazioni.jsp
2. www.epicentro.iss.it/temi/vaccinazioni
3. www.aifa.gov.it/vaccini
4. www.aifa.gov.it/web/guest/-/rapporto-vaccini-2019
5. www.vaccinarsi.org/
6. www.levaccinazioni.it/
7. Quaderni del Ministero della Salute. Vaccinazioni: stato dell'arte, falsi miti e prospettive. Il ruolo chiave della prevenzione. Marzo 2017 Istituto Superiore di Sanità. Guida alle controindicazioni alle vaccinazioni. A cura di Giovanni Gallo, Rosanna Mel e Maria Cristina Rota. Rapporti ISTISAN 09/13
8. Crooke, S. N., Ovsyannikova, I. G., Poland, G. A. & Kennedy, R. B. Immunosenescence and human vaccine immune responses. *Immun. Ageing* 16, 25 (2019).
9. Pawelec G. Age and immunity: what is "immunosenescence"? *Exp Gerontol.* 105, 4–9 (2018).
10. Pineda, D., & Myers, M. G.: Finding reliable information about vaccines. *Pediatrics*, 127 Suppl 1, S134 (2011).
11. Plotkin, S. A. Updates on immunologic correlates of vaccine-induced protection. *Vaccine* 2014; 8: 2250–2257.
12. Pollard AJ et al. A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nat Rev Immunology* 2021; 21: 83–100 <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00479-7>
13. Pollard, A. J., Finn, A. & Curtis, N. Non-specific effects of vaccines: plausible and potentially important, but implications uncertain. *Arch. Dis. Child.* 102, 1077–1081 (2017).
14. World Health Organization. Child mortality and causes of death. WHO (2020).