

La coltura cellulare: una piattaforma innovativa per i vaccini antinfluenzali più efficaci

Silvia Cocchio, Vincenzo Baldo

Dipartimento di Scienze Cardio-Toraco-Vascolari e Sanità Pubblica, Università di Padova

Riassunto. Rispetto alla tradizionale crescita nelle uova, la produzione di vaccini mediante coltura cellulare rappresenta un'innovazione che riduce la possibile insorgenza di mutazioni dovute all'adattamento dei ceppi vaccinali durante la crescita nelle uova (*egg-adaptive*). Tali mutazioni sono particolarmente rilevanti per il ceppo H3N2. I dati di letteratura indicano come i vaccini antinfluenzali ottenuti mediante coltura cellulare presentino un ottimo profilo di immunogenicità e di sicurezza. I primi risultati del loro utilizzo hanno inoltre evidenziato, in relazione al ceppo circolante, una buona efficacia sul campo. Da considerare inoltre l'efficienza produttiva della nuova piattaforma, sia in termini virologici che logistico-organizzativi.

Introduzione

In Italia, l'influenza rimane ancora la terza causa di morte per malattie infettive. In Europa, nonostante la disponibilità di vaccini sicuri ed efficaci, si colloca al primo posto in termini di impatto socio-economico¹.

I virus influenzali sono virus a RNA, appartenenti alla famiglia degli *Orthomyxoviridae*; in relazione alla nucleoproteina e alla proteina della matrice, vengono classificati in tre tipi (A, B e C). I virus di tipo A e B possono causare le epidemie stagionali, mentre il tipo C raramente colpisce l'uomo e probabilmente il maggiore numero di casi si presenta in modo subclinico. Sulla base di due glicoproteine di superficie, l'emoagglutinina (H) e la neuraminidasi (N), il virus di tipo A si suddivide ulteriormente in sottotipi. Ad oggi, sono noti 18 sottotipi di emoagglutinina (H1-H18) e 11 sottotipi di neuraminidasi (N1-N11). Tuttavia, negli ultimi anni i ceppi appartenenti a H1N1 pandemico (H1N1pdm09) e H3N2 dominano la scena epidemiologica mondiale. Il virus del tipo B si classifica invece in due *lineage*, Victoria e Yamagata².

Una caratteristica epidemiologica importante dei virus influenzali è la loro capacità di "cambiare". Mutazioni puntiformi danno origine a varianti antigeniche minori (*antigenic drift*), rappresentano un evento frequente e sono responsabili delle epidemie stagionali. Invece, importanti

riarrangiamenti genetici tra virus umani e animali (*antigenic shift*) danno origine a nuovi sottotipi virali che possono dare luogo a forme influenzali pandemiche; tale fenomeno è esclusivo per i virus di tipo A². È importante sottolineare che rispetto ai ceppi H1N1 e B, quelli appartenenti all'H3N2 possono più frequentemente mutare², inoltre i dati evidenziano come in Italia, durante le stagioni dominate dalla circolazione del ceppo H3N2, vi sia un eccesso di mortalità 3-4 volte superiore rispetto a quella registrata nelle stagioni in cui circolano i ceppi H1N1 o B³. La maggior parte dei vaccini antinfluenzali, compresi tutti quelli attualmente disponibili in Italia, sono inattivati e prodotti nelle uova embrionate di pollo. Essi hanno dimostrato il loro grande valore nel ridurre l'impatto delle epidemie stagionali, tuttavia presentano ancora alcuni importanti limiti che rendono necessaria una continua ricerca di vaccini sempre più efficaci.

Il presente lavoro ha come obiettivo quello di sintetizzare i principali limiti correlati alla produzione e all'efficacia dei vaccini anti-influenzali ("tradizionali") valutando le possibili soluzioni a disposizione al fine di fornire uno strumento utile ai decisori Regionali e Nazionali. Inoltre ne viene analizzato il processo di produzione su coltura cellulare e riportati i primi risultati di efficacia sul campo.

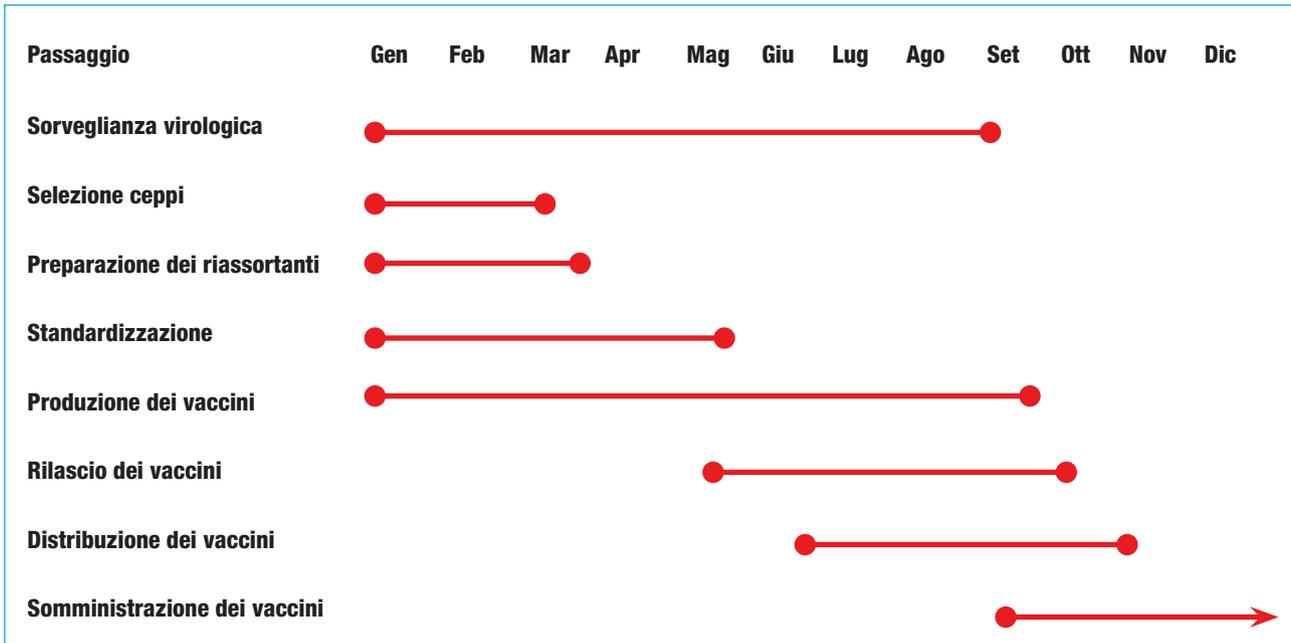
Il processo "tradizionale": le uova e la produzione dei vaccini antinfluenzali

Il processo produttivo *tradizionale* dei vaccini antinfluenzali presenta alcune caratteristiche peculiari: la stagionalità, ovvero la necessità di un annuale aggiornamento della composizione basata sui dati di sorveglianza e il coinvolgimento di diversi attori, dagli esperti dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ai produttori dei vaccini^{4,5}. La Figura 1 riporta le fasi del processo produttivo "tradizionale".

Il processo inizia con un'analisi genetica e antigenica dei ceppi che circolano sia nella popolazione umana sia in quella animale (specialmente quella aviaria e suina) eseguita dalla rete di **sorveglianza** dell'OMS. Successivamente, questi dati vengono analizzati dai centri collaborativi dell'OMS (in febbraio per l'emisfero nord e in settembre per quello sud) permettendo agli esperti dell'OMS di **selezionare** quali ceppi debbano essere utilizzati per la produzione dei vaccini stagionali. Un limite importante, che riguarda soprattutto i ceppi H1N1 e H3N2, è rappresentato dalla scarsa capacità di isolamento e di crescita nelle uova degli stessi ceppi; per questo motivo, vengono sottoposti ad un processo di **riassortimento genetico** con i ceppi *master* (particolari virus influenzali che ne migliorano la capacità replicativa nelle uova embrionate)⁵. Una volta stabilita la somiglianza dei ceppi

FIGURA 1.

Il ciclo annuale della produzione dei vaccini antinfluenzali stagionali (da Fiore et al., 2013, mod.)⁴.



selezionati a quelli circolanti, l'OMS invia i ceppi candidati "verosimilmente adatti" ai produttori dei vaccini. Da questo momento, i produttori dei vaccini hanno circa 6 mesi per sviluppare e consegnare i loro prodotti alle Aziende Sanitarie. La previsione da parte dell'OMS dei ceppi che circoleranno, anticipa di diversi mesi l'arrivo della stagione influenzale; è quindi essenziale che ogni passaggio sia regolamentato dalle Agenzie nazionali e sovranazionali^{4,5}.

Le problematiche del processo produttivo "tradizionale" (su uova)

Sebbene il processo produttivo "tradizionale" sia affidabile e ben standardizzato, esso presenta alcune limiti intrinseci:⁶

1. **la dipendenza dalla fornitura delle uova embrionate:** necessità di reperire la materia prima (ovvero milioni di uova embrionate) con sufficiente anticipo. In alcune situazioni, come in caso di epidemie di influenza aviaria nel pollame, la disponibilità di uova embrionate può essere insufficiente;
2. **la bassa flessibilità:** le uova devono essere ordinate dal produttore diversi mesi prima. In caso di pandemia, l'improvvisa e urgente richiesta di vaccini

3. **la frequente impossibilità di isolare il virus nelle uova embrionate:** negli ultimi anni, la possibilità di isolare i ceppi influenzali (soprattutto il ceppo H3N2) è peggiorata. Di conseguenza, essendo diminuito il numero di ceppi candidati ad essere inclusi nei vaccini, si riduce la probabilità di effettuare "la scelta migliore";
4. **le mutazioni egg-adaptive:** l'alterazione della struttura del ceppo vaccinale durante i passaggi seriali di crescita nelle uova. Tali mutazioni adattative ne riducono l'efficacia vaccinale, in particolare modo per il ceppo H3N2, in relazione alle caratteristiche virologiche.

Evidenze delle mutazioni egg-adaptive e riduzione dell'efficacia dei vaccini non adiuvati

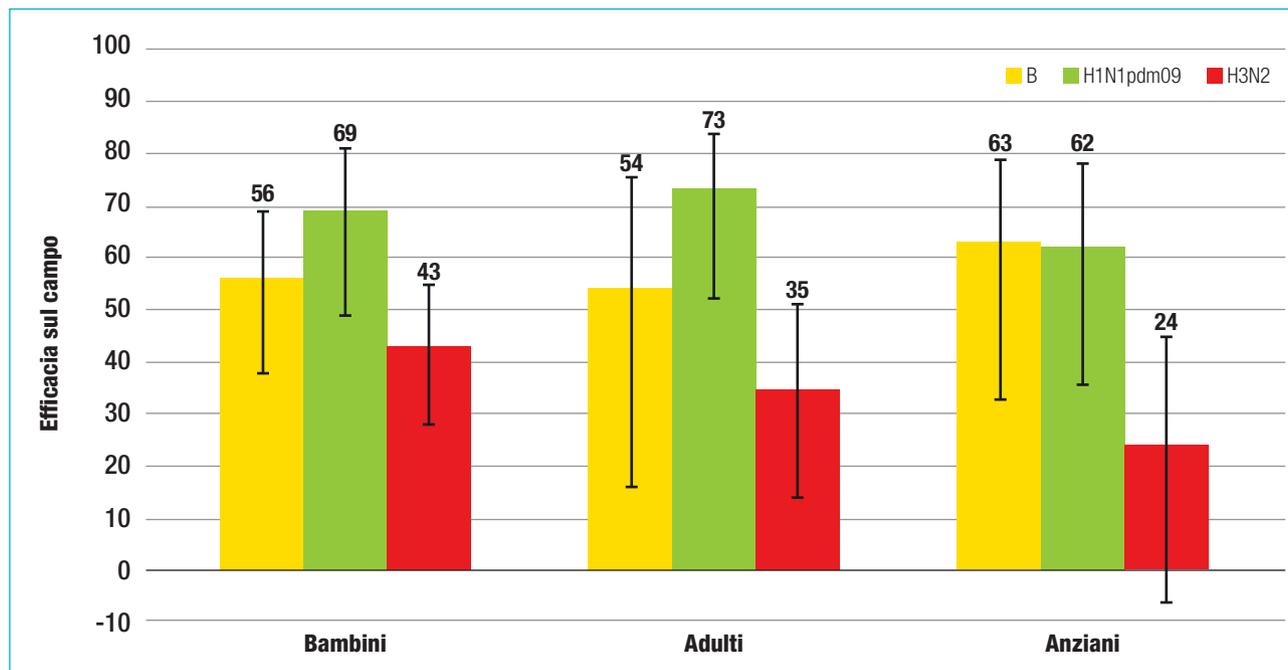
Per la sua importanza in termini di Sanità Pubblica, l'impatto delle mutazioni egg-adaptive sull'efficacia dei vaccini non adiuvati, è stato oggetto di studio da parte del mondo scientifico. Negli ultimi dieci anni, sono stati condotti diversi studi che

hanno evidenziato una **bassa efficacia sul campo dei vaccini influenzali non adiuvati contro il virus H3N2**. I risultati di una recente meta-analisi⁷ che ha preso in considerazione 56 studi, hanno evidenziato, negli adulti, un'efficacia dei vaccini non adiuvati del 54% per il ceppo B, del 73% per l'H1N1 pandemico; per il ceppo H3N2 invece è stata rilevata un'efficacia significativamente inferiore per tutte le fasce di età (Fig. 2).

L'efficacia vaccinale dipende dal grado di *match* e/o *mismatch* tra i ceppi circolanti e quelli vaccinali, ossia dal grado di sovrapposizione a livello antigenico e/o genetico dei ceppi influenzali. Differenze nella struttura degli stessi sono determinate dal *drift* antigenico⁸. La **bassa efficacia vaccinale nei confronti del virus H3N2** che si è verificata durante la stagione 2012-2013, è stata **imputata al processo produttivo dei vaccini stessi** e non al *drift* "naturale"⁸. Questo significa che, *il ceppo originariamente isolato nell'uomo e successivamente raccomandato ad essere incluso nella preparazione del vaccino, si è adattato per sopravvivere in una classe di vertebrati completamente diversa, cioè nell'uovo di pollo (mutazioni egg-adaptive)*. Durante i passaggi seriali del virus umano nelle uova, il ceppo candidato va incontro

FIGURA 2.

Efficacia sul campo dei vaccini antinfluenzali stagionali non adiuvati, per ceppo e classe di età (da Belongia et al., 2016, mod.)⁷.



a mutazioni che ne migliorano la capacità di “adattarsi” alle cellule del pollo. Si tratta di semplici **sostituzioni amminoacidiche ubicate in aree vicine al sito di legame al recettore dell’emoagglutinina che rappresenta il bersaglio principale degli anticorpi neutralizzanti il virus**. Le mutazioni *egg-adaptive* determinano una minore avidità degli anticorpi e possono di conseguenza compromettere l’efficacia dei vaccini⁸⁻¹¹.

Nello specifico, durante la stagione 2012-2013⁸, nonostante il ceppo vaccinale H3N2 avesse mostrato solo tre mutazioni rispetto al ceppo raccomandato dall’OMS, l’efficacia vaccinale è risultata comunque bassa.

La stagione influenzale 2016-2017, caratterizzata dalla predominante circolazione del ceppo H3N2, ha confermato la ridotta efficacia dei vaccini non adiuvati, indotta dalle mutazioni *egg-adaptive*; questo ha indotto la ricerca di piattaforme alternative⁹.

Infine, anche nella stagione 2017/18 l’efficacia vaccinale contro l’H3N2 è stata particolarmente bassa nei diversi Paesi, tra cui gli Stati Uniti, in cui è stata predominante la circolazione del ceppo H3N2. Le analisi **non hanno evidenziato un drift “naturale”**, questo significa che il ceppo H3N2 sele-

zionato dagli esperti dell’OMS era congruo rispetto al ceppo circolante. Più di un terzo dei ceppi H3N2 isolati è risultato antigenicamente diverso dal ceppo di riferimento utilizzato per la produzione dei vaccini “tradizionali” confermando l’importante impatto che le mutazioni *egg-adaptive* hanno avuto sull’efficacia vaccinale¹¹.

Quali sono le strategie vaccinali attualmente disponibili in Italia in grado di ridurre l’impatto negativo del mismatch?

Per la stagione 2017-2018, in Italia, sono disponibili tre tipologie di vaccini: il vaccino trivalente, il vaccino trivalente adiuvato e il vaccino quadrivalente¹².

Diversi studi hanno dimostrato che il vaccino adiuvato, grazie all’azione dell’adiuvante MF59[®], è in grado di indurre una maggiore risposta immune verso i ceppi “driftati”. Tale vantaggio si rivela particolarmente utile verso i ceppi H3N2 che mutano più frequentemente ma anche verso i ceppi appartenenti ai diversi *lineage* del virus B. In altre parole, **il vaccino adiuvato che è attualmente indicato per gli over 65, è**

potenzialmente in grado di offrire una maggiore protezione verso i ceppi circolanti che differiscono da quelli inclusi nel vaccino¹³.

Per quanto attiene i vaccini quadrivalenti, essi includono entrambi i *lineage* del ceppo B offrendo pertanto una protezione più ampia esclusivamente per il ceppo B¹². Il vantaggio delle formulazioni quadrivalenti **si mostra particolarmente evidente nelle fasce di età giovani**, soprattutto in quella 5-14 anni, dove è più frequente la circolazione del virus B, come risulta dai dati di sorveglianza del lungo periodo¹⁴.

Le raccomandazioni della Circolare Ministeriale per la prevenzione dell’influenza nella stagione 2018-2019 confermano tali indicazioni¹². In particolare, il vaccino adiuvato è preferibilmente indicato per la popolazione con età ≥ 75 anni (“*dato il peso della malattia influenzale da virus A/H3N2... e l’evidenza di una migliore efficacia in questo gruppo di età*”). Il vaccino quadrivalente è invece preferibile per le fasce di età più giovani (“*considerato l’impatto della malattia influenzale... e il potenziale di mismatch tra il ceppo circolante predominante dell’influenza B e il ceppo presente nel vaccino trivalente*”).

Va sottolineato come, indipendentemente

TABELLA I.

Confronto tra i vaccini prodotti su uova e su coltura cellulare ^{6 11}.

Caratteristica	Vaccini prodotti su uova	Vaccini prodotti in coltura cellulare
Disponibilità di “materie prime”	Generalmente sufficiente, tuttavia esiste il rischio che la produzione dei vaccini non sia soddisfatta in tempi brevi	Materiale prontamente disponibile, essendo la coltura cellulare continua
Disponibilità dei ceppi vaccinali “candidati” da includere nel vaccino	In numero spesso non congruo a garantire “ <i>la scelta migliore</i> ”	In numero congruo tale da permettere “ <i>la scelta migliore</i> ”
Rischio di mutazioni <i>egg-adaptive</i> con la conseguente riduzione dell’efficacia vaccinale	Alto (soprattutto per il ceppo H3N2)	Assente
Processo produttivo	Altamente standardizzato; alcuni passaggi sono a rischio di contaminazione batterica; richiesto l’uso di antibiotici	Altamente standardizzato; il processo produttivo avviene nei bioreattori a sistema chiuso; non contiene alcuna traccia di antibiotici

dal ceppo circolante, tutti e tre i tipi di vaccini disponibili, sono prodotti mediante la tecnica tradizionale (uova) e pertanto persiste il problema delle mutazioni *egg-adaptive*.

La coltura cellulare: piattaforma innovativa che può superare le problematiche dovute alle mutazioni *egg-adaptive*

La coltura cellulare rappresenta una **piattaforma alternativa** rispetto alla tecnologia tradizionale che utilizza cellule di mammifero, superando il limite della dipendenza della fornitura di milioni di uova embrionate. Gli ulteriori vantaggi della produzione su coltura cellulare consistono nel ridotto rischio di contaminazione, nell’assenza di possibili tracce di componenti delle uova e nella non necessità di dovere ricorrere all’impiego di antibiotici. Il processo produttivo è più efficiente e ciò si traduce in una resa migliore, con cicli produttivi più rapidi e tempi di consegna prevedibilmente più brevi ⁶ (Tab. I).

Il processo di produzione basato sulla coltura cellulare è noto da tempo; tuttavia, negli ultimi anni, sono stati effettuati importanti progressi. I primi vaccini sviluppati su coltura cellulare prevedevano ceppi “candidati” che venivano isolati nelle uova e quindi persisteva il problema legato alle mutazioni *egg-adaptive*. Nella stagione 2012-2013, in considerazione alla maggiore diversità antigenica dei ceppi candidati vaccinali cresciuti nelle uova rispetto a quelli replicati in coltura cellulare, l’OMS ¹⁵

ha avviato il processo di cambiamento. A partire dal 2017, per la selezione dei ceppi candidati H3N2, B/Victoria e B/Yamagata, l’OMS raccomanda come processo produttivo non solo quello “tradizionale” ma anche quello che prevede la coltura cellulare. Tale cambiamento è di enorme importanza in quanto elimina ogni possibilità di mutazioni *egg-adaptive*, avviando la possibilità di un processo “*egg-free*” ¹⁶.

Il vaccino quadrivalente su coltura cellulare (QIVc)

Il QIVc viene prodotto nella coltura cellulare MDCK ed è stato per la prima volta autorizzato negli Stati Uniti nel 2016 ¹¹ e, negli studi clinici di fase III che hanno coinvolto diverse migliaia di bambini, adulti e anziani, si è dimostrato **altamente immunogeno e sicuro** ^{17 18}. Attualmente QIVc utilizza il ceppo H3N2 prodotto con processo *egg-free* di conseguenza questo elimina ogni possibilità di mutazioni *egg-adaptive* ¹¹.

Un recente studio condotto negli USA che ha coinvolto più di 13 milioni di soggetti over65 ha dimostrato come l’efficacia del QIVc sia circa il 10% superiore nel prevenire le ospedalizzazioni per influenza/polmonite rispetto ai vaccini quadrivalenti coltivati su uova; questo si traduce in un vantaggio importante in termini di Sanità Pubblica ¹⁹. L’*European Medicines Agency (EMA)* ha espresso il parere positivo per l’utilizzo del QIVc a partire dai 9 anni di età ²⁰ ed è attesa la commercializzazione in Italia per la prossima stagione 2019-2020.

Conclusioni

L’efficacia subottimale dei vaccini antinfluenzali attualmente disponibili, specialmente contro i ceppi appartenenti al sottotipo H3N2, è sovente dovuta al *mismatch* antigenico tra i ceppi circolanti e quelli vaccinali. Tale fenomeno è riconducibile a: (i) *drift* antigenico “naturale”, (ii) selezione inaccurata dell’antigene vaccinale; (iii) impossibilità di generare i virus candidati da includere nei vaccini e (iv) mutazioni dovute all’adattamento del virus alle uova (mutazioni *egg-adaptive*). L’evoluzione scientifica non ha ancora permesso di allestire un **vaccino universale** che permetta il superamento della problematica correlata al *drift* antigenico naturale ma ha permesso **sostanziali miglioramenti nella selezione dei ceppi “candidati”**. I vaccini prodotti su coltura cellulare permettono di generare un maggior numero di candidati qualitativamente validi e di superare le problematiche correlate alle mutazioni *egg-adaptive*.

Da considerare inoltre il miglioramento dell’efficienza produttiva, sia in termini virologici (replicazione virale) che in termini logistici (maggiore velocità di produzione e di approvvigionamento). Tale metodologia può costituire pertanto una solida piattaforma tecnologica per la produzione di vaccini contro una patologia sfuggente quale è l’influenza.

Bibliografia

- Cassini A, Colzani E, Pini A, et al. *Impact of infectious diseases on population health using incidence-based disability-adjusted life years (DALYs): results from the Burden*

- of Communicable Diseases in Europe study, European Union and European Economic Area countries, 2009 to 2013. *Euro Surveill* 2018;23.
- 2 Petrova VN, Russell CA. *The evolution of seasonal influenza viruses*. *Nat Rev Microbiol* 2017;16:47-60.
 - 3 Rizzo C, Viboud C, Montomoli E, et al. *Influenza-related mortality in the Italian elderly: no decline associated with increasing vaccination coverage*. *Vaccine*.2006;24:6468-75.
 - 4 Fiore AE, Katz JM, Levandowsky RA, et al. *Inactivated influenza vaccines*. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA, eds. *Vaccines*. 6th ed. Elsevier 2013.
 - 5 Gerdil C. *The annual production cycle for influenza vaccine*. *Vaccine* 2003;21:1776-9.
 - 6 Manini I, Domnich A, Amicizia D, et al. *Flucelvax (Optaflu) for seasonal influenza*. *Expert Rev Vaccines* 2015;14:789-804.
 - 7 Belongia EA, Simpson MD, King JP, et al. *Variable influenza vaccine effectiveness by subtype: a systematic review and meta-analysis of test-negative design studies*. *Lancet Infect Dis* 2016;16:942-51.
 - 8 Skowronski DM, Janjua NZ, De Serres G, et al. *Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses*. *Plos One* 2014;9:e92153.
 - 9 Zost SJ, Parkhouse K, Gumina ME, et al. *Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114:12578-83.
 - 10 Wu NC, Zost SJ, Thompson AJ, et al. *A structural explanation for the low effectiveness of the seasonal influenza H3N2 vaccine*. *PLOS Pathog* 2017;13:e1006682.
 - 11 Barr IG, Donis RO, Katz JM, et al. *Cell culture-derived influenza vaccines in the severe 2017-2018 epidemic season: a step towards improved influenza vaccine effectiveness*. *NPJ Vaccines* 2018;3:44.
 - 12 Ministero della Salute. *Prevenzione e controllo dell'influenza: raccomandazioni per la stagione 2018-2019*. Disponibile su: <http://www.trovanorme.salute.gov.it/norme/renderNormsanPdf?anno=2018&codLeg=64381&parte=1%20&serie=null>.
 - 13 Di Pietro ML, Poscia A, Specchia ML, et al. *Valutazione di Health Technology (HTA) del vaccino antinfluenzale adiuvato nella popolazione anziana italiana*. *QJPH* 2017;6(9). Disponibile su: <https://www.ijph.it/pdf/2017-v6-n9.pdf>.
 - 14 Caini S, Spreuuenberg P, Kuszniierz GF, et al. *Distribution of influenza virus types by age using case-based global surveillance data from twenty-nine countries, 1999-2014*. *BMC Infect Dis* 2018;18:269.
 - 15 Barr IG, Russell C, Besselaar TG, et al. *WHO recommendations for the viruses used in the 2013-2014 Northern Hemisphere influenza vaccine: epidemiology, antigenic and genetic characteristics of influenza A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and B influenza viruses collected from October 2012 to January 2013*. *Vaccine* 2014;32:4713-25.
 - 16 World Health Organization. *Candidate vaccine viruses and potency testing reagents for development and production of vaccines for use in the northern hemisphere 2018-2019 influenza season*. Disponibile su: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/candidates_reagents/2018_19_north/en/.
 - 17 Hartvickson R, Cruz M, Ervin J, et al. *Non-inferiority of mammalian cell-derived quadrivalent subunit influenza virus vaccines compared to trivalent subunit influenza virus vaccines in healthy children: a phase III randomized, multicenter, double-blind clinical trial*. *Int J Infect Dis* 2015;41:65-72.
 - 18 Bart S, Cannon K, Herrington D, et al. *Immunogenicity and safety of a cell culture-based quadrivalent influenza vaccine in adults: A Phase III, double-blind, multicenter, randomized, non-inferiority study*. *Hum Vaccin Immunother* 2016;12:2278-88.
 - 19 Yun Lu. *Relative effectiveness of cell-cultured versus egg-based influenza vaccines, 2017-18*. ACIP Meeting, 2018. Disponibile su: <https://www.cdc.gov/vaccines/acip/meetings/downloads/slides-2018-06/flu-03-Lu-508.pdf>
 - 20 European Medicines Agency. *Meeting highlights from the Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP) 15-18 October 2018*. Disponibile su: <https://www.ema.europa.eu/news/meeting-highlights-committee-medicinal-products-human-use-chmp-15-18-october-2018>.