



69° CONGRESSO INTERNAZIONALE MULTISALA SCIVAC
Rimini, 27-29 Maggio 2011

gaetano.oliva@unina.it

Vaccini per la CanL: realtà ed aspettative



GRUPPO DI STUDIO SULLA LEISHMANIOSI CANINA

Un sogno.....




L'occasione favorisce solo la mente che vi è preparata (Louis Pasteur, 1822-1895)




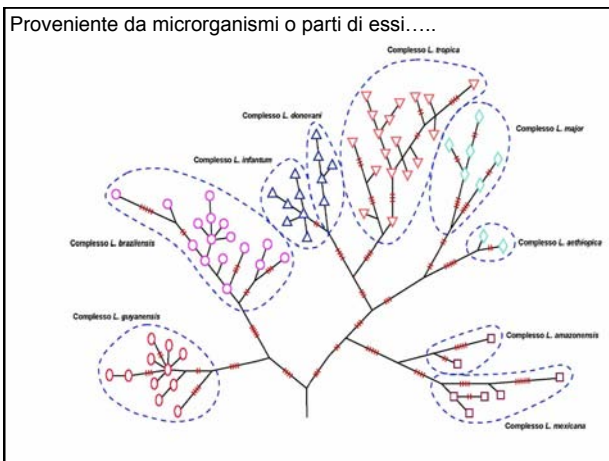
Strategie di profilassi

1. Insetticidi anti-flebotomo
2. Vaccini
3. Eliminazione dei cani infetti/ammalati



Che cos'è un vaccino ?

Il **vaccino** è un preparato contenente materiale costituito da proteine complesse a DNA eterologhe, cioè estranee, provenienti da **microrganismi** o parti di essi, opportunamente trattato per non perdere le proprietà antigeniche, e finalizzato ad essere utilizzato nel conferimento di **immunità** attiva al soggetto cui viene somministrato. L'immunità deriva dalla stimolazione, nel soggetto ricevente, alla produzione di **anticorpi** neutralizzanti il microrganismo stesso

Tempo stimato tra l'inizio della sperimentazione e l'approvazione del prodotto per l'uso al pubblico¹

¹Coler & Reed (2005) Trends Parasitol 21:244-249



Idea → Ricerca (10 anni) → Validazione pre-clinica → Sviluppo della produzione in GMP (2 anni) → Test tossicologici → Studi clinici (Fasi I-IV) (3-5 anni) → OK



Che vogliamo ottenere con un vaccino?

Stimolazione del sistema immunitario

(per)

Prevenire infezione/malattia



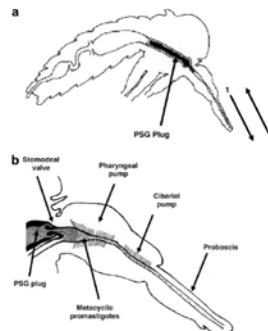
DIFFERENZA TRA INFEZIONE E MALATTIA

Un cane **infetto** da *L. infantum* è un soggetto nel quale sia dimostrabile la presenza del parassita, con metodi diretti (microscopia, coltura, PCR) o con metodi indiretti (messa in evidenza di anticorpi specifici)

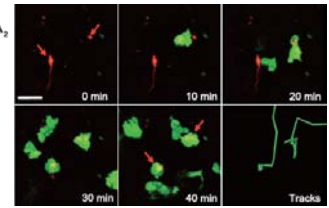
Un cane infetto può essere definito **malato** quando mostra uno o più segni clinici di leishmaniosi, incluse alterazioni ematologiche, ematobiochimiche ed urinarie



Bates PA, 2007



Peters NC et al., 2008



Cellular And Humoral Immunity

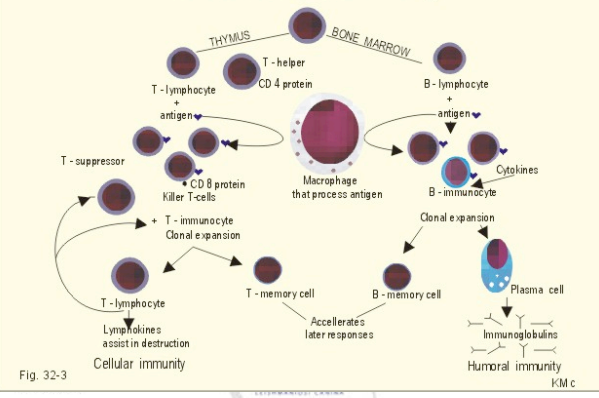
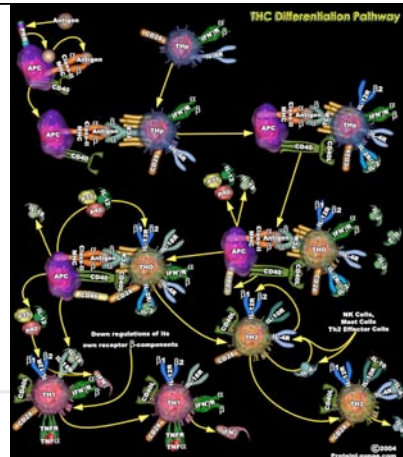
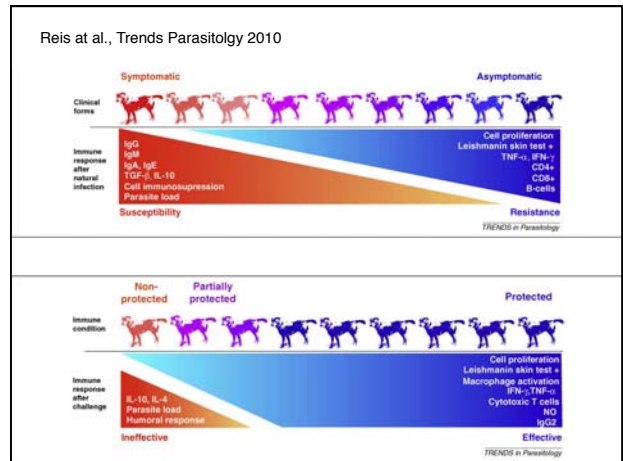
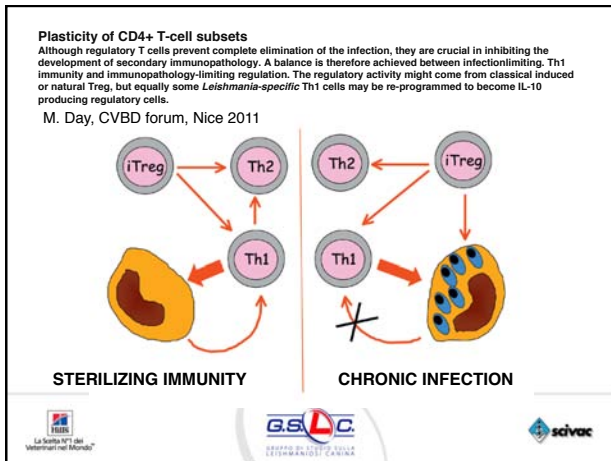


Fig. 32-3



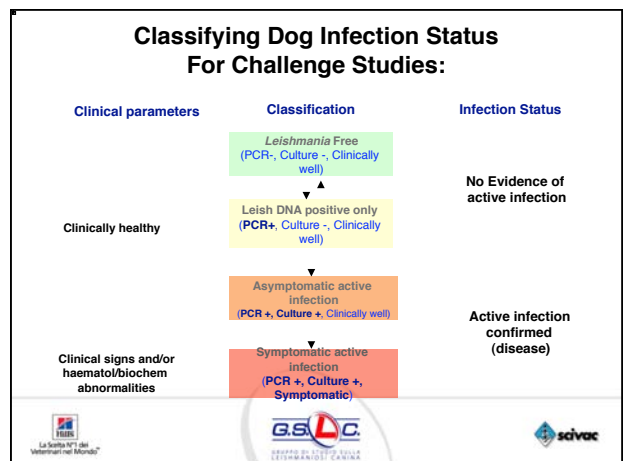
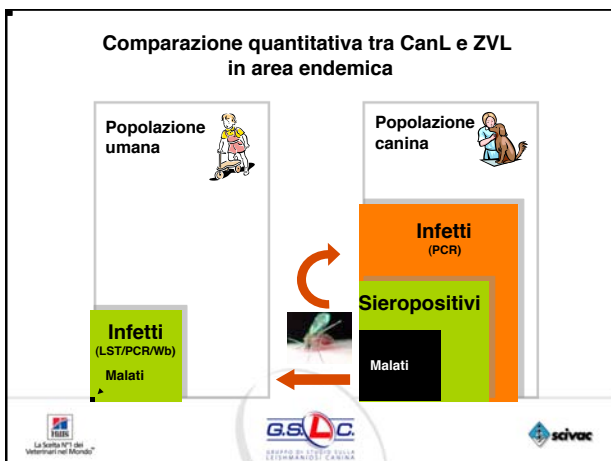


Months	BM Nested PCR	BM RT PCR	Lymph node EMTM Culture	IFAT	ELISA	Haemato Biochemical parameters	Clinical examination	STATUS
M9	neg		neg	<1/40	Neg.	normal	Mild weight loss	Negative
M15	pos	4.9	pos	320	2000	PLT↓	Asymptomatic	Patent Symptomatic infection
M18	pos	6.5	pos	5120	5000	RBC↓, PLT↓, Inverted A/G ratio	Lymphosdeno pathy (popliteal)	Patent Symptomatic infection
M21	pos	6.7	pos	20480	5000	RBC↓, Inverted A/G ratio	Pale mucosae, Loss of weight, Muscle atrophy	Patent Symptomatic infection

Logos: La Scuola N°1 del Veterinario nel Mondo, G.S.L.C. (Gruppo di Studio e Ricerca Parasitologica Canina), scivac

Months	BM Nested PCR	BM RT PCR	Lymph node EMTM Culture	IFAT	ELISA	Haemato Biochemical parameters	Clinical examination	STATUS
M9	neg		neg	<1/40		PLT↓	prescapular enlarged	negative
M15	Pos		neg	<1/40	(-)	TP↓	asymptomatic	Subpatent infection
M18	neg		neg	<1/40		WBC↑		Healthy negative
M21	neg		neg	<1/40		RBC↓, TP↓		Healthy negative
M24	Pos	2.9	neg	1/160	200/ND	normal	asymptomatic	Subpatent infection
M30	neg		neg	<1/40		normal	asymptomatic	negative
M33	neg		neg	<1/40		RBC↓, TP↓	asymptomatic	negative

Logos: La Scuola N°1 del Veterinario nel Mondo, G.S.L.C. (Gruppo di Studio e Ricerca Parasitologica Canina), scivac



E I VACCINI ??????

Vaccini di 1° generazione	Vaccini di 2° generazione	Vaccini di 3° generazione
Parassiti uccisi	Vaccini vivi modificati	Vaccini a DNA
Lisati di parassiti autoclavati (AL)	Vaccini che usano batteri o virus ricombinanti (carriers di antigeni)	Vaccini basati su antigeni della saliva dei flebotomi
Mix di parassiti vivi ed uccisi	Antigeni purificati di <i>Leishmania</i> Antigeni ricombinanti	Vaccini sintetici

Leishmune®

FML (Fucose-Mannose-Ligand) glicoproteina di membrana adiuvata con saponine

EFFICACIA NELLA PREVENZIONE DELLA MALATTIA

Blocking Transmission Vaccine (Risultati ancora non confermati)

Immunoterapeutico, da solo od in associazione a farmaci convenzionali

Canileish®

ISS	DSCV
Luigi Gradoni	Gaetano Oliva
Eleonora Fiorentino	Valentina Foglia Manzillo
Gioia Buongiorno	Silvia Cappiello
Marina Gramiccia	Rossella Paporcone
Titti Di Muccio	Manuela Gizzarelli
Aldo Scalone	Paolo Muzj
Carmen Cañavate e Coll. : Instituto Carlos III, Madrid, Spagna	
Anne Marie Cousinier e Coll. : Virbac, Francia	

I punti chiave:

- Qual è la tecnologia del vaccino?
- E' sicuro?
- E' efficace?
- Uso pratico del vaccino



La storia della ricerca CaniLeish

Agli inizi del 1990

- L'IRD ha lavorato su un metodo per riprodurre tutti gli stadi del ciclo vitale di *Leishmania Infantum*, senza ricorrere ad animali da sperimentazione, normalmente necessari per poter portare il parassita allo stadio di amastigote e mantenerne la virulenza e le caratteristiche antigeniche
- L'IRD ha sviluppato un terreno di coltura in vitro (**completely defined medium**, **CDM**) contenente solo precise quantità di piccole molecole (sale comune, zuccheri, hemin, buffer, vitamine, aminoacidi): **privo di cellule, siero, proteine.**



Le applicazioni del Completely Defined Medium (CDM)

Alla fine degli anni '80 furono identificate le Excreted-Secreted Proteins (ESP) e notevole fu l'interesse per il loro potenziale utilizzo, sebbene fossero difficoltose da produrre in grandi quantità

Potenziale utilizzo per usi **diagnostici** e anche per applicazioni **immunoterapiche** o **immunoprolattiche**

Nel CDM è facile isolare le **Excreted-Secreted Proteins (ESP)** dalla coltura supernatante, poiché esse sono rilasciate dai parassiti durante il loro sviluppo



Excreted-Secreted Proteins (ESP)

Vantaggi:

- Proteine Parassitarie Solubili
- Conformazione "Naïve" (ottenute da *L. infantum*)
- Frazione Definita (molto meno complessa dell'estrazione dell'intero parassita)
- Pure. Assenza di altre proteine contaminanti
 - **Tutte le proteine provengono da *Leishmania***

Il principale antigene tra le ESP è il **PSA** (antigene di superficie del parassita) che è presente sia negli amastigoti che nei promastigoti. Si ritiene che le proteine ESP siano coinvolte in varie interazioni ospite-parassita



Studi pilota:

- Sono stati condotti studi per valutare l'efficacia in vitro e in vivo di un vaccino ESP adiuvato con MDP:
 - Lemesre JL et al, *Vaccine*, 2005, 2825
 - Lemesre JL et al, *Vaccine*, 2007, 4223
- I risultati ottenuti sono stati incoraggianti ma l'adiuvante è stato cambiato per varie ragioni



Lemesre et al., 2007

LIESAp, prodotto di escrezione/secrezione

Trattati: 165

Controllo: 175

Infezione Naturale (Francia, focolai di *L. infantum*)

Valutazione: Clinica, sierologica, parassitologica, PCR dopo 24 mesi

Risultati: 0,6% dei vaccinati positivi
6,9% dei controlli positivi
→ 92% di protezione dall'infezione



L'adiuvante scelto

- Il miglior adiuvante selezionato è stato il QA-21
- Si tratta di una frazione altamente purificata della saponina (QA saponin) che conserva un'elevata capacità come adiuvante e nel contempo un buon indice di sicurezza
- Si ritiene sia un potente stimolante della risposta dominante Th1
- Il suo analogo utilizzato in medicina umana (l'adiuvante QS-21) è il candidato per il più avanzato vaccino a livello mondiale contro la malaria : Fase III – GlaxoSmithKline (*Ballou WR, 2009, 492*).



La formulazione finale

- 110µg di ESP con 60µg di QA-21
- **Non è quindi lo stesso vaccino utilizzato nelle precedenti pubblicazioni**
- Il diluente è NaCl 0.9%
- Molteplici procedure del controllo-qualità garantiscono un adeguato profilo proteico del vaccino (comprese il dosaggio delle proteine, il profilo proteico, western blot, test in vivo dell'efficacia, identificazione del PSA come maggiore antigene)



Sicurezza

- Sono stati condotti numerosi studi sia in laboratorio che studi di utilizzando cani di differente età e razza
 - E' stata testata in laboratorio la sicurezza di una singola dose, di quattro dosi ripetute e del sovradosaggio, utilizzando cuccioli di Beagle
 - Sono state effettuate prove di campo applicando il dosaggio corretto su cani differenti per età e razza
- Conclusioni:
 - I più comuni effetti collaterali sono moderate e transitorie reazioni locali che si risolvono spontaneamente
 - In alcuni cani possono comparire anche una ipertermia transitoria, apatia e disturbi dell'apparato digerente
- Non sono disponibili dati in merito alla sicurezza (o all'efficacia) dell'uso in concomitanza di altri vaccini
- Nessun problema di sicurezza nei cani positivi per *Leishmania*



Efficacia:

- L'efficacia del vaccino è stata valutata da diversi studi:
 - In laboratorio, studi che prevedono l'infezione artificiale e sull'ipersensibilità ritardata
 - In campo, lo studio dell'efficacia con modello di infezione naturale, condotto per due anni in aree endemiche
- Sono stati valutati :
 - **Effetti sull'immunità di tipo cellulo-mediata (proliferazione di linfociti specifici, capacità dei linfociti di produrre IFN-γ o di stimolare la distruzione dei parassiti da parte dei macrofagi)**
 - **Ipersensibilità ritardata**
 - **Esiti clinici e parassitologici**

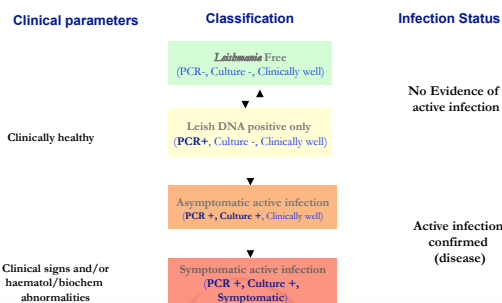


Studi di campo che utilizzano il modello di infezione naturale (*Gradoni L., Oliva G.*)

- Valutati **90 cuccioli** *Leishmania*-free, vaccinati (**45**) e trasferiti in aree altamente endemiche (Italia, Spagna) per condurre uno studio di infezione naturale
- I soggetti sono stati controllati per 2 anni dall'immissione nel sito
- L'infezione è stata monitorata con test ripetuti ogni 3 mesi:
 - Coltura della *Leishmania* (midollo osseo o linfonodo)
 - PCR (midollo osseo) nested e quantitative real-time PCR
 - Sierologia
 - Valutazioni cliniche
- Mediamente il 72% dei cani del gruppo di controllo testati con PCR sono risultati positivi almeno una volta durante lo studio (rispetto al 57% dei cani vaccinati)



Classificazione dello Status dell'infezione nei cani applicata nello studio:



Esito dello studio di campo

- Ricontrata durante lo studio una più alta carica parassitaria nel gruppo di controllo (Real Time-PCR)
- **Maggiore probabilità dell'evoluzione verso l'infezione attiva nel gruppo di controllo (p=0.0265)**
- **Maggiore probabilità di manifestare la sintomatologia nel gruppo di controllo (p=0.0466)**
- Le forme più gravi della malattia si sono manifestate maggiormente nel gruppo di controllo
- L'effetto benefico del vaccino è quello di ridurre il rischio* per i cani di diventare soggetti con infezione attiva (rischio più basso di 3.6 volte) o sintomatici (rischio più basso di 4 volte)

**Espresso come odds ratio – una misura della probabilità che un soggetto rimanga sano rispetto alla probabilità che sviluppi la malattia – per ogni cane malato sarà 4 volte maggiore la probabilità che siano sani i cani del gruppo dei vaccinati*



XENODIAGNOSI (dati preliminari, da confermare)

Clinical condition	Control dogs	Vaccinated dogs
Asymptomatic	0/35 (0%) Mean score: 0	1/66 (1.5%) Mean score: 0.01
Symptomatic	30/40 (75%) (*) Mean score: 1.82 (**)	10/39 (25.6%) (*) Mean score: 0.46 (**)

(*) Chi square for proportions: P < 0.0001

(**) Mann-Whitney test: P < 0.0001



Uso pratico

- Il protocollo vaccinale è di 3 iniezioni con intervalli di 3 settimane seguite un richiamo vaccinale annuale
- L'inizio dell'immunità è a 4 settimane dalla terza iniezione
- E' consigliato sverminare gli animali prima che inizi il protocollo
- **Solo gli animali negativi ai test sierologici possono essere vaccinati**
- **Possono essere prodotti anticorpi transitori rilevabili con IFAT ma possono essere differenziati da quelli dovuti all'infezione naturale tramite i tests sierologici rapidi**
- **L'uso di misure per ridurre l'esposizione ai flebotomi non deve essere evitato**



Interpretazione dei dati ottenuti

FASI DI UNA SPERIMENTAZIONE:

- Vitro (fase pre-clinica)
- Animali da laboratorio (pre-clinica)
- Cane (clinica)



Fase clinica

Fase I	TOSSICITA' E CINETICA
Fase II	VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA (Cellulo-mediata)
Fase III *	N. Limitato di cani (80) statisticamente significativo. Randomizzazione, doppio cieco, gruppo controllo
Fase IV	Conferma dell'efficacia e della non tossicità



Scenari futuri: (non lontani)

Antigeni ricombinanti

Vaccini a DNA

Vaccini che utilizzano proteine ottenute dalla "saliva" dei flebotomi



