

Indagine sulla qualità dei vaccini

Dr.ssa Loretta Bolgan

30.03.2019

SCOPO DELL'INDAGINE

Valutazione della conformità della composizione come indicato nella scheda tecnica dei vaccini



Screening delle contaminazioni chimiche, proteiche/peptidiche e di materiale genetico



Studio per la conferma di composti target (chimici e proteici) con standard certificati di controllo



Analisi di conferma interlaboratorio

Lo studio si è articolato su due tipi di analisi:

ANALISI DEL MATERIALE GENETICO

Test di presenza di acidi nucleici (DNA/RNA) di origine umana e animale e da microrganismi (virus, batteri) utilizzando la metodica **Next Generation Sequencing**, che ha permesso di quantificare in maniera altamente specifica e accurata la sequenza del materiale genetico contenuto nei vaccini esaminati.

Verifica di corrispondenza delle sequenze genomiche dei batteri e virus vivi attenuati o inattivati presenti nei vaccini (presenza di varianti genetiche)

ANALISI DELLE IMPUREZZE E CONTAMINAZIONI CHIMICHE E PROTEICHE

Il sistema di analisi **LC-SACI/ESI-MS** associato all'innovativa piattaforma SANIST è stato utilizzato sia per eseguire un primo screening identificativo sui vaccini di interesse, che per la conferma con gli standard di controllo, con un limite minimo tra i nanogrammi e i microgrammi/dose

La tecnologia **MALDI-TOF-MS** è stata utilizzata per studiare le macromolecole insolubili presenti nei vaccini

ANALISI QUANTITATIVA DEI METALLI

la tecnologia **ICP-MS** ha permesso di quantificare i metalli presenti nei vaccini con un limite minimo di 5ng/dose

Risultati Analisi effettuate	Infanrix hexa	Hexyon	Priorix tetra	Gardasil 9
Antigeni	Non sono stati identificati gli antigeni proteici. Presenza di una macromolecola insolubile e indigeribile che non è stato possibile sequenziare. Analisi MALDI-TOF della macromolecola: non è stato possibile studiarla perché ha inglobato la matrice dell’analisi. Comportamento “prionico”?	Sono stati identificati e sequenziati 3 antigeni proteici su 6. Comportamento “prionico”? (gli antigeni si aggregano e precipitano nel tempo diventando insolubili)	Sono stati identificati e sequenziati 3 dei 4 virus attenuati. La rosolia è stata rilevata in bassissimo numero di copie I virus della varicella, parotite e morbillo presentano delle mutazioni maggiori probabilmente acquisite durante l’attenuazione un numero elevato di varianti minori (quasi specie)	Sono stati identificati 7 dei 9 antigeni proteici. (mancano i ceppi 11 e 58) Comportamento “prionico”? (gli antigeni si aggregano e precipitano nel tempo diventando insolubili)
Contaminanti chimici (segnali)	65 (35% noto) PEG, acido formico	216 (30% noto)	115-173 (29-43% noti)	338 (22% noti))
Tossine chimiche	8	16	no	10
Contaminanti proteici	no	no	Sarcoplasmin calcium-binding protein, Actina e Vimentina	no
Contaminanti peptidici liberi	16	no	no	no
DNA/RNA residuale Proveniente dalle cellule di coltura	Sotto i limiti di rivelabilità dello strumento	DNA ed RNA proveniente dalle colture batteriche. DNA/RNA di scimmia (cellule Vero) e da primati. Poliovirus 1 e 2 Il materiale riscontrato era in tracce e degradato	DNA totale: 1.7-3.7 µg/dose di cui l’80% umano (DNA/RNA fetale umano proveniente dalla linea cellulare MRC-5). Altro DNA: di pollo	DNA umano e di topo (in tracce)
Virus avventizi	no	Fago del tetano Vettori utilizzati per il clonaggio	Human endogenous retrovirus K Equine infectious anemia virus Avian leukosis virus HERV-H/env62	Molluscum contagious virus Retrovirus (DNA): Murine leukemia virus Human endogenous retrovirus K Retrovirus (RNA): Equine infectious anemia virus Murine leukemia virus
Altri contaminanti microbici	no	no	Proteobatteri, nematodi-elminti	Batteri Lievito e i suoi virus
Residui di lavorazione di materiale genetico	no	no	no	DNA: Frammenti L1 (manca il ceppo 58; presenza ceppo 20) RNA: costrutti sintetici (sequenze artificiali) Sono stati sequenziati i frammenti L1 18, 16, 6 (RNA)
Metalli *	Alluminio pari a 723,5 µg ± 130 µg / dose Altri metalli sotto i 5g/dose	Alluminio pari 546 µg ± 98.5 µg / dose Altri metalli sotto i 5g/dose	Alluminio pari a 0.8 µg ± 0.15 µg / dose Altri metalli sotto i 5g/dose	Alluminio pari a 416 µg ± 75 µg / dose Altri metalli sotto i 5g/dose
*Alluminio, Afnio, Antimonio, Arsenico, Bario, Bario, Bismuto, Cadmio, Cromo, Gallio, Indio, Iridio, Ittrio, Lantanio, Lantanio, Mercurio, Nichel, Palladio, Piombo, Platino, Rame, Rodio, Rutenio, Scandio, Stagno, Stronzio, Tantalo, Tallio, Tungsteno, Vanadio				

ANALISI DI CONFERMA E IN CORSO

► **Analisi delle contaminazioni chimiche e proteiche:**

- ❑ Sono stati confermati 2 composti per vaccino mediante standard di controllo certificato, scelti tra quelli noti mediante il confronto con i composti catalogati in banche dati per il loro profilo critico di pericolosità e per la quantità non residuale (tale da poter essere considerati dei componenti dei vaccini, quindi da inserire in scheda tecnica e quantificati). Questo studio non è esaustivo perché limitato dal costo notevole dell'indagine.
- ❑ Sono in corso le analisi di conferma interlaboratorio di questi composti.
- ❑ studio della cinetica di precipitazione degli antigeni legati all'alluminio (in corso)

► **Analisi metagenomiche:**

- ❑ analisi con ulteriori standard di controllo del DNA e dell'RNA di un altro lotto per vaccino (in corso)
- ❑ analisi di sequenziamento del genoma del DNA fetale proveniente dalla linea cellulare MRC-5 (in corso)
- ❑ studio delle varianti minori (quasispecie) dei virus del morbillo, parotite e rosolia (in corso)
- ❑ analisi di conferma interlaboratorio (in corso)

► **Progetti in fase di valutazione:**

- ❑ studio della potenza degli antigeni vaccinali: tale studio deve essere svolto presso un centro accreditato dalle agenzie regolatorie per lo studio preclinico dei vaccini. Lo scopo è di verificare se gli antigeni vaccinali sono in grado di produrre o di legarsi ad anticorpi specifici (si assume teoricamente che questi anticorpi siano protettivi, ma questa analisi non permette di dimostrare che il vaccino è in grado di proteggere dalla malattia)

Rilevanza dei risultati ottenuti



I PRODOTTI ANALIZZATI PRESENTANO DIVERSE CRITICITÀ CHE RICHIEDONO UNA RISPOSTA DA PARTE DELLE AGENZIE REGOLATORIE E DEI PRODUTTORI RIGUARDANTI:

- ▶ la non identificazione/presenza sotto soglia di antigeni vaccinali (**efficacia?**)
- ▶ La presenza di contaminazioni chimiche e proteiche/peptidiche identificate in quantità non residuali e in numero elevato (**tossicità dose cumulativa?**)
- ▶ La presenza di un'elevata percentuale di contaminazioni chimiche e proteiche/peptidiche non identificate (**applicazione del principio di precauzione?**)
- ▶ La presenza di residui di lavorazione in quantità non residuali con potenziali effetti negativi sul DNA umano (DNA fetale) e di virus avventizi che devono essere assenti (**sicurezza a lungo termine?**)

**SE NON SI PUÒ GARANTIRE LA QUALITÀ DI UN FARMACO NON SI PUÒ GARANTIRNE
L'EFFICACIA E LA SICUREZZA!**