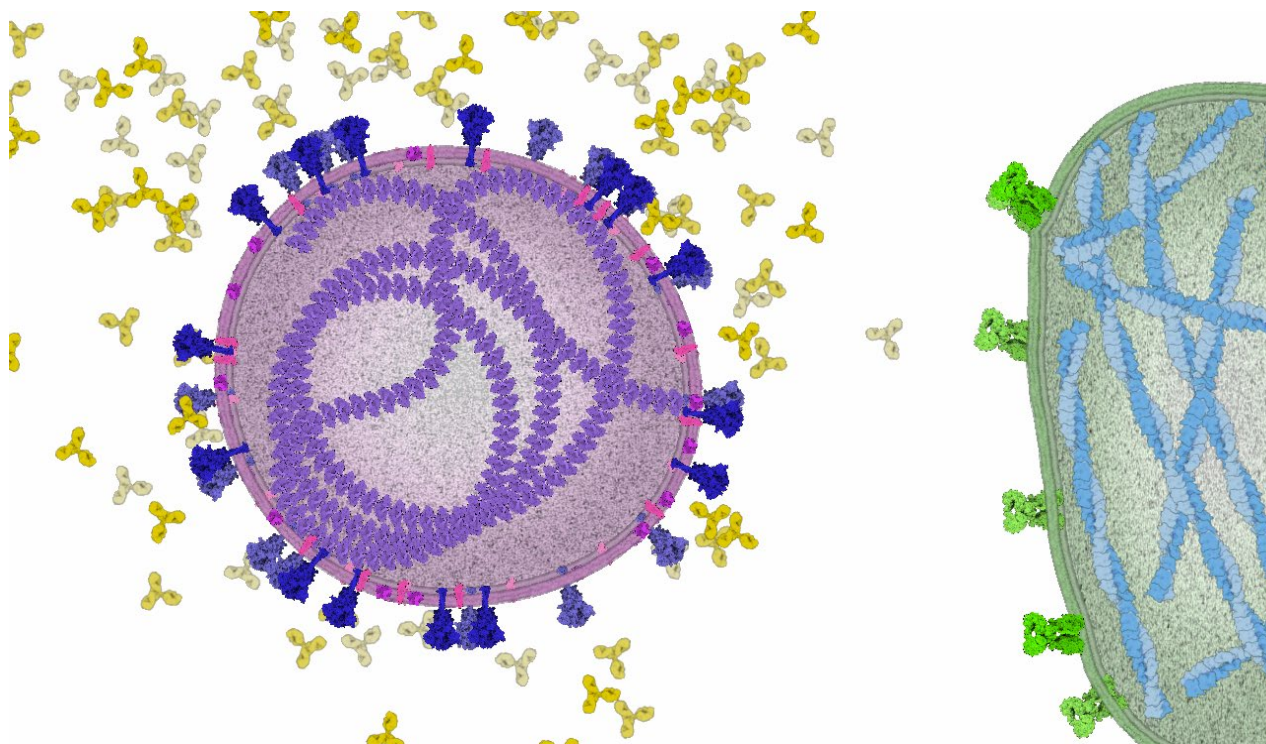




Sodobna cepiva

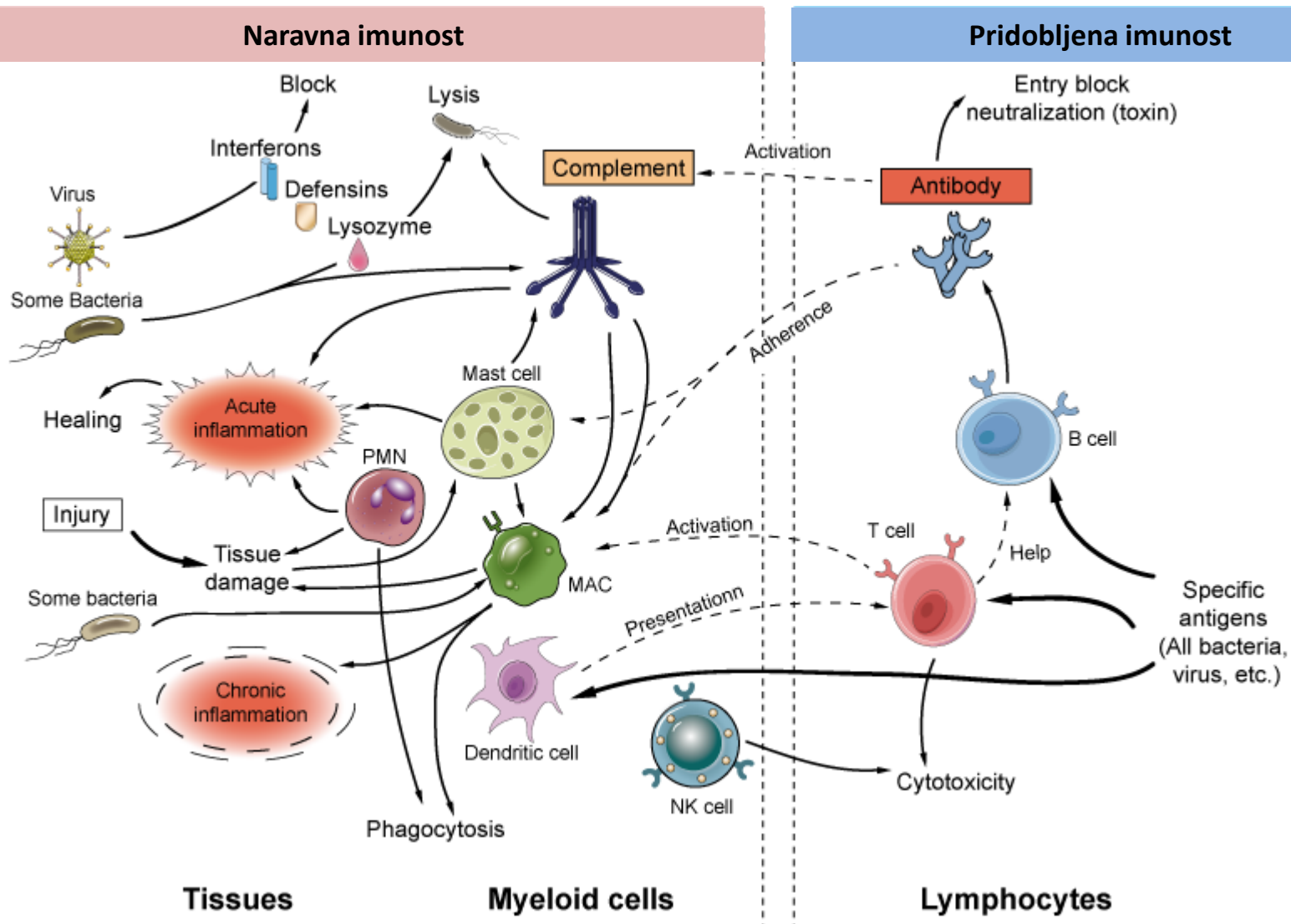
in Covid-19



Roman Jerala

Odsek za sintezno biologijo in imunologijo

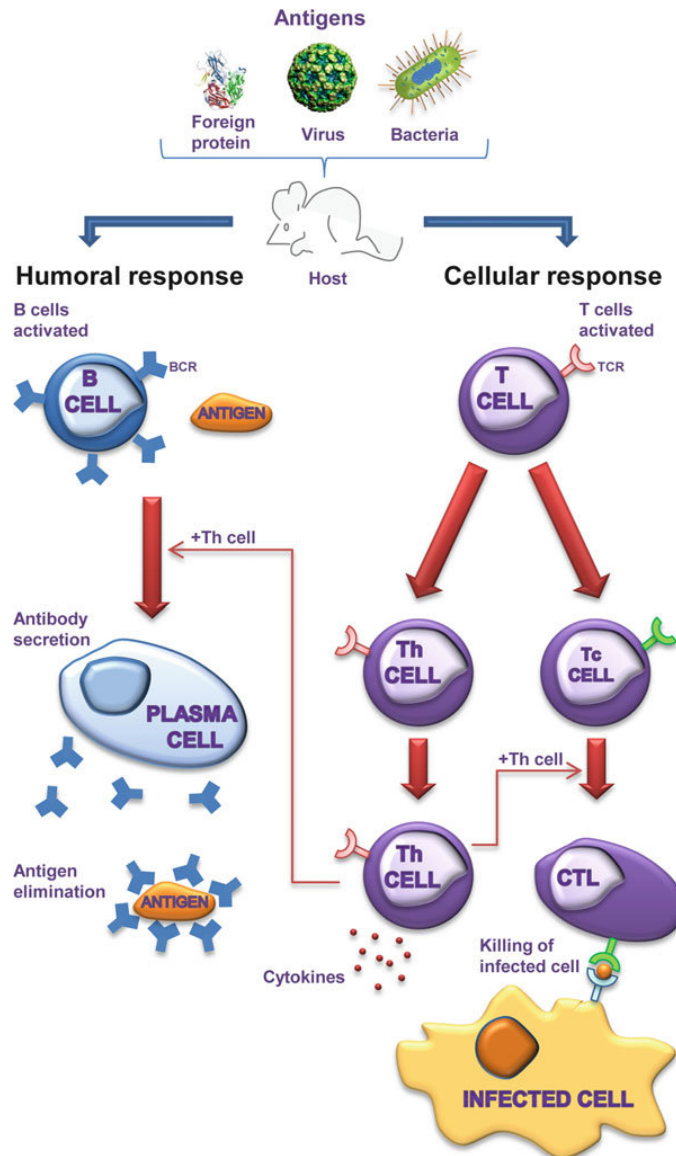
Imunski sistem



Genško kodirana, hiter odziv, prepozna vzorce

Veliko kombinacij, kloni, spomin

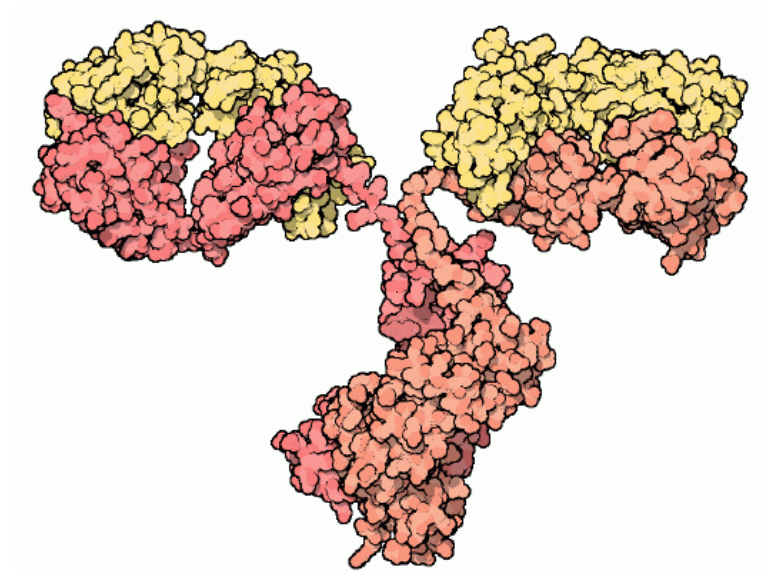
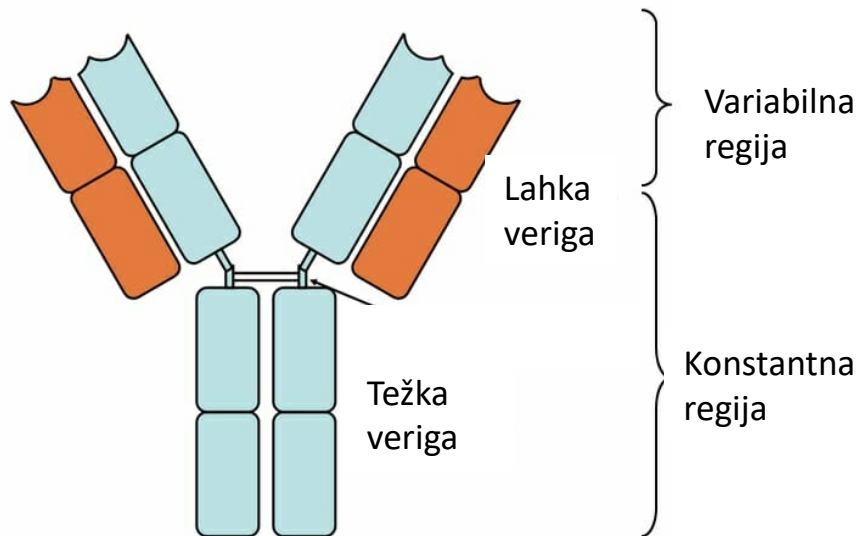
Humoralna in celična veja pridobljene imunosti



$\sim 10^{12}$ možnih variant
ki nastanejo z
rekombinacijo verig
+ mutacije

V telesu je $\sim 3 \cdot 10^{11}$
celic T in B

Protitelesa za prepoznavanje in nevtralizacijo virusov



Princip delovanja cepiva

Celice našega telesa s cepivom prepričamo da se odzovejo kot da je prišlo do okužbe

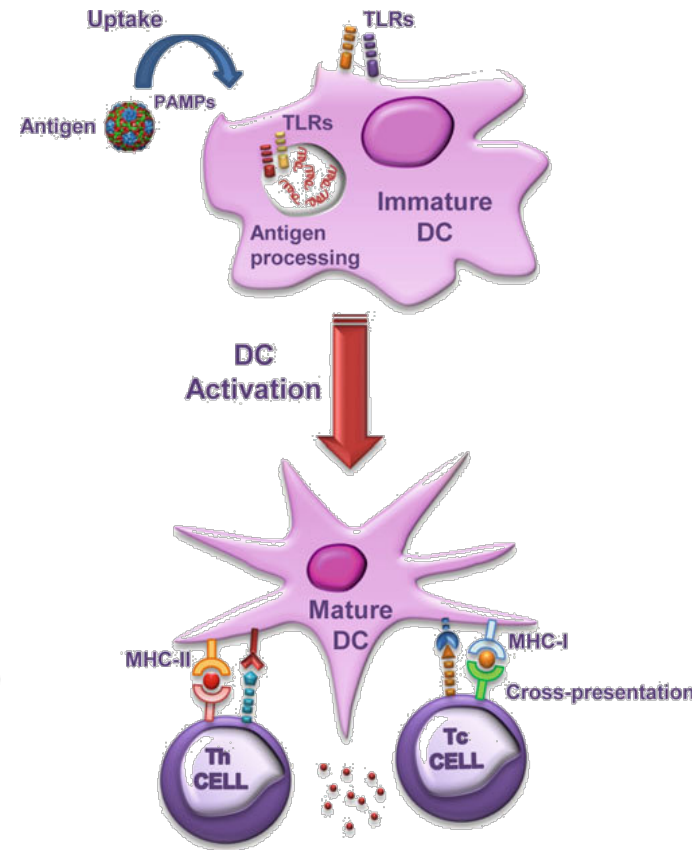
Sestavine: vnos za telo **tujih molekul** (virusni proteini) + signali, ki spremljajo okužbo (**aktivatorji receptorjev naravnega imunskega sistema** – adjuvansi – RNK, DNK, sestavine bakterij...)

Odziv imunskega sistema:

Predstavitev virusnih proteinov celicam B in celicam T v limfnih vozlih

selekcija celic, ki producirajo protitelesa, ki se vežejo na virusne proteine (celice B)

ter celic, ki prepoznavajo koščke virusnih proteinov (celice T)
zorenje celic B s protitelesi z izboljšano afiniteto,
kloni, ki producirajo protitelesa se razmnožijo in ostanejo v telesu kot dolgoživeče spominske celice do infekcije



Trajanje zaščite

Oslovski kašelj	4-6 let	toksoid
Davica	~10 let	toksoid
Tetanus	96% 13-14 let, 72% >25 let	toksoid
Polio	Vsaj 18 let pri 99%	oslabljen virus
Haemophilus influenzae tip B	najbrž doživljensko, >9 let doslej	Konjugat polisharida
Hepatitis B	>20 let	Rekombinanten protein VLP
Ošpice	doživljensko >96% vakcin	Oslabljen virus
Mumps	>10 let pri 90%, počasen upad	Oslabljen virus
Rdečke	>15-20 let pri 90%	Oslabljen virus
Rumena mrzlica	Doživljensko	Oslabljen virus
Človeški papilomavirus	>5-8 let	Rekombinanten protein
Norice	>14 let za dve dozi	Oslabljen virus

Najbolje delujejo oslabljeni virusi – replikacija + aktivacija naravne imunosti

Napredne tehnologije dizajna cepiv

- Bolj varno kot oslabljeni virusi
- Komponentna cepiva - izbor in prezentacija izbranih epitopov antigenov (npr. HIV, HRSV, influenza)
- Dostava cepiv: virusna dostava, nanodelci, VLP (virusom podobni delci)
- Hiter odziv na epidemijo s pomočjo molekularne biologije in sintezne biologije

Tipi sodobnih cepiv



Oslabljen virus



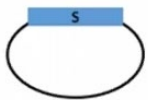
Inaktiviran virus



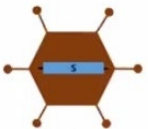
Rekombinanten virusni protein



RNK cepivo

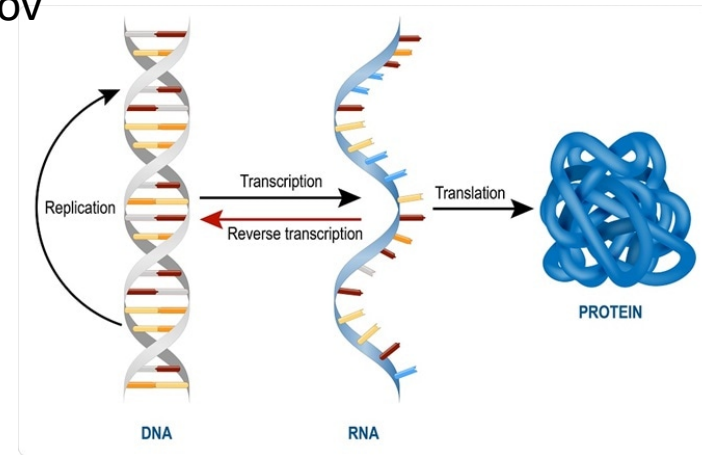


DNK cepivo



Dostava z (adeno)virusi

Dostava proteinov



Dostava genskega zapisa, proteine sintetizirajo naše celice

Genski zapis se ne vgradi v genom, vnesene nukleinske kisline trajajo le kratek čas

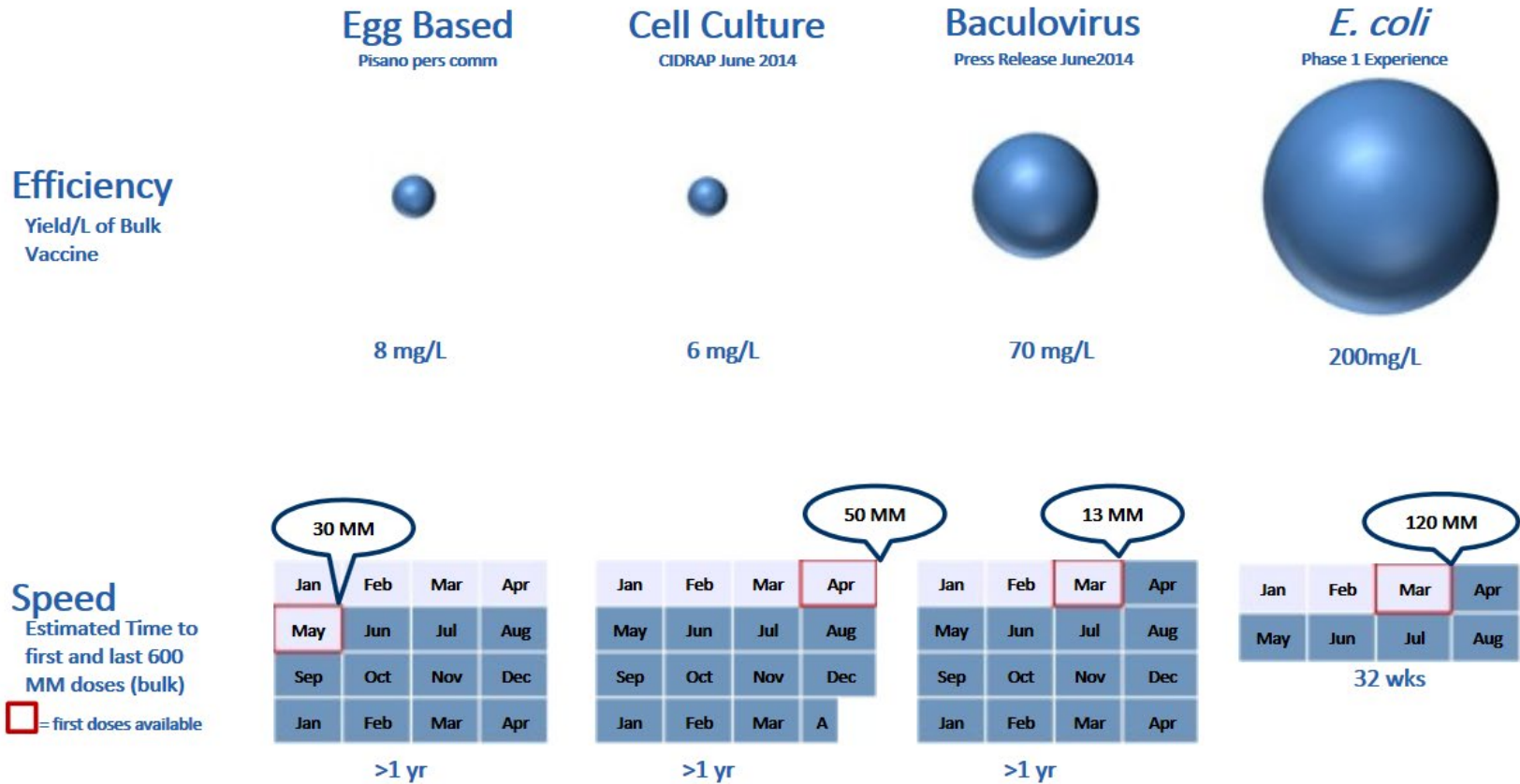
Izbor molekularskih komponent za cepiva

Cilji: **nevtralizacija** virusov, **široka zaščita** proti več sevom (univerzalno cepivo)

Nevtralizacija: identifikacija funkcionalno pomembnih in ohranjenih epitopov

Za **dober odziv** je potrebno zorenje protiteles s mutacijami za visoko afiniteto – razvoj režima imunizacije z revakvacijo (boost) lahko tudi s kombinacijo različnih antigenov za usmerjanje zorenja

Prednosti priprave rekombinantnih cepiv



Adenovirusna cepiva

Adenovirusi:

Neoplašeni, 70-100 nm premera

dvDNA genom

Učinkovito okuži neaktivne in deleče se celice

Kapaciteta 30 kb

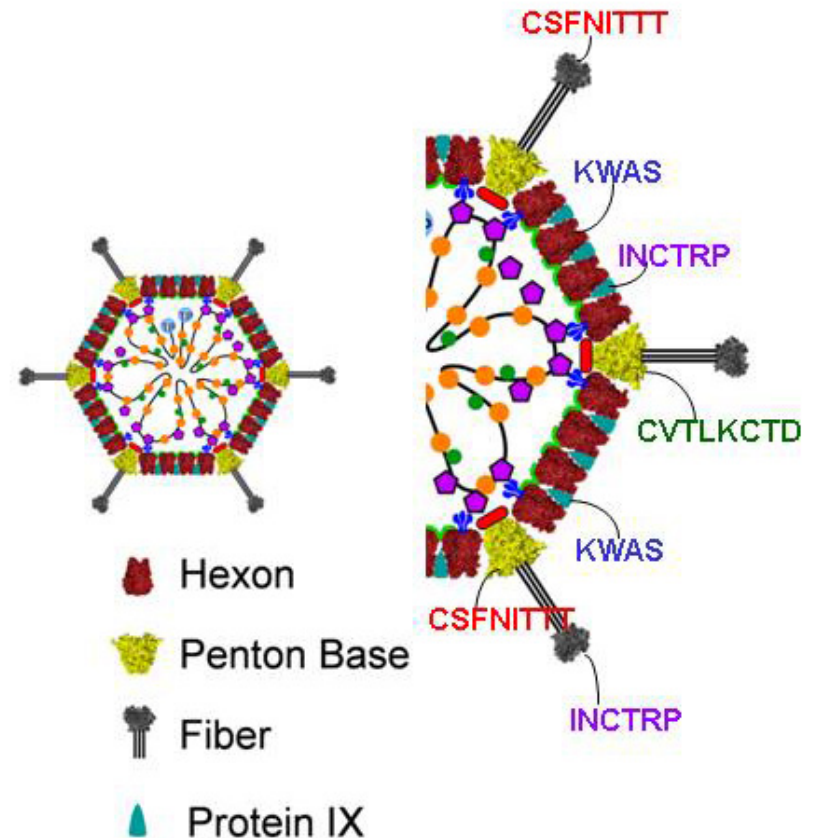
Produkcija visokih titrov

Možnost oralnega vnosa

Vnos epitopov v različne virusne proteine

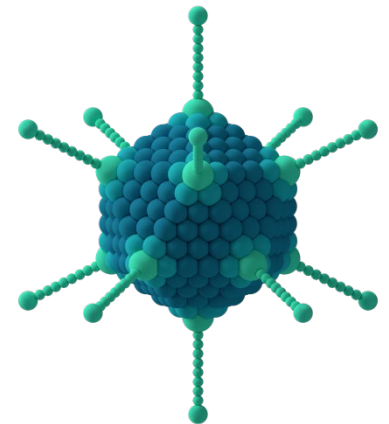
Razvoj cepiv proti:

- HIV
- Malariji
- Eboli
- Hepatitisu C
- TB
- SARS/MERS

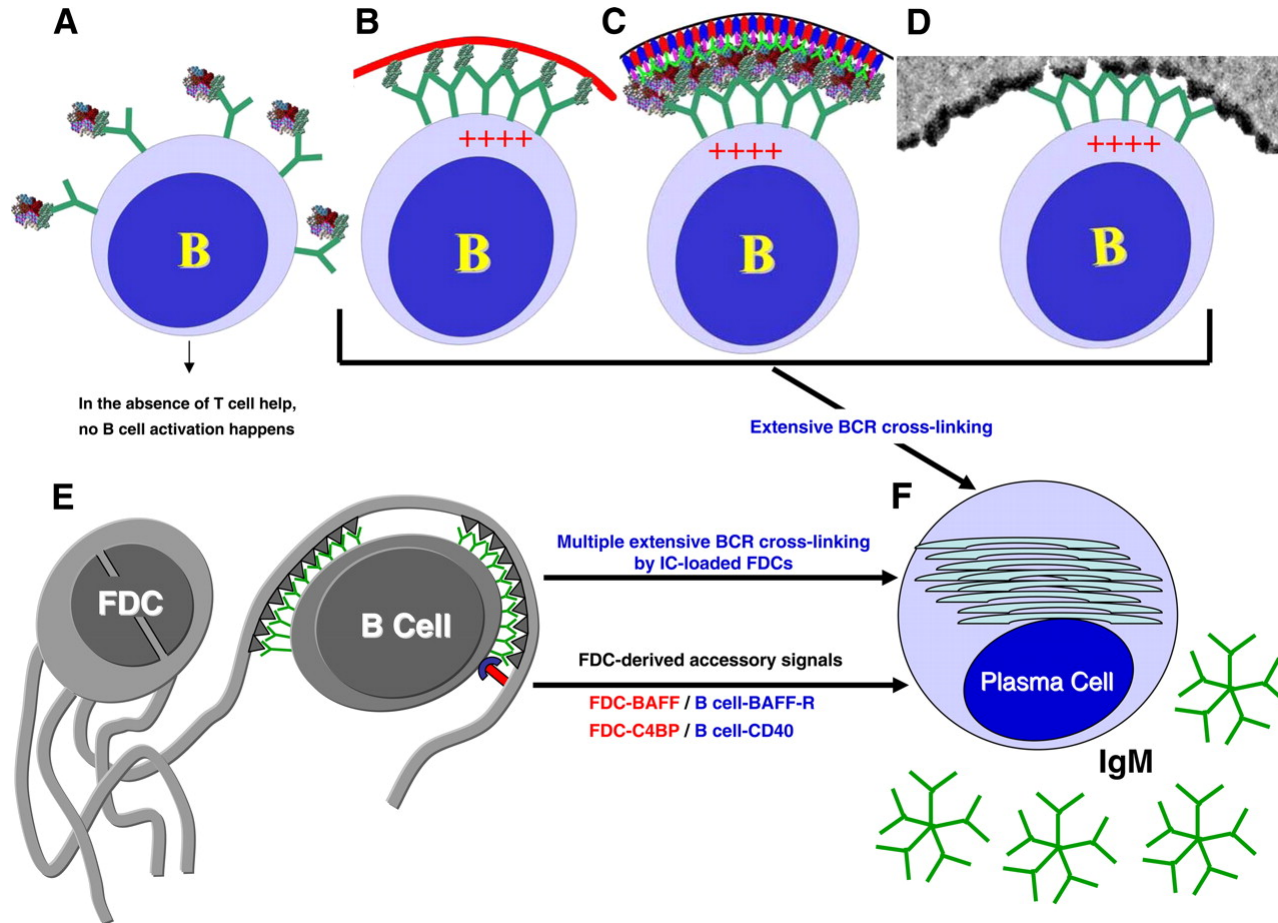


Predstavitev antigenov pri adenovirusnih cepivih

- Ni stabilne integracije v genom
- Adenovirusi za cepiva so okvarjeni in ne omogočajo replikacije v človeških celicah
- Možnost predstavitve proteinskega antigena na površini virusa
- Slabosti – možna prisotnost nevtralizacijskih protiteles v predhodno okuženih ljudeh



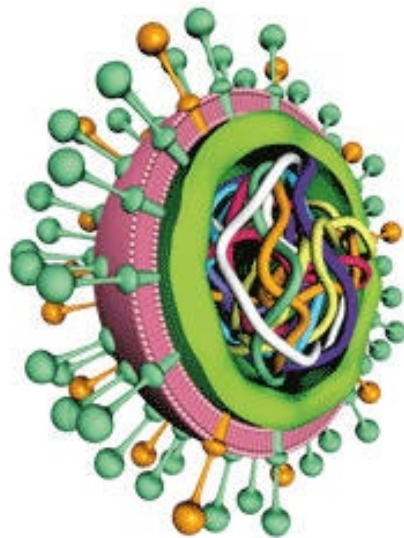
Prednosti predstavitve antigenov v nanoskupkih



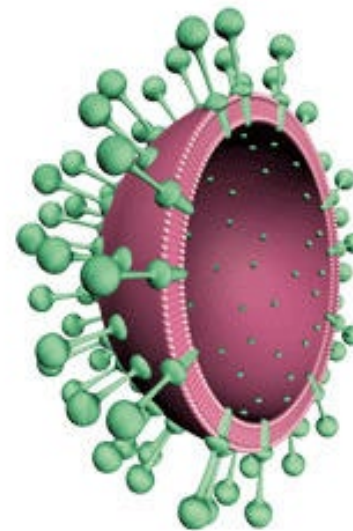
B celice se aktivirajo zaradi pomoči T-celic ali zaradi imunskih kompleksov prezentiranih preko FDC, kar povzroči aktivacijo B-celičnih receptorjev, ki so med seboj oddaljeni 20-50 nm
Posnemanje z dizajniranimi nanodelci oz. virusom podobnimi delci

Dostava cepiva v obliki strukturiranih nanodelcev

VLP – virusom podobni delci



Infektivni virusni delci



VLP – virusu podobni delci

VLP – virusom podobni delci

Rekonstitucija iz majhnega števila polipeptidnih verig

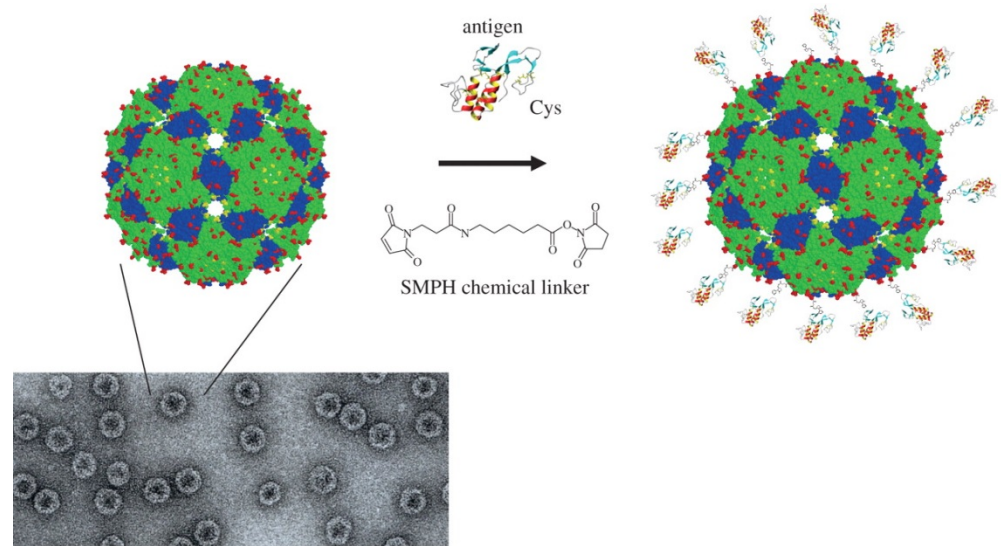
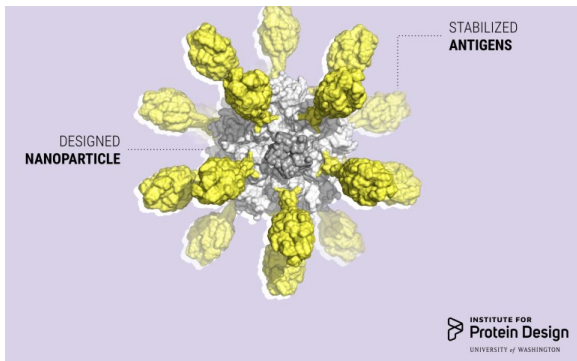
Primeri: iz bakteriofagov Q β , virusov: HBsAg, rastlinskih virusov; CP TMV... dizajnirani proteini.

Produkcija v sesalskih, rastlinskih, insektnih celicah, kvasovkah, bakterijah

Odobrena cepiva proti virusu hepatitisa B, papiloma virusu

Cepivo proti nikotinu, malariji, virusom, raku...

Povezovanje antigena s podenotami VLP – genska fuzija, kemijska, encimska konjugacija



Hitra priprava kandidatov za cepiva proti ZIKV

Larocca, Nature 2016 – inaktiviran virus ter DNA cepivo učinkovito v miših, testiranje v 6 mesecih

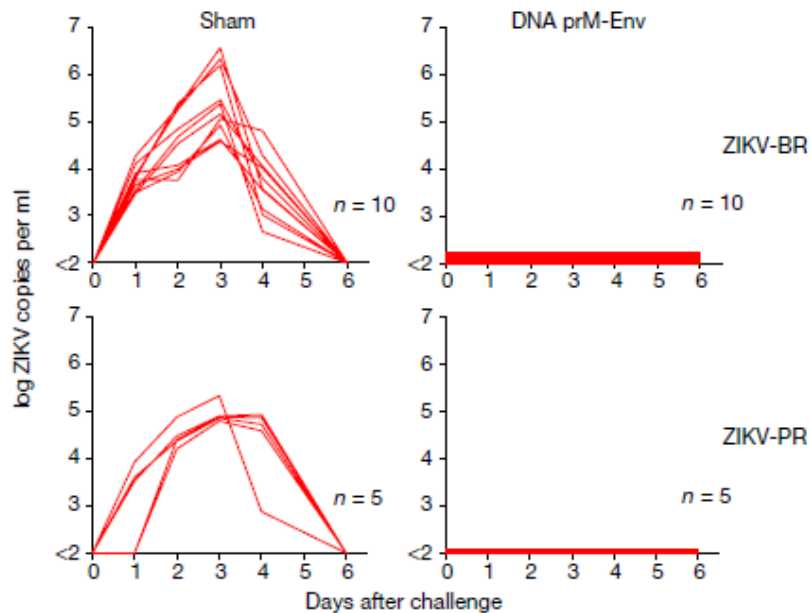


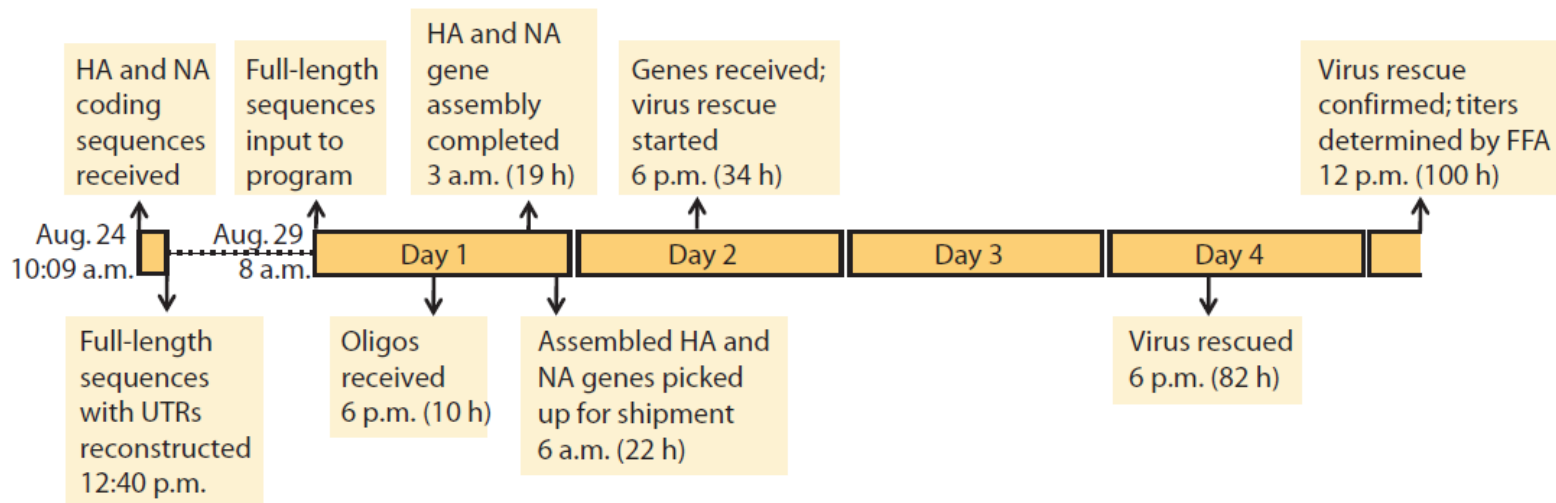
Table 1 | ZIKV-specific neutralizing antibody titers

Vaccine	ZIKV MN50 titer
DNA prM-Env	22
DNA prM-Env(Δ TM)	<10
DNA prM-Env(Δ stem)	<10
DNA Env	<10
DNA Env(Δ TM)	<10
DNA Env(Δ stem)	<10
DNA prM-Env + boost	1,022
PIV + alum i.m.	15
PIV + alum s.c.	15
Sham + alum i.m.	<10
Sham + alum s.c.	<10
Anti-flavivirus antibody	232

Balb/c mice received a single immunization with 50 μ g of various DNA vaccines (Figs 1, 2) or 1 μ g purified inactivated virus (PIV) vaccines with alum (Fig. 4), and pooled serum was assessed for ZIKV-specific neutralizing antibodies at week 4. 50% microneutralization (MN50) titers are shown. Also shown are MN50 titers in serum from mice following two immunizations with DNA-prM-Env (boost) and an anti-flavivirus human polyclonal antibody.

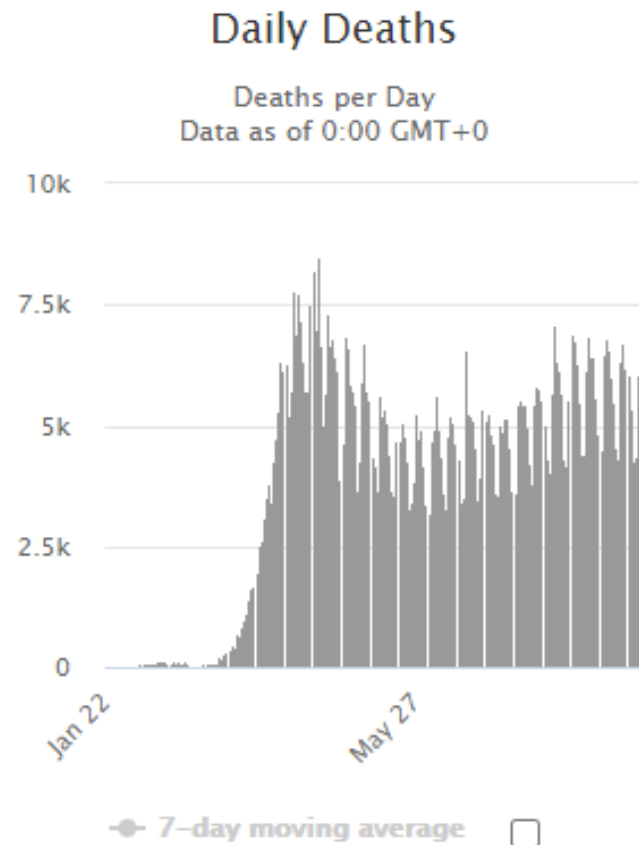
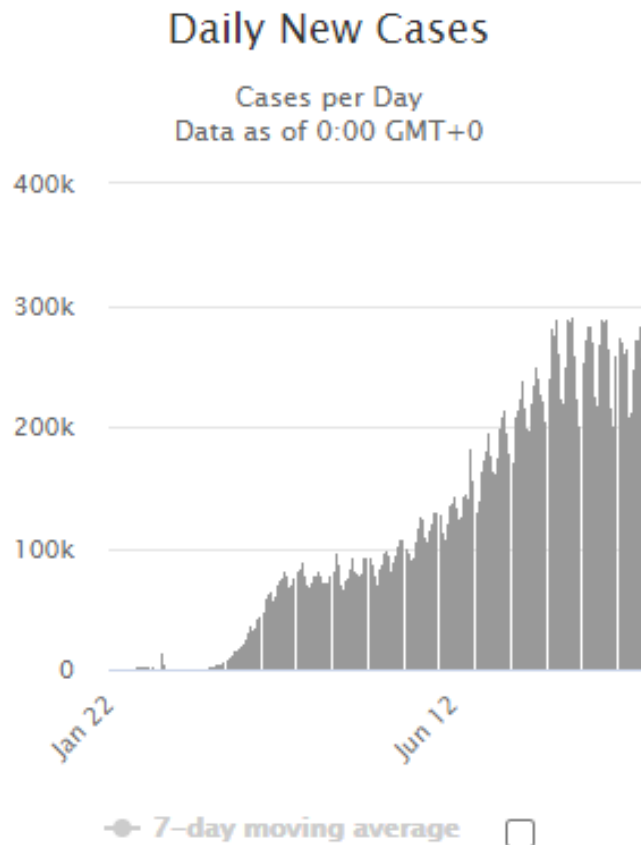
Hiter odziv priprave cepiv za pandemije

Platforma za hiter odziv na nove seve influence:
Sinteza genov za nevraminidazo in hemaglutinin iz sekvenc, produkcija virusov sesalskih celicah

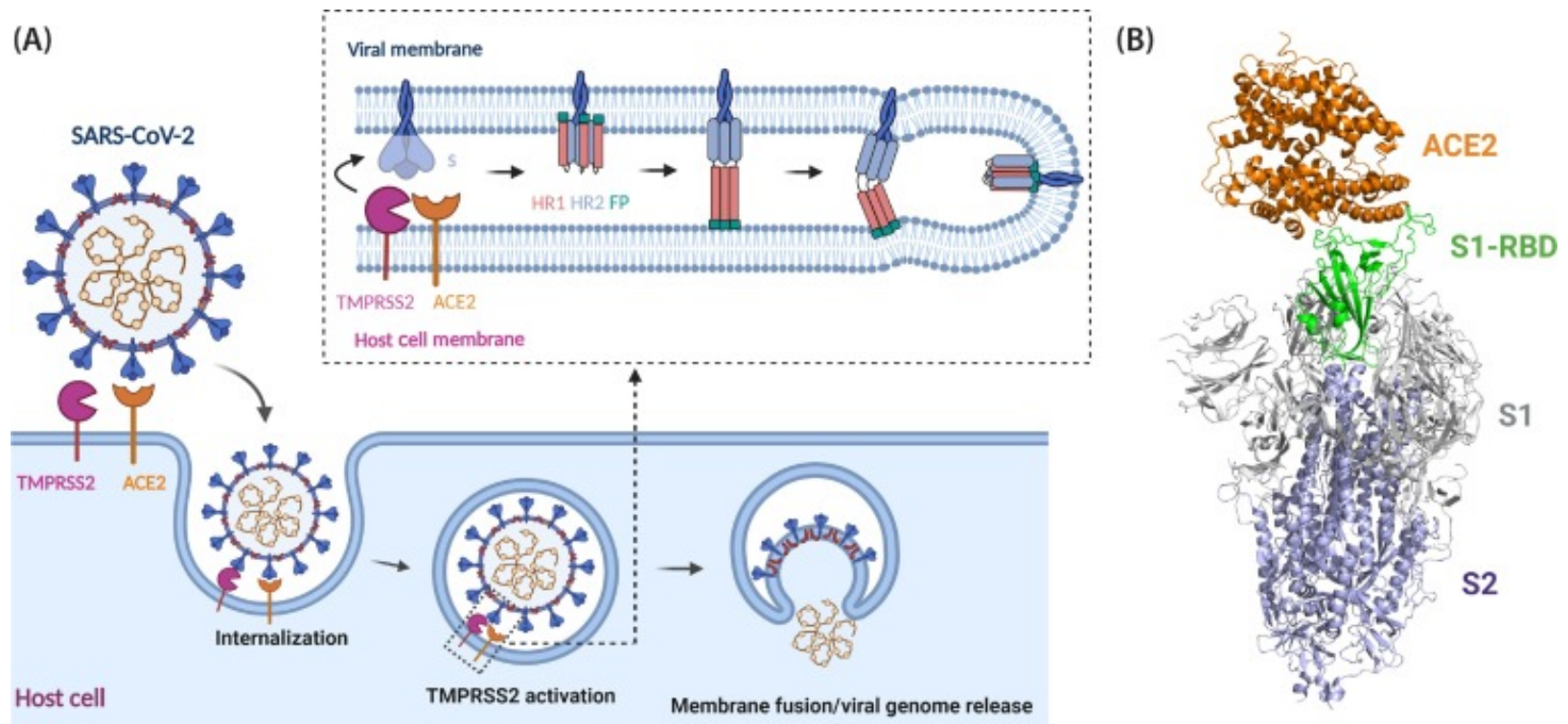


Covid-19 in SARS-CoV-2

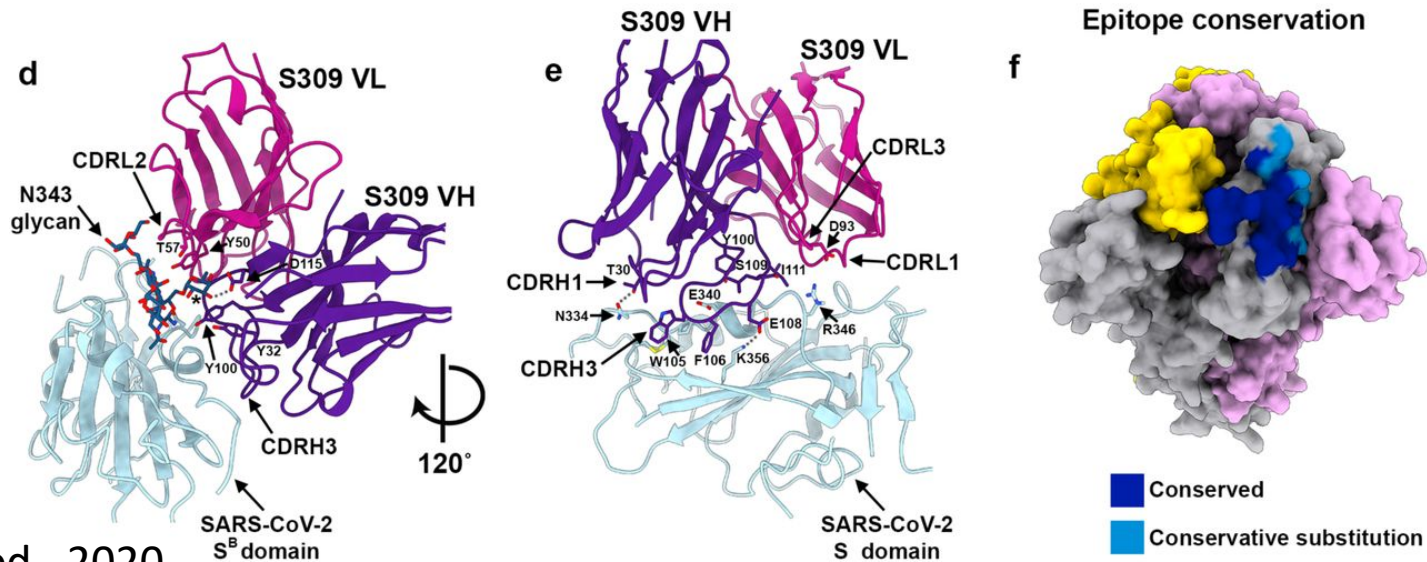
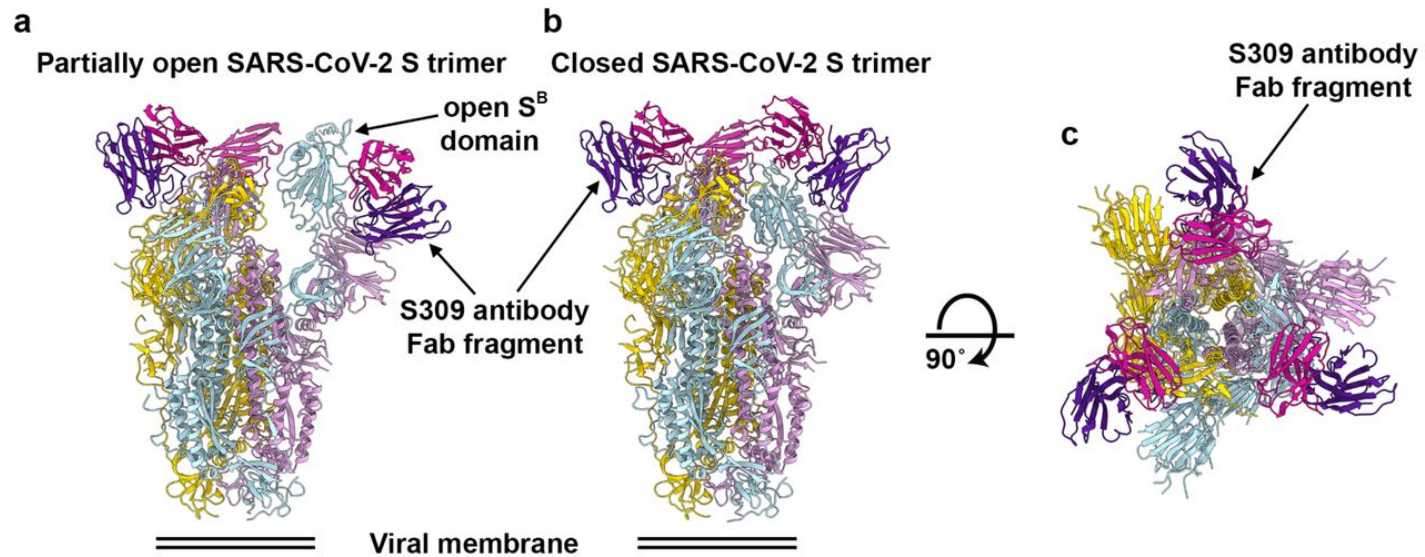
- 27 milijonov okuženih
- 900,000 žrtev



Mechanism of human cell infection



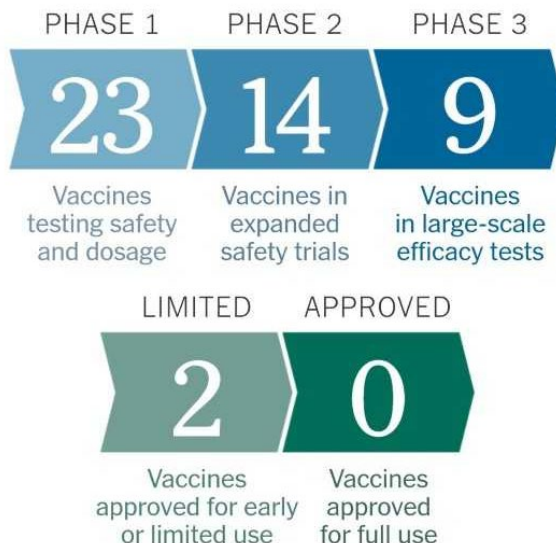
Neutralizacija virusa s protiteles



Cepivo kot najbolj obetavna pot iz krize

- Cepivo lahko zaščiti pred boleznijo ali/in pred okužbo in njenim širjenjem
- Visoka precepljenost prebivalstva lahko konča pandemijo

VACCINES
206
TOTAL



Leading Candidates

FARTHEST ALONG*	CLINICAL PHASE
Univ. of Oxford/AstraZeneca	III
Sinovac/Instituto Butantan	III
Wuhan Inst./Sinopharm	III
Beijing Inst./Sinopharm	III
Moderna	III
BioNTech/Fosun/Pfizer	II/III
CanSino Biologics	II
Inst. of Medical Biology	II
Anhui Zhifei Longcom	II
Novavax	I/II

Pristopi sodobnih cepiv proti SARS-CoV-2



Živa oslabljena cepiva

Codagenix



Inaktiviran virus

Sinovac



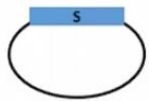
Rekombinantni virusni proteini

Novavax, U.Queensland, Sanofi



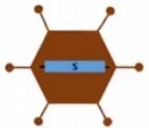
RNK cepivo

Moderna, CureVac, Pfizer



DNK cepivo

Inovio, Osaka univ, Genexine



Dostava z (adeno)virusi

UOxf/AstraZeneca, J&J, CanSino, Sputnik V

Inaktivirani virusi

- Sinovac (Kitajska) faza III
- Sinofarm 2x (Kitajska) faza III
- Bharat biotech (Indija) faza I/II
- Valneva/Dynavax (F) predklinika

- oslabljeni virus
 - Codagenix, Acibadem predklinika

Proteinska cepiva

- Novavax – spike(ZDA) faza I/II
 - Anhui (RBD dimer) Kitajska faza I/II
 - Vector – peptidi (RUS) faza I/II
 - Inst Finlay de Vacuunas RBD(Kuba) faza I/II
 - Addimune spike (Tajvan) faza I
 - U.Queensland (Avstralija) faza I/II
 - WestChina Sichuan RBD (Kitajska) faza I
 - Vaxine – spike (Avstralija) faza I
 - Clover/Dynavax – spike (ZDA) faza I
 - Sanofi -spike (F) faza I/II
 - Medicago (VLP, rastline) (ZDA) faza I
-
- +predklinika: Švedska, Danska, Kanada, Egipt, Argentina, Turčija, Nigerija, Italija, Kazahstan

Adenovirusna cepiva

- CanSino (Kitajska) faza III
- Uox/Astra-Zeneca (UK) faza III
- Sputnik V (RUS) faza I/II *registracija
- J&J (ZDA) faza I/II
- ReiThera (IT) faza I
- >10 predklinika: Francija, Nemčija, Turčija, Kanada, Španija...

mRNK cepiva

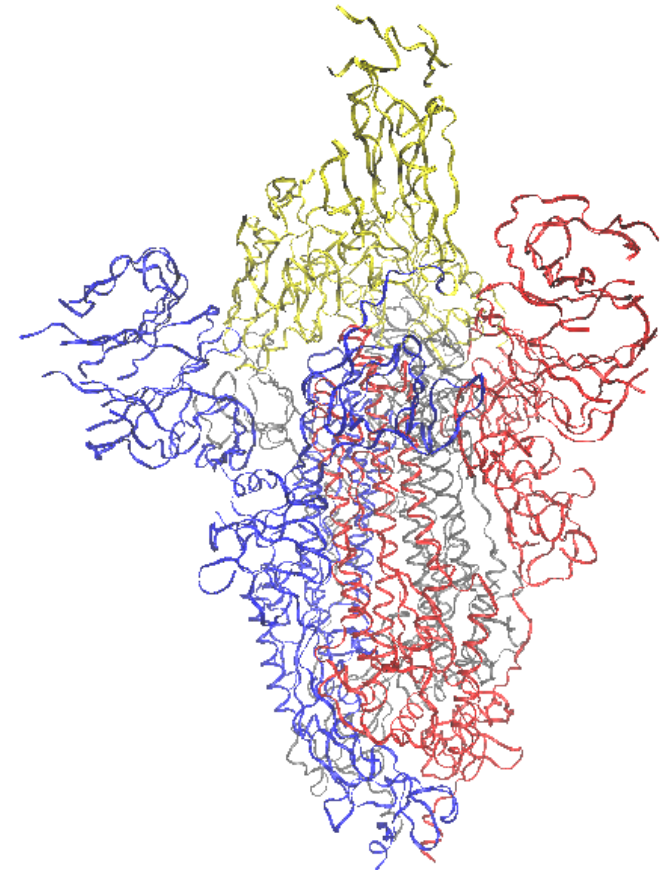
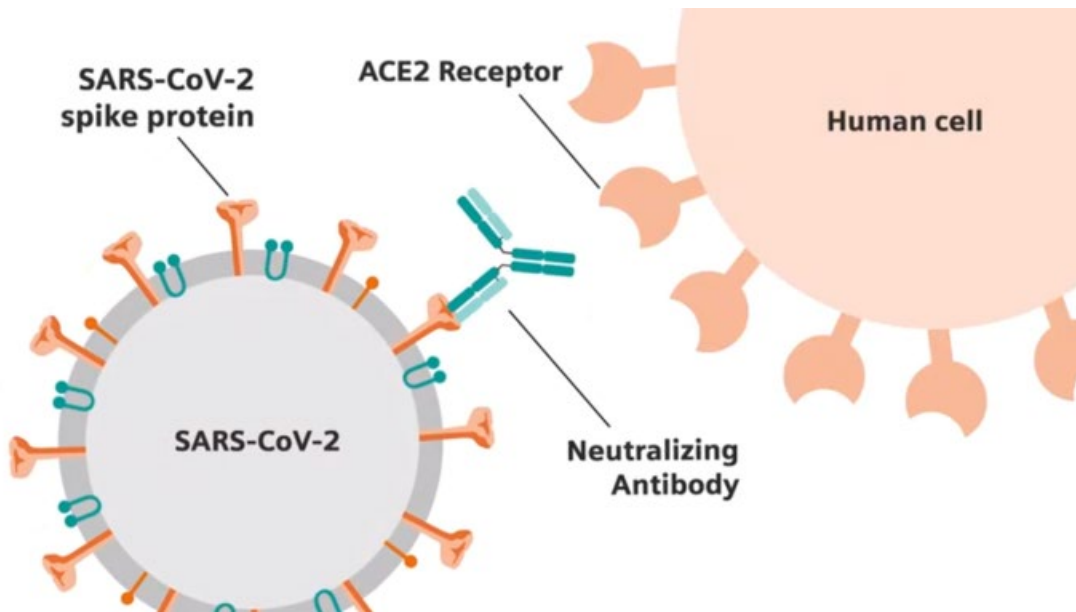
- Moderna (ZDA) faza III
- Pfizer/BioNTech (ZDA, Nemčija) faza III
- Arcturus (ZDA) faza I/II
- Imperial college (samorep. RNA) faza I/II
- Curevac (Nemčija) faza I/II
- PLA (Kitajska) faza I/II
- + predklinika Japonska, Rusija, Belgija, Španija, Nizozemska

DNK plazmidna cepiva

- Osaka univ/(JP) faza I/II
- KAIST (JKoreja) faza I/II
- Inovio (ZDA) faza I/II
- Zydus cadila (Indija) faza I/II
- +predklinika Danska, ZK, Turčija, Italija, Tajska, Kanada, Švedska,

Strategija priprave cepiva na KI

- DNK cepivo
- Izbor najbolj obetavne virusne domene za nevtralizacijska protitelesa – RBD (domena, ki prepozna receptor)

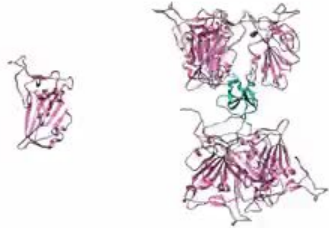


DNK cepiva

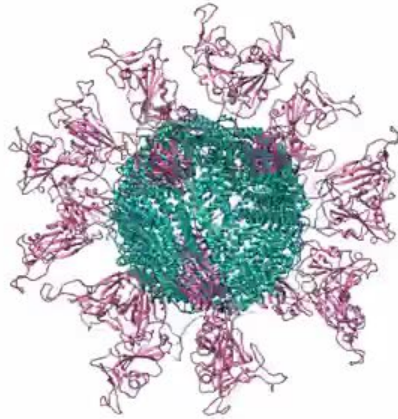
- Plazmidna DNK, ki vsebuje zapis za virusni protein za izražanje v človeških celicah
- Prednosti:
 - Hiter dizajn in adaptacija za nove viruse
 - Stabilnost – ni potrebna uporaba zamrzovalnikov
 - Enostavna produkcija – optimizirana produkcija v 1 tednu v industrijskem fermentorju za celo Slovenijo
- Slabosti:
 - manj učinkovit vnos v celice kot z virusi (adenovirusi)
 - slabše izražanje proteinov kot mRNA
- Nobeno DNK cepivo še ni bilo odobreno za človeško uporabo (tudi ne mRNK)
- DNK cepiva proti Covid-19 so trenutno že v kliničnem testiranju v ZDA, na Japonskem, v Južni Koreji

Dizajn nanodelcev za cepivo

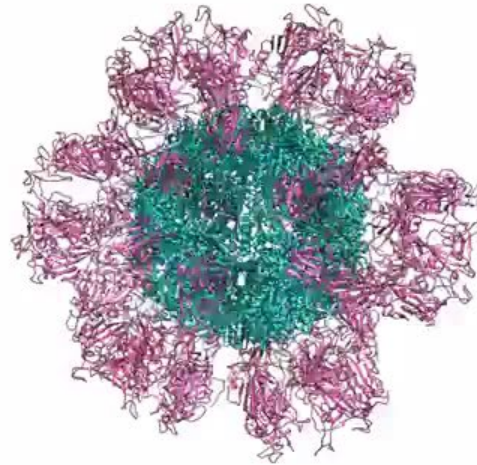
RBD RBD-foldon-RBD
27 AK



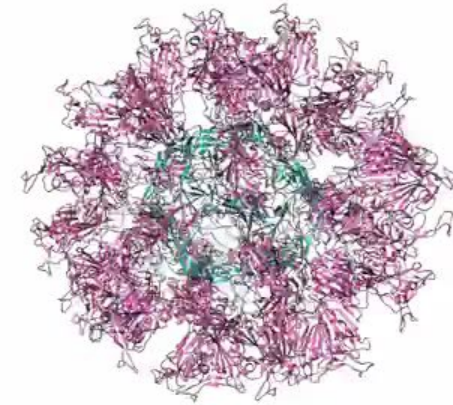
RBD-feritin
173 AK



RBD-Lumazin sintaza
153 AK



RBD-bann
24 AK



Kopij RBD/delec

1

6

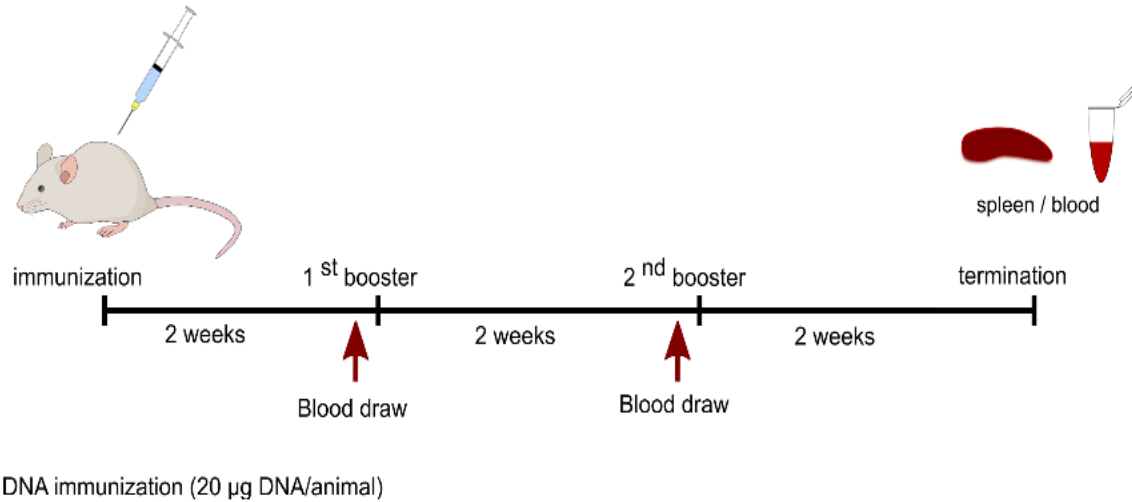
24

60

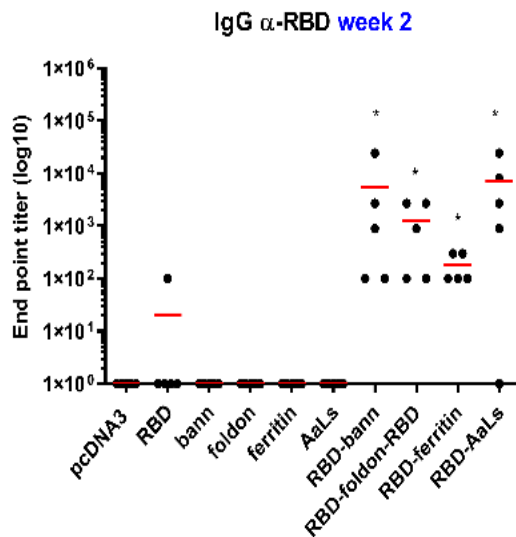
>60

Titer protiteles proti RBD z različnimi ogrodji

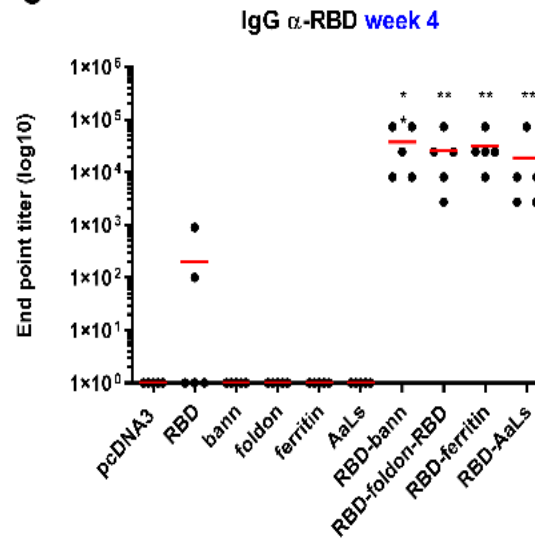
a



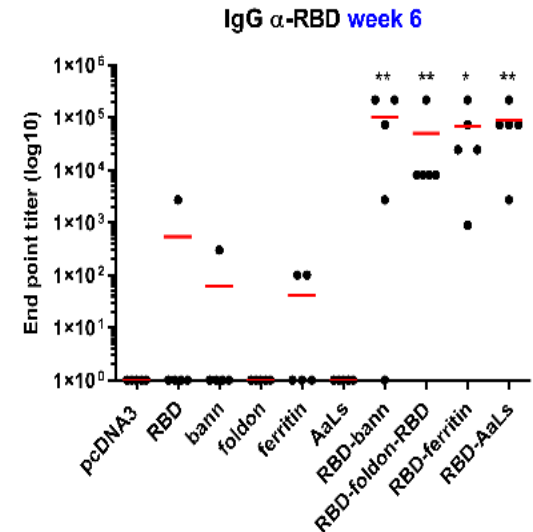
b



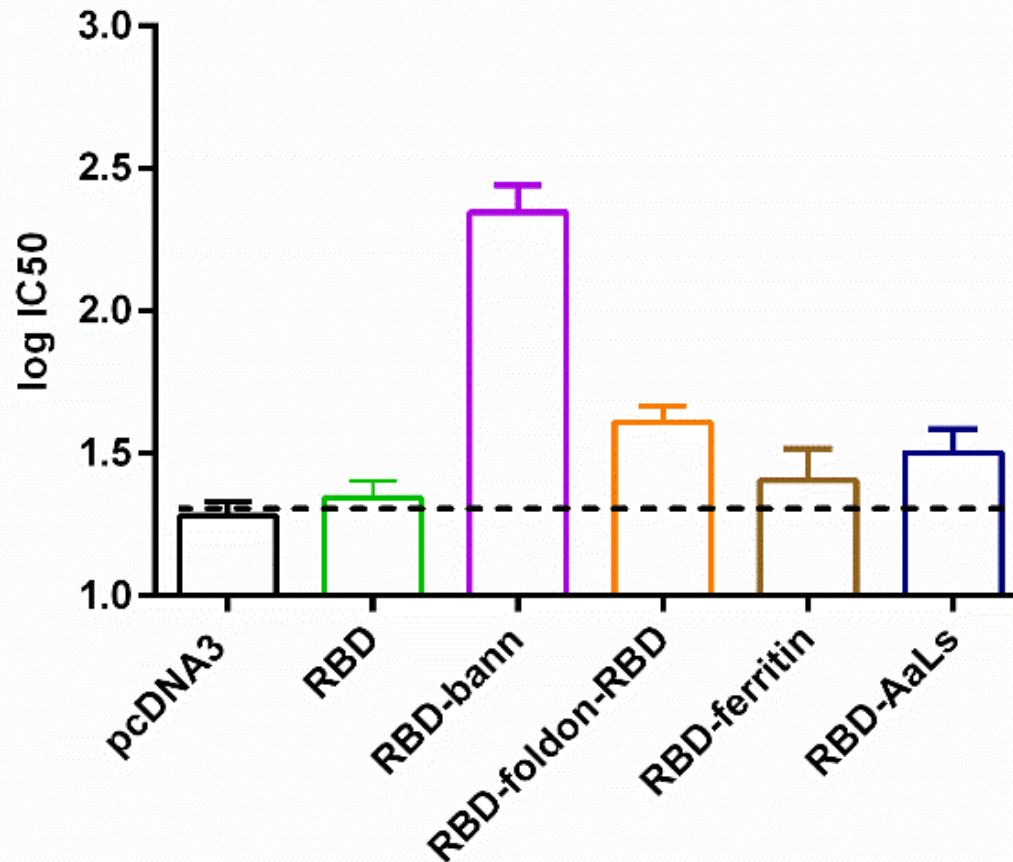
c



d

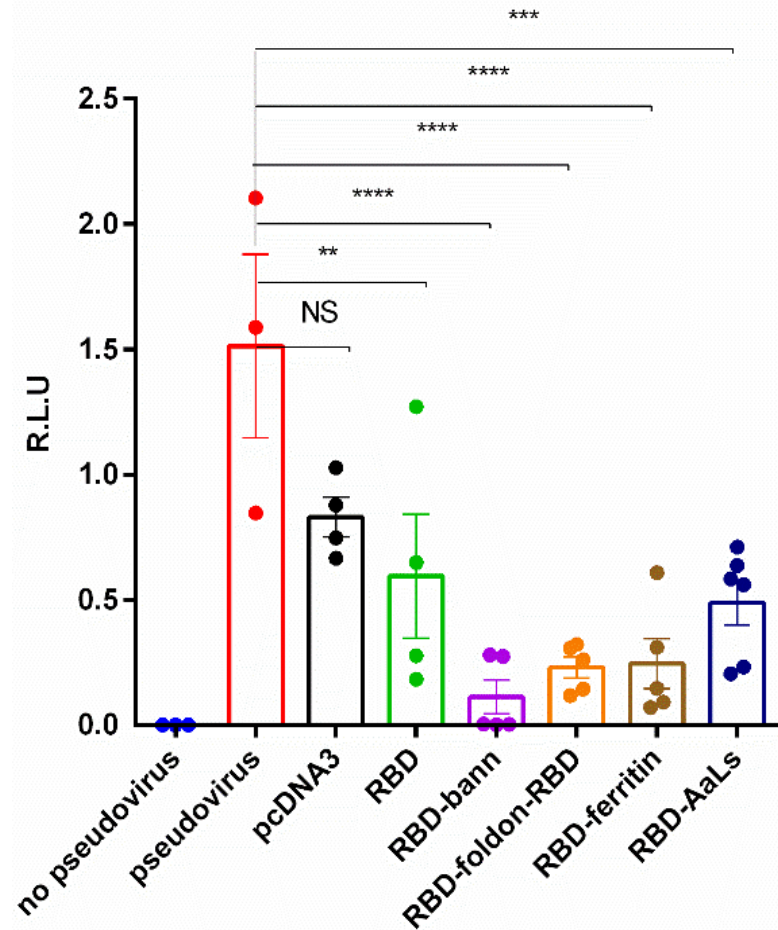
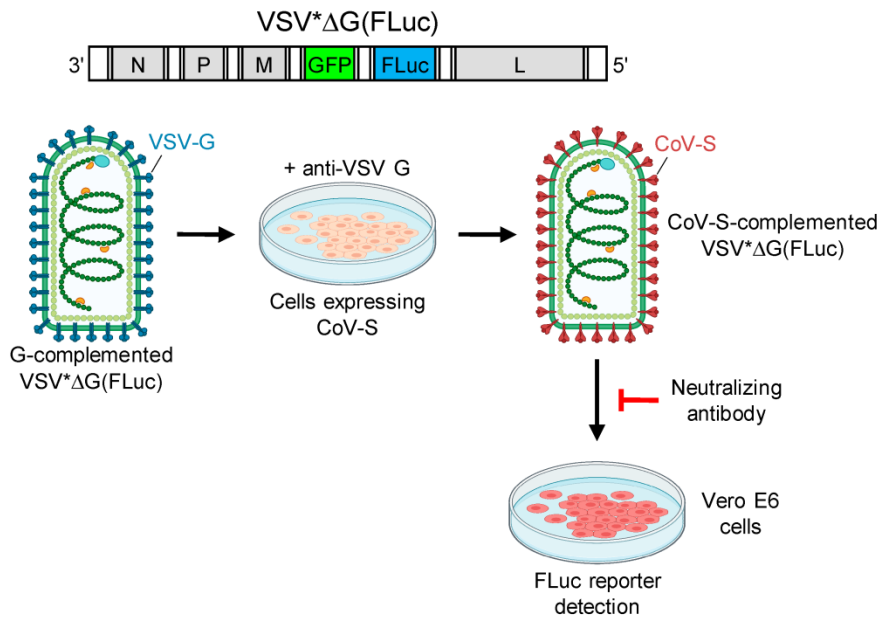


Nevtralizacija vezave virusa na receptor

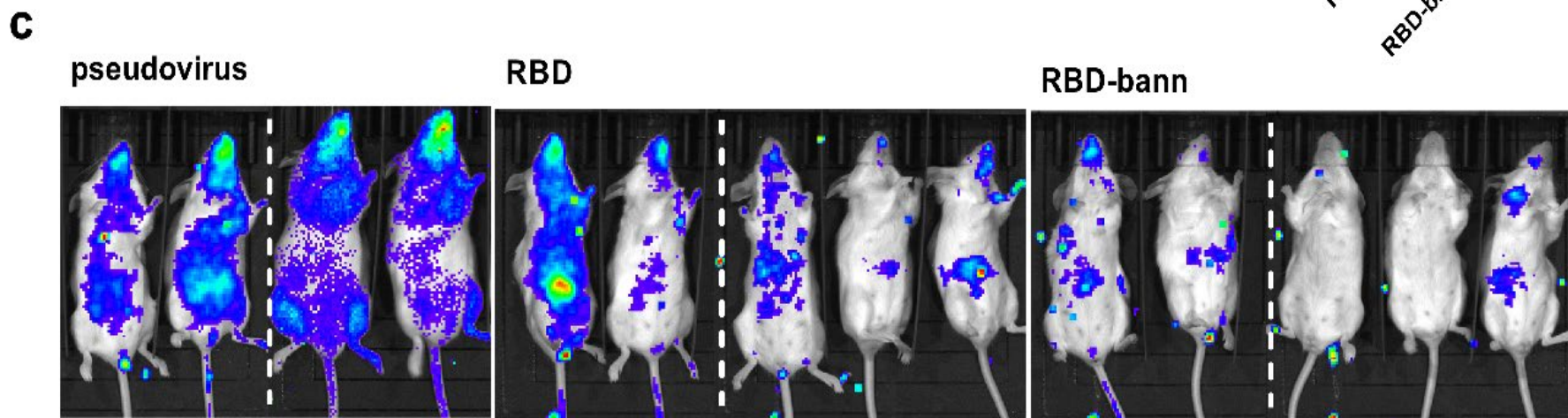
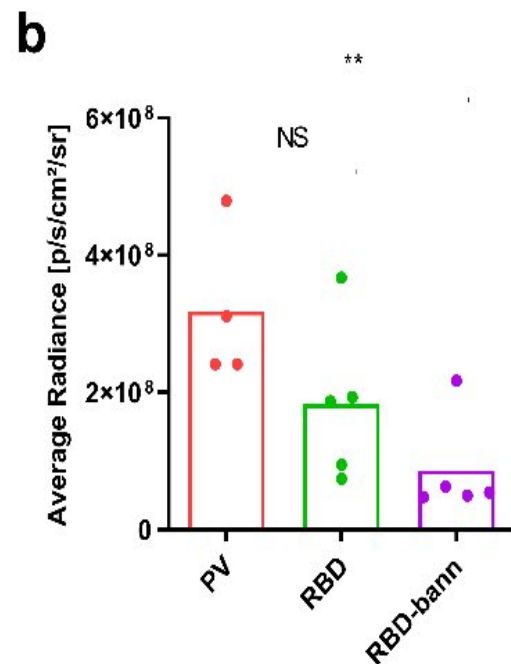
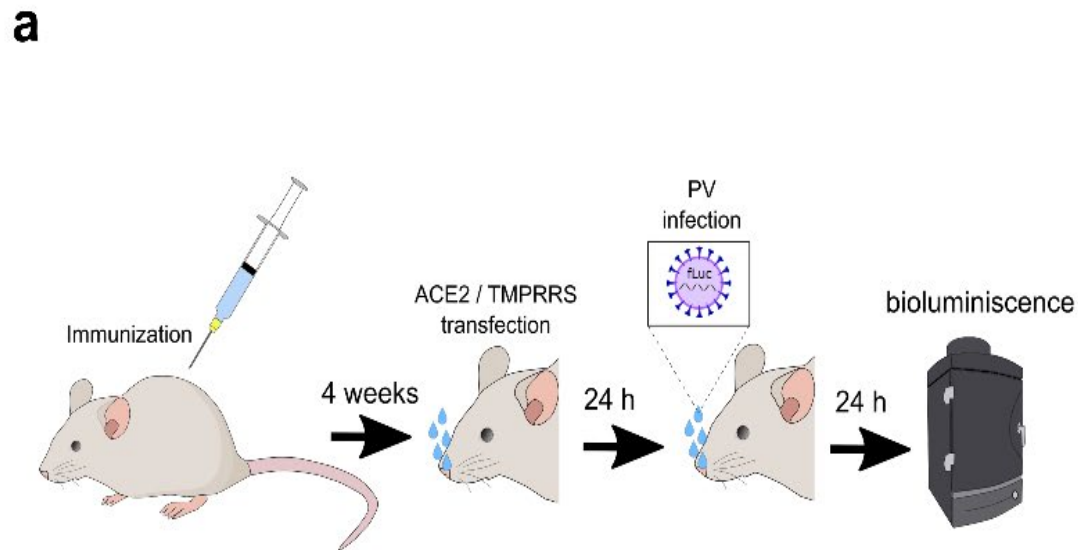


Neutralizacija (psevdo)virusne infekcije

- Priprava testa



Inhibicija okužbe



Pomen rezultatov

- Uporaba kot osnova za cepivo proti Covid-19
- Rezultati še ne pomenijo, da je cepivo primerno za uporabo
- Do odobritve cepiva je še dolga pot in zahteven regulatorni postopek
- Ali bo cepivo zaščitilo ljudi je potrebno ugotoviti v kliničnem testiranju
- Inovativna tehnološka platforma za cepiva (drugi znani in bodoči virusi, SARS3 ?)

Naslednji koraki

- Dokončanje eksperimentov glede mehanizma delovanja
- Priprava vloge za klinično testiranje
- Konzorcij sodelavcev za CRP projekt:
 - Kemijski inštitut
 - Veterinarska fakulteta UL
 - Fakulteta za farmacijo UL
 - Infekcijska klinika
 - Univerzitetna bolnišnica Golnik
 - Jafra
- Odločitev o kliničnem testiranju, izvedba (čas in denar), 1. in 2.fazo bi lahko izvedli v Sloveniji, 3.faza mednarodno

Perspektive

- Do konca leta lahko pričakujemo prve rezultate faze III in začetek uporabe v prvi polovici 2021
- Cepiva bodo zagotovo igrala v medicini zelo pomembno vlogo
- Prihodnost zagotovo pripada načrtovanim cepivom na osnovi komponent
- Cepiva bodo bolj učinkovita in varna zaradi uporabe definiranih adjuvansov, mehanizem nekaterih bo še bolj podrobno raziskan
- Strukturna biologija bo igrala pomembno vlogo pri dizajnu epitopov
- Še hitrejši odziv na pandemije lahko postane realnost
- Proti virusom družine SARS je potrebno pripraviti „univerzalna cepiva“ in zdravila

Zahvala

Duško Lainšček

Tina Fink

Vida Forstnerič

Iva Hafner-Bratkovič

Sara Orehek

Žiga Strmšek

Mateja Manček-Keber

Peter Pečan

Tina Šket

Hana Esih

Špela Malenšek

Jana Aupič

Petra Dekleva

Tjaša Plaper

Sara Vidmar

Lucija Kadunc

Mojca Benčina

Neža Omersa

Gregor Anderluh

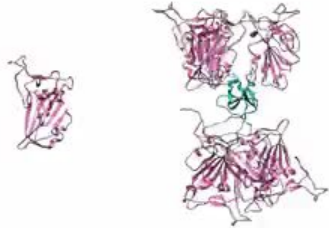
Florence Pojer, Kelvin Lau, David Hacke, Bruno
Correia EPFL

David Peterhoff, Ralf Wagner Uni. Regensburg

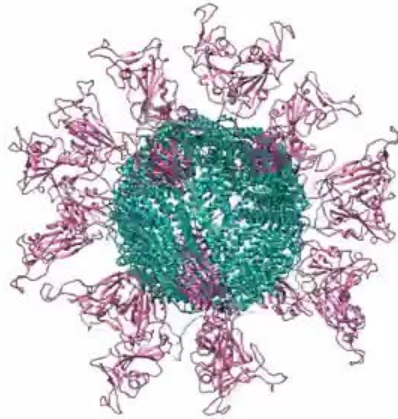


Dizajn nanodelcev za cepivo proti Covid-19

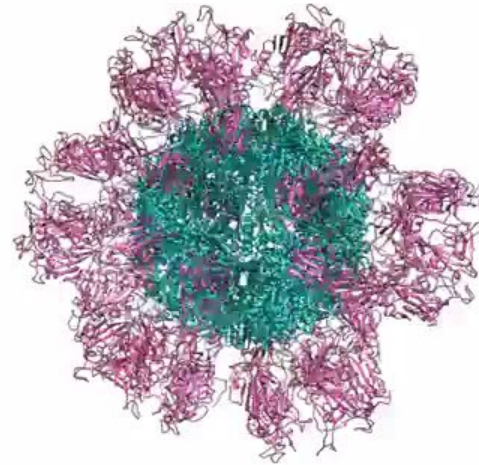
RBD RBD-foldon-RBD
27 AK



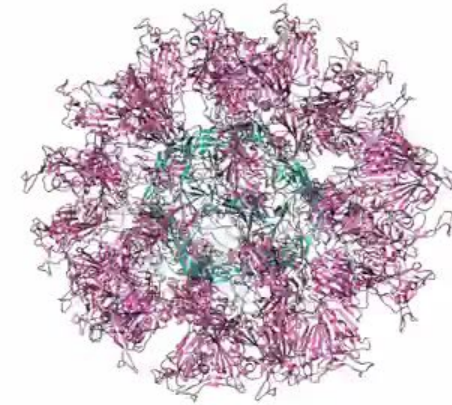
RBD-feritin
173 AK



RBD-Lumazin sintaza
153 AK



RBD-bann
24 AK



Kopij RBD/delec

1

6

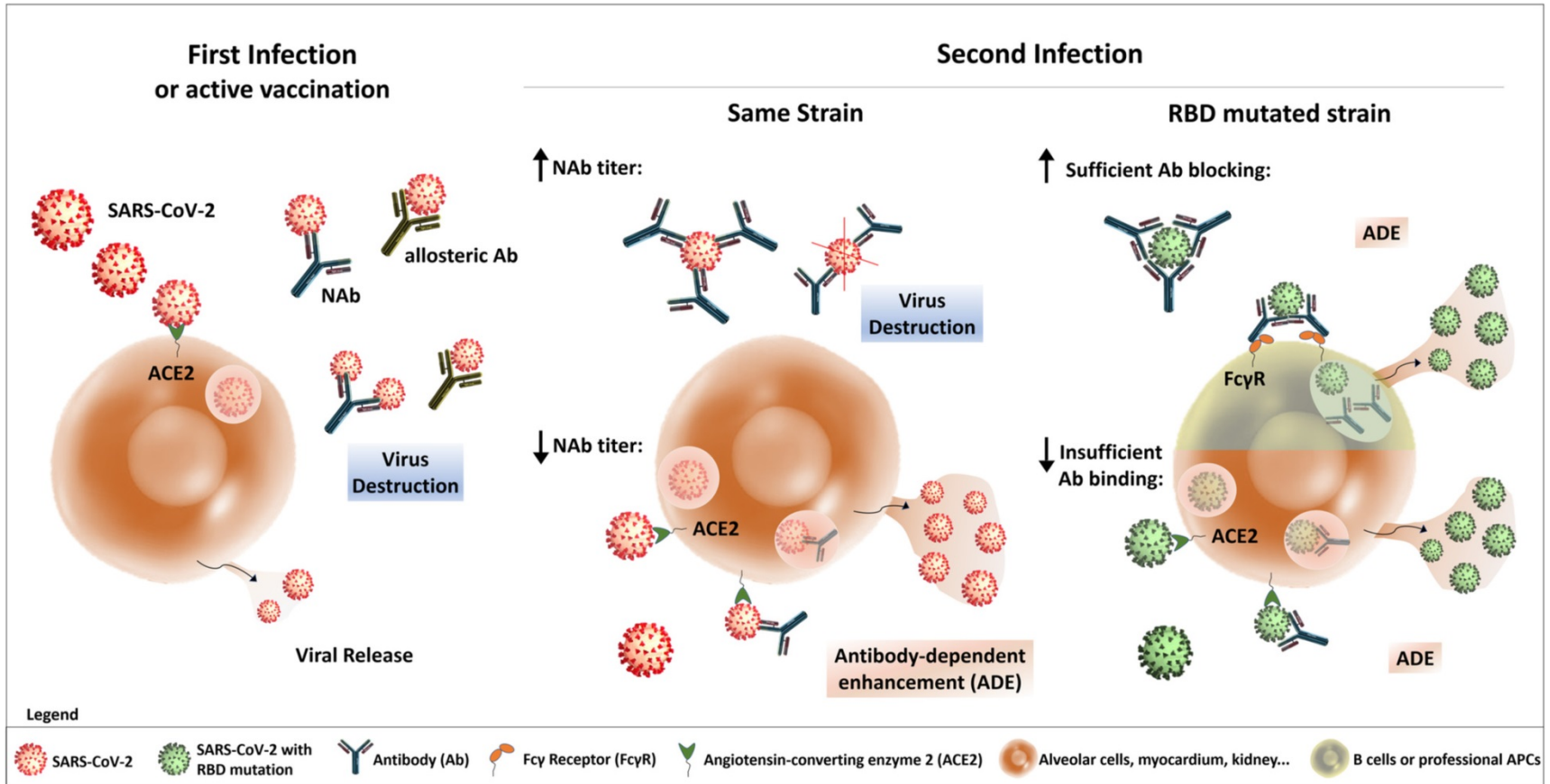
24

60

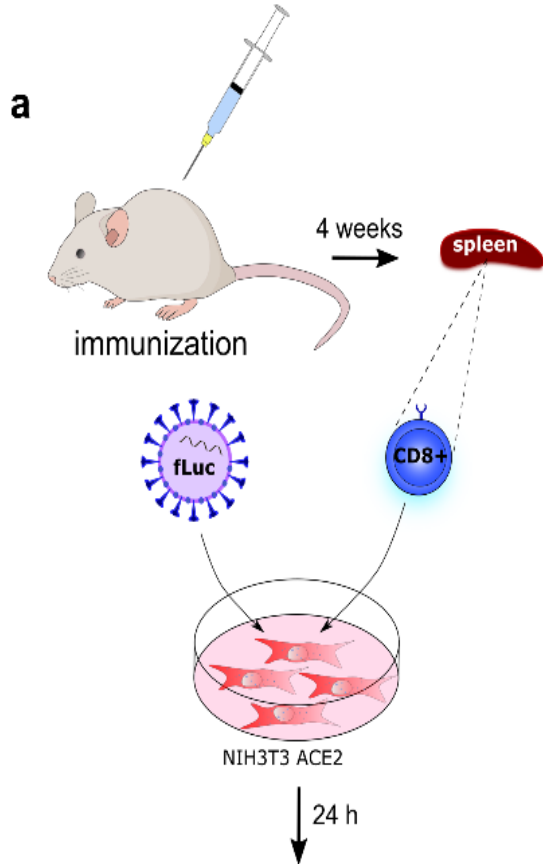
>60

Podrobnosti: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.28.244269v1>

Potencialna nevarnost ADE



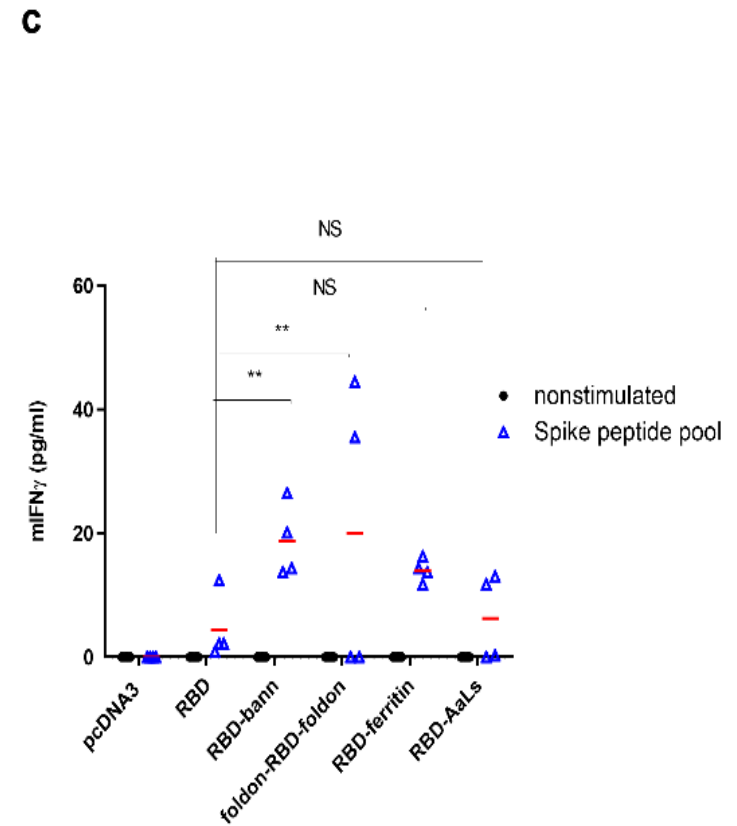
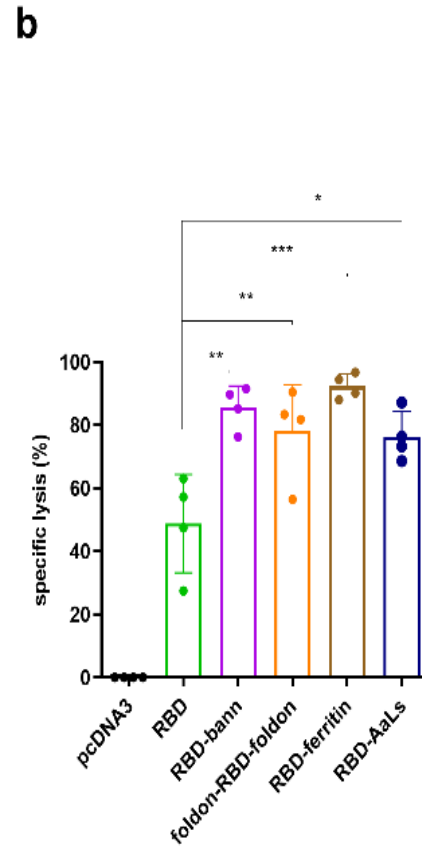
Celični odziv



Output:

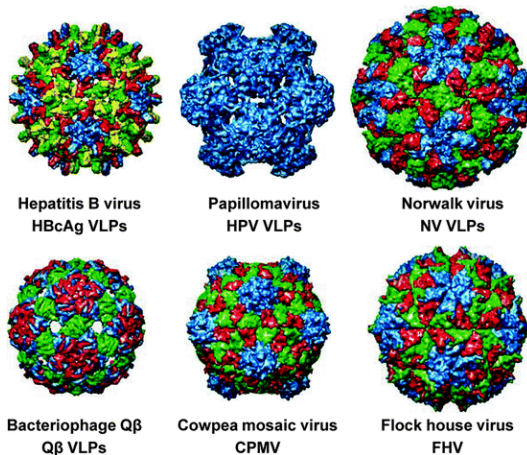
A: bioluminescence

B: no bioluminescence = specific T-cell lysis

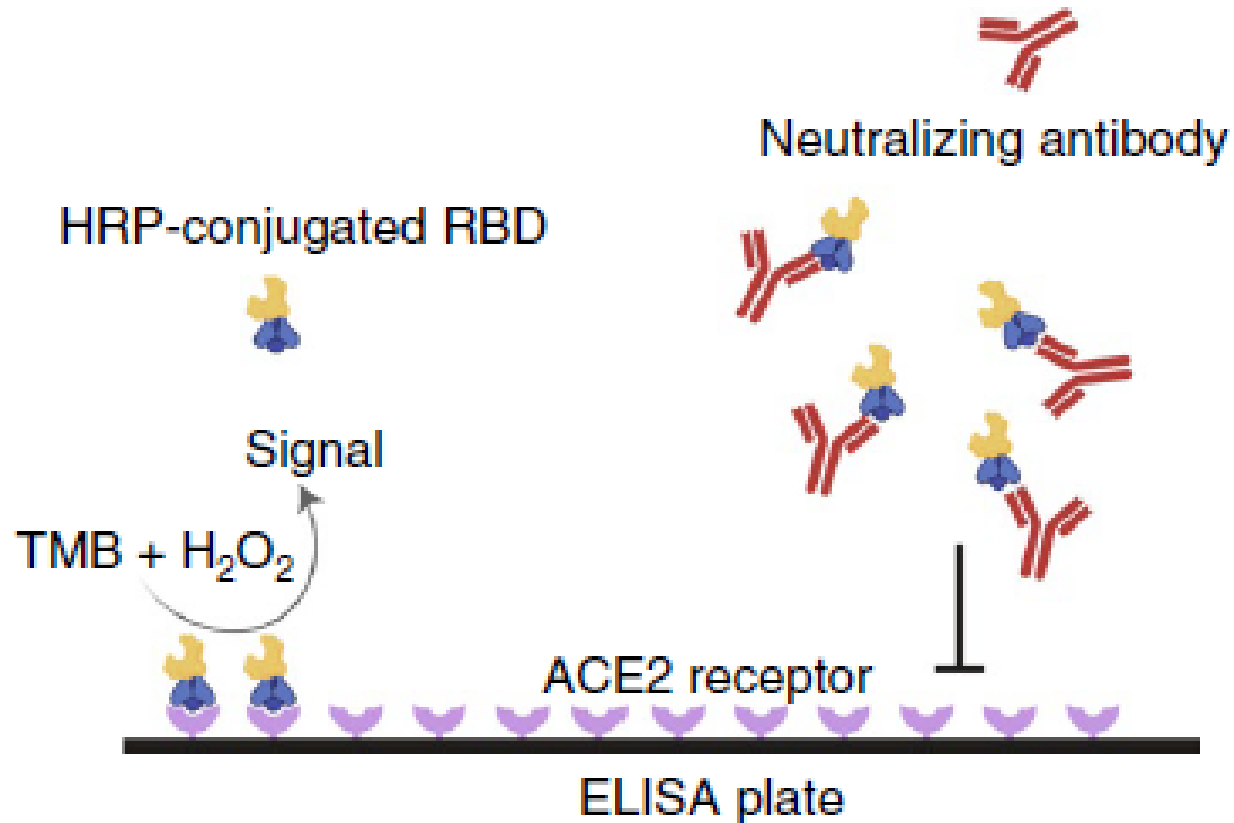


Virusom podobni delci (VLP)

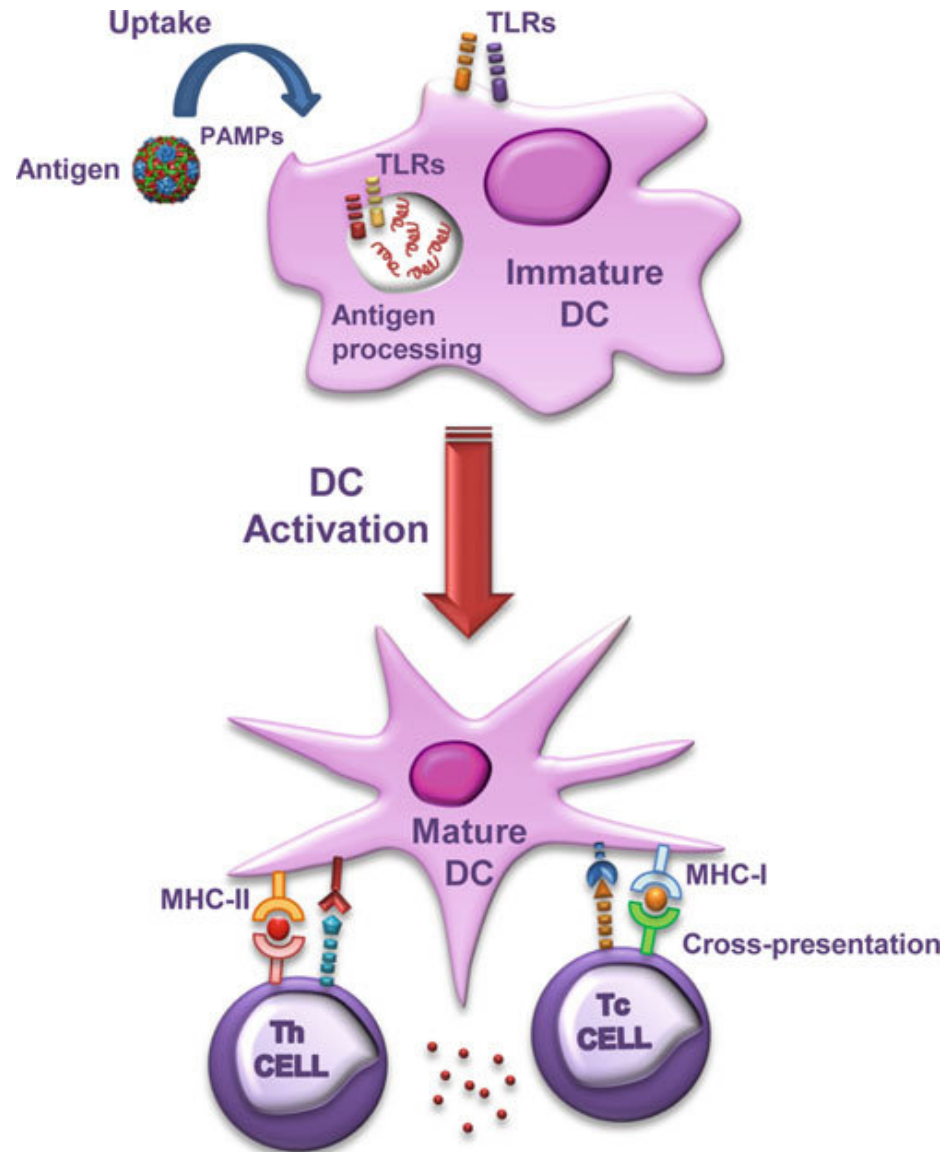
- Šibek imunski odziv na majhne monomerne proteine
- Dober odziv na delce >10 nm, ki površini predstavijo večje število kopij virusnega proteina
- Cepiva proti gripi, HIV-1, Ziki, malariji...



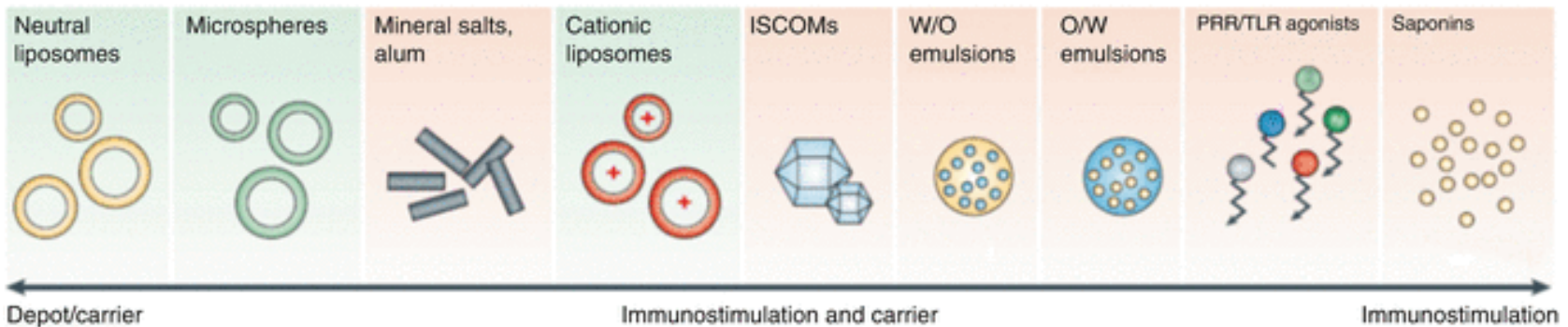
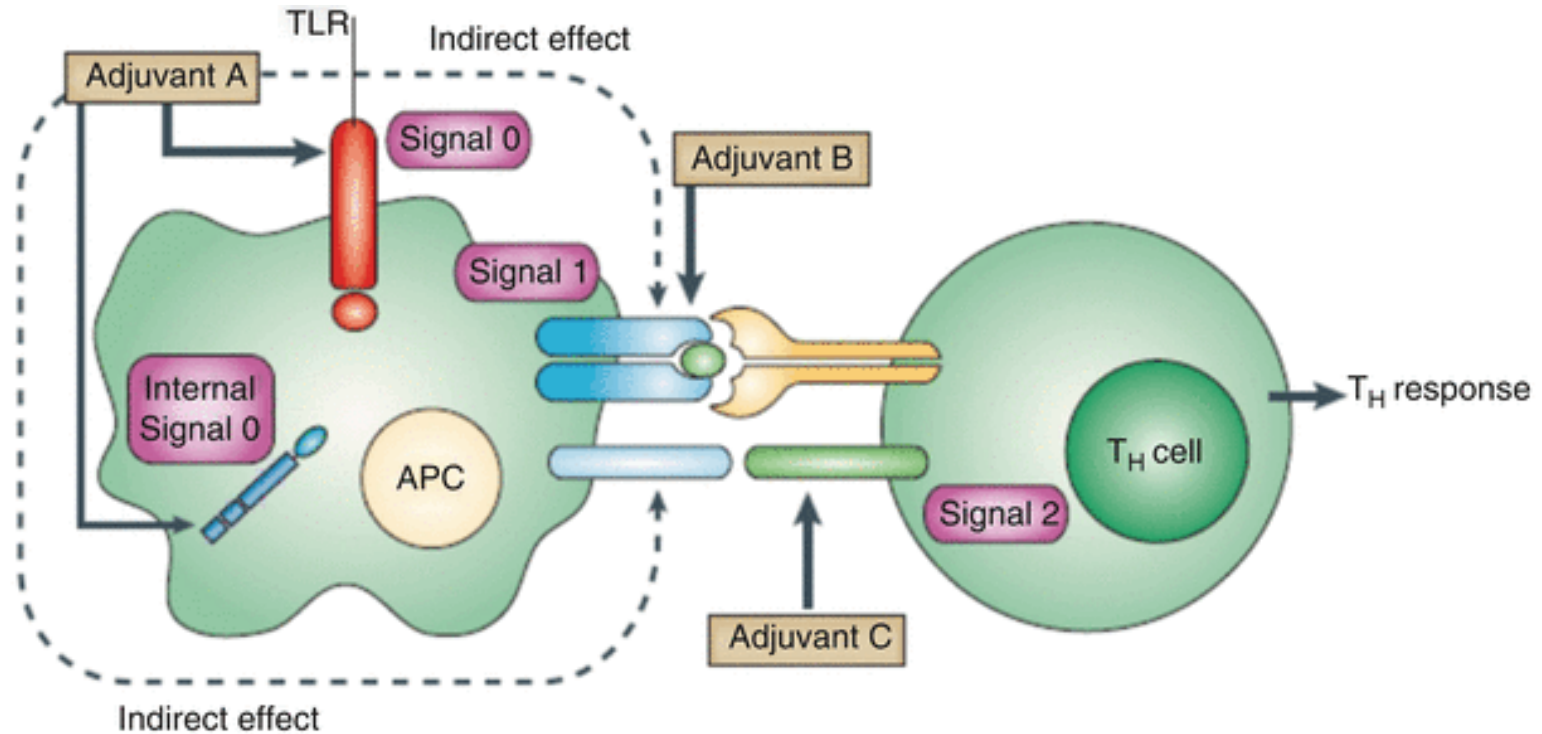
Princip določanja nevtralizacije vezave virusa na receptor



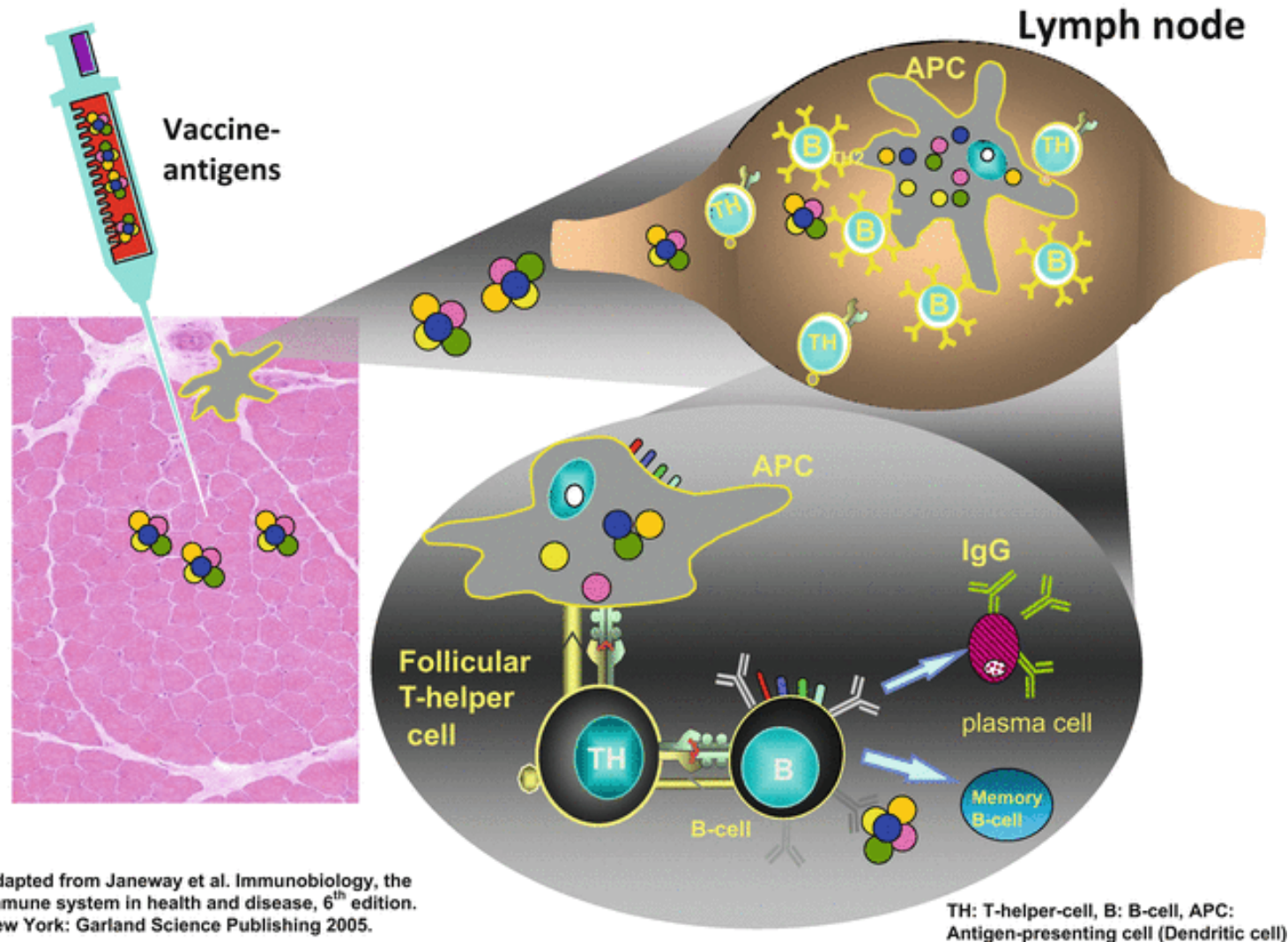
Povezava med naravno in pridobljeno imunostjo



Princip delovanja cepiv



Zorenje B celic



Adapted from Janeway et al. Immunobiology, the immune system in health and disease, 6th edition. New York: Garland Science Publishing 2005.

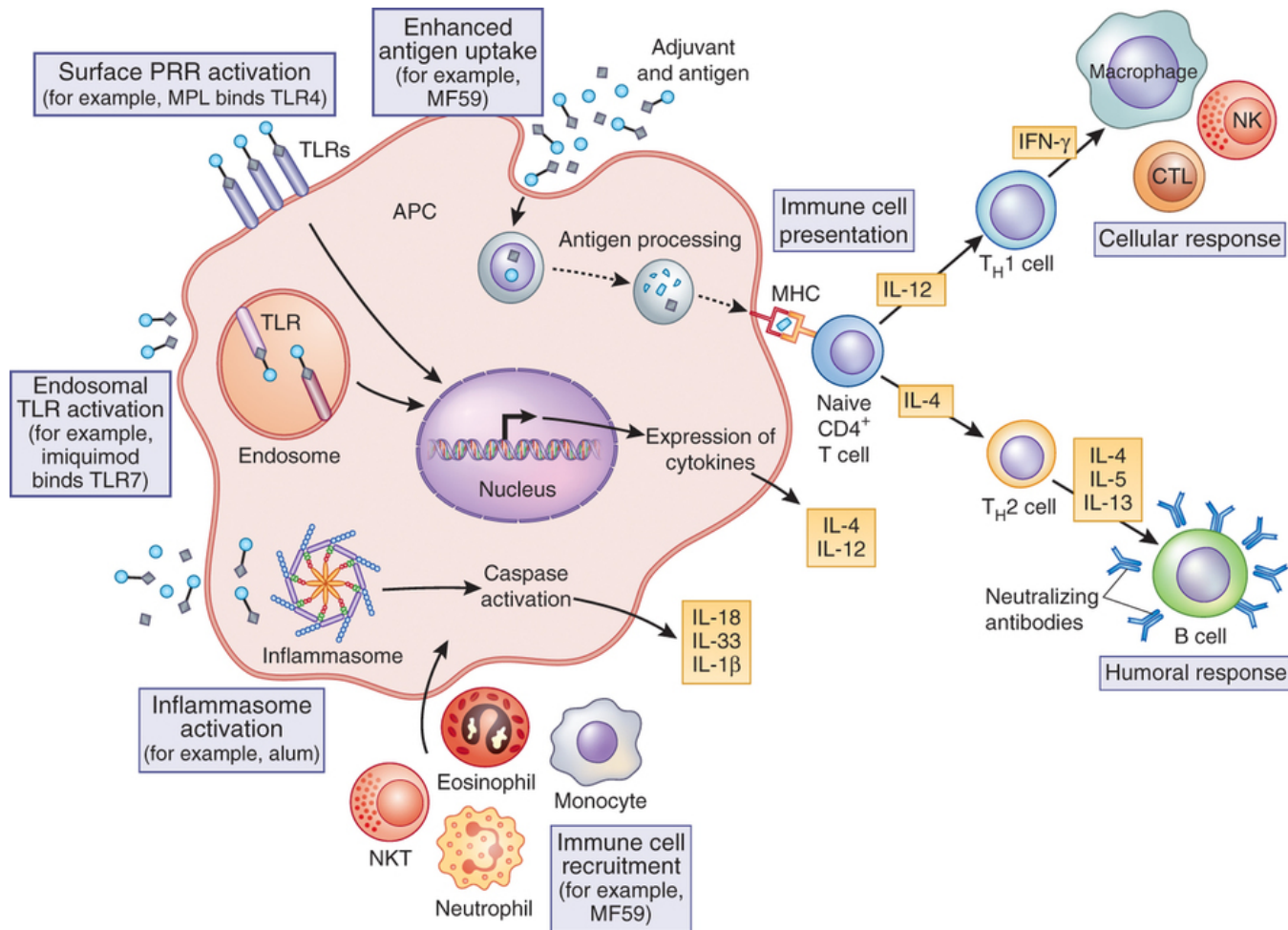
Zgodovina razvoja adjuvansov

Year	Vaccine	Adjuvant and mechanism	Scientific findings
1885	Rabies	ssRNA TLRs 7 and 8	
1886			Briegen describes endotoxin
1889			Coley shows tumor necrosis with bacterial extracts
1911	Typhoid	LPS, DNA TLRs 1, 2, 4, 5, 6 and 9	
1916		Lipovaccine	More durable immune response to typhoid vaccine
1921	BCG for TB	DNA, lipoprotein TLRs 1, 2, 6 and 9	
1926		Aluminum salts	Enhanced antibody responses to diphtheria vaccine
1937		Incomplete Freund's adjuvant (IFA) (water-in-oil emulsion)	Enhanced cellular and antibody responses to TB
1942	Diphtheria, pertussis and tetanus	LPS, DNA TLRs 1, 2, 4, 5, 6 and 9	
1949	Whole-cell influenza	ssRNA TLRs 7 and 8	
1955	Inactivated polio vaccine	ssRNA TLRs 7 and 8	
1966			LPS structure determined
1979			Ribi makes detoxified endotoxin MPL
1991	Hepatitis A		MPL tested in clinic
1996			TLRs discovered
1997	Fluad	MF59 (oil-in-water emulsion)	
1997	Epaxal (for hepatitis A) Inflexal (for influenza)	Virosome	
1998			LPS shown to be TLR ligand
2004	Invivac (for influenza; Europe)	Virosome	
2005	Fendrix (for hepatitis B; Europe)	MPL Defined TLR4	
2007–2009	Pandemic influenza vaccines (Europe)	MF59, AS03 (oil-in-water emulsion)	
2009	Cervarix (for HPV16 and HPV18; USA)	MPL Defined TLR4	

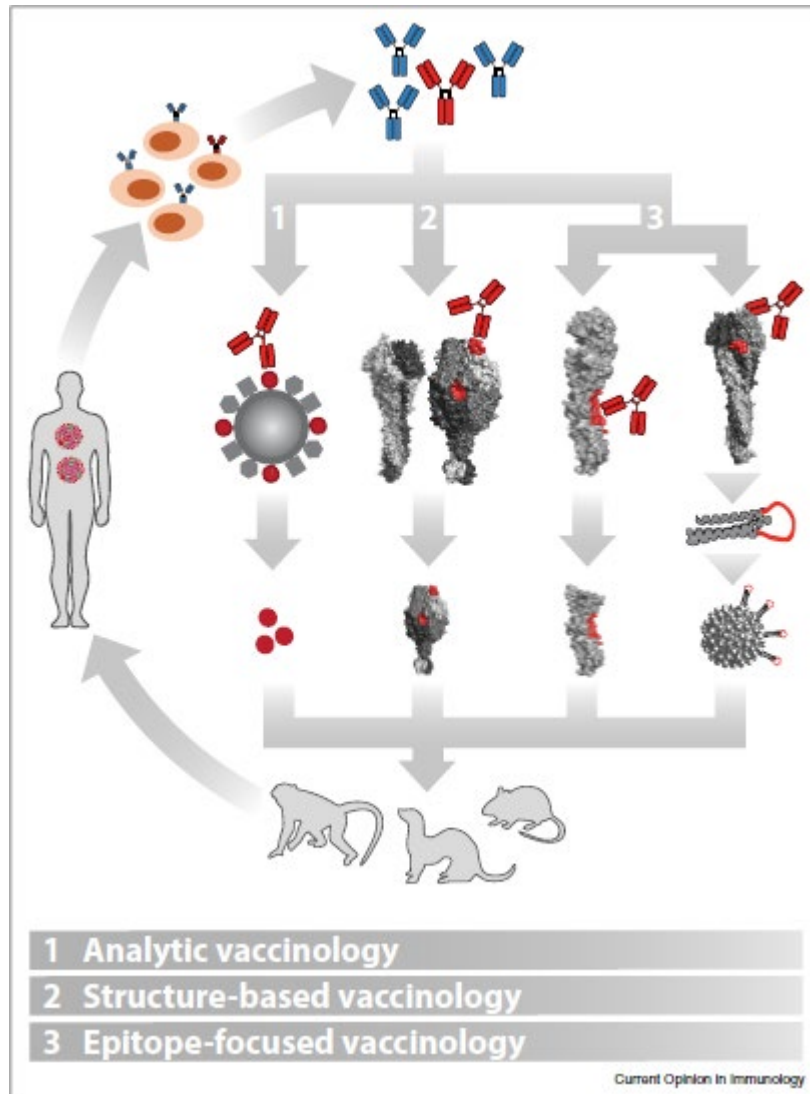
Adjuvansi v cepivih

- **Anorganske spojine:** aluminijev hidroksid, aluminijev fosfat, kalcijev fosfat
- **Mineralna olja:** parafinsko olje, emulzija
- **Bakterijske komponente:** mrtve bakterije *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium bovis*, toksoidi, kombinacija z mineralnimi olji: Freundov kompletni adjuvans, Freundov nekompletni adjuvans
- **Lipidi:** skvalen, MF59, AS03
- **Detergenti, saponini:** Quil A, sponini Quillaje, soje, Polygala senega
- **Citokini:** IL-1, IL-2, IL-12
- **Agonisti TLR:** MPLA, ODN, imidazokinolini, flagelin

Mehanizem delovanja adjuvansov



Izbor molekulske komponente za cepiva



1. Analiza epitopov učinkovitih cepiv
2. Analiza vezave IgG na virulenčne dejavnike patogena
3. Izbor ohranjenih in funkcionalno pomembnih epitopov in njihova prezentacija

Receptor characteristic	Innate immunity	Adaptive immunity
Specificity inherited in the genome	Yes	No
Expressed by all cells of a particular type (eg, macrophages)	Yes	No
Triggers immediate response	Yes	No
Recognizes broad classes of pathogen	Yes	No
Interacts with a range of molecular structures of a given type	Yes	No
Encoded in multiple gene segments	No	Yes
Requires gene rearrangement	No	Yes
Clonal distribution	No	Yes



"Lockdown may have ended, but people still need your help"
Les Badass Solidaires,
Belgium



"Our lab is working to provide a faster and cheaper way to prepare a vaccine"
Roman, Slovenia

*"We are stronger together
is our strength
Europe, solidarity"*
Parliament
David Sassoli
President of the European
stronger.together.eu

