

IZS

T E R A M O

/

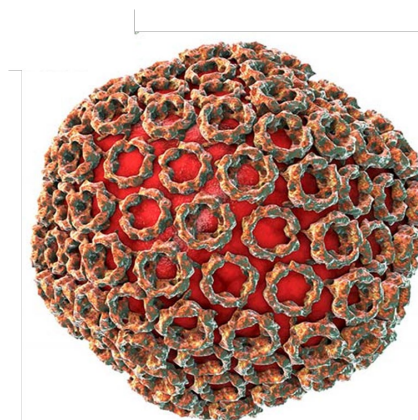
ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPOREALE"

Vaccino DIVA a subunità contro la Rift Valley Fever: un approccio innovativo per la protezione contro virus emergenti (IZS AM 03/24 RC) – Risultati preliminari –

Anna Serroni, PhD
Ricercatore Sanitario
IZSAM

Rift Valley fever

- Malattia virale zoonotica che colpisce i ruminanti domestici (pecore, capre e bovini), con importanti conseguenze sanitarie ed economiche.
- Trasmissione vettoriale
- **Ordine:** Bunyavirales
Famiglia: Phenuiviridae
Genere: Phlebovirus
Specie: *Rift Valley fever phlebovirus*
- Virus enveloped di forma sferica, diametro: 80–120 nm
- Glicoproteine di superficie (Gn e Gc), coinvolte nell'adesione alla cellula ospite e nell'ingresso virale. Sono bersaglio della risposta immunitaria
- Genoma: tre segmenti RNA a singolo filamento (ssRNA) : S, M e L



Rift Valley fever virus particles illustration.
Credit: Kateryna Kon/science

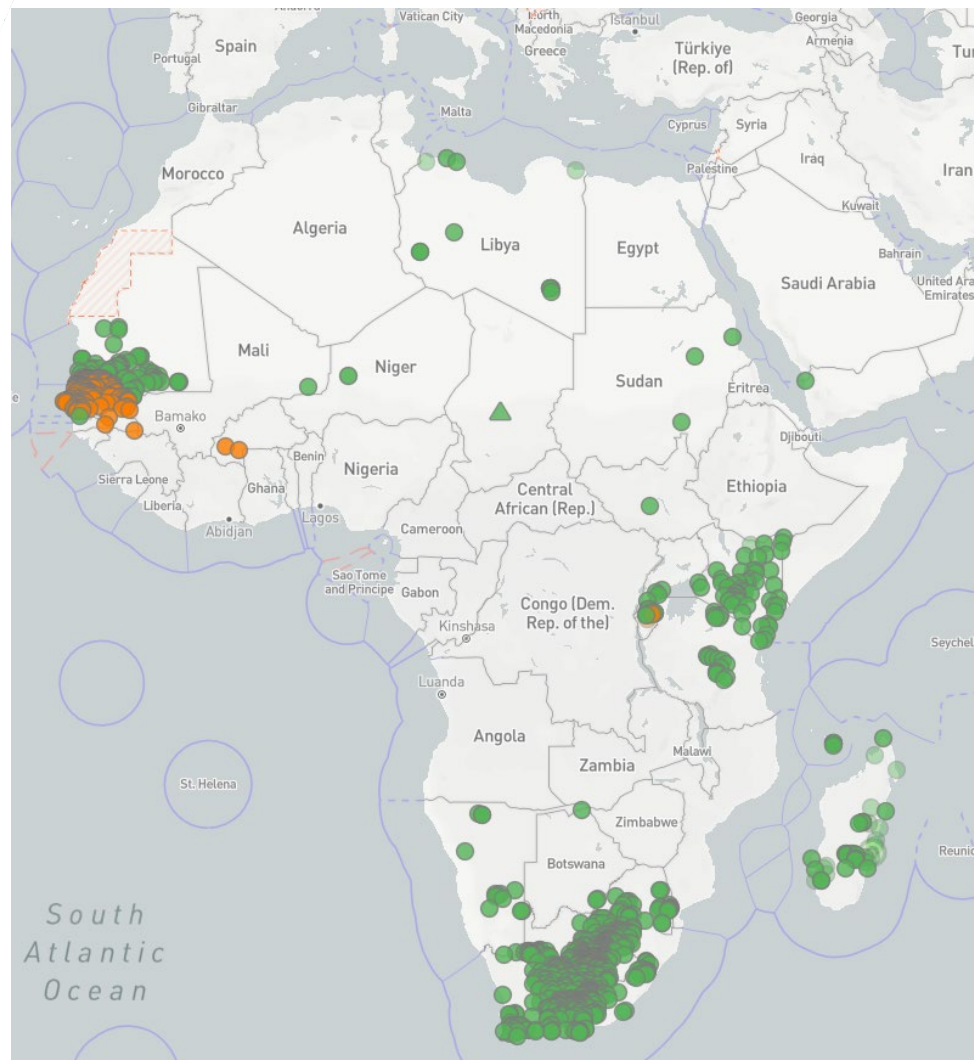
IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Epidemiologia



Verde : focolai risolti

Arancione: focolai in corso

Source: WAHIS: Animal Health Data

Vaccini Rift Valley Fever

Vaccini veterinari disponibili (utilizzati nelle aree endemiche):

- Vaccini vivi attenuati:
 - Smithburn
 - Clone 13

Immunità forte e duratura; problemi di sicurezza (aborti ed effetti teratogeni)



- Vaccini inattivati:
 - Vaccini inattivati per Rift Valley Fever

Miglior profilo di sicurezza rispetto ai vaccini vivi attenuati; somministrazioni e richiami periodici per mantenere protezione immunitaria.

Vaccini Rift Valley Fever

- Incompatibilità con la strategia DIVA
- Nessun vaccino per la Febbre della Rift Valley (RVF) autorizzato nell'Unione Europea
- Non pienamente in linea con gli orientamenti del Regolamento (UE) 2016/429, che privilegia:
 - vaccini di nuova generazione;
 - maggiore sicurezza ed efficacia;
 - compatibilità con la strategia DIVA.

OBIETTIVI

- Sviluppo di un prototipo vaccinale ricombinante DIVA (“Differentiating Infected from Vaccinated Animals”) a doppio marcatore, basato sulle proteine Gn e Gc, con proteina esogena KLH come marcatore positivo ed esclusione della proteina N di RVF come marcatore negativo.
- Valutazione della sicurezza e dell’immunogenicità in un modello murino.
- Valutazione del suo utilizzo nella strategia DIVA

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



Ministero della Salute

DIPARTIMENTO DELLA PREVENZIONE, DELLA RICERCA E DELLE EMERGENZE
SANITARIE
DIREZIONE GENERALE DELLA PREVENZIONE
UFFICIO 3

Visto il Decreto Legislativo 12 aprile 2001, n. 206 (Attuazione della direttiva 98/81/CE che modifica la direttiva 90/219/CE, concernente l'impiego confinato di microrganismi geneticamente modificati);

Vista la richiesta pervenuta in data 21/05/2025;

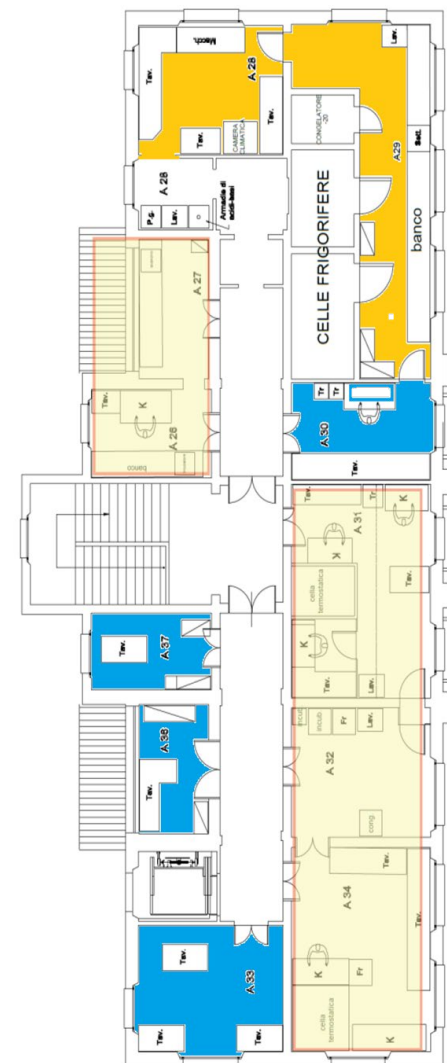
In conformità al parere espresso in data 05/11/2025 dalla Commissione Interministeriale di valutazione di cui all'art.14 del predetto decreto legislativo;

SI AUTORIZZA

la Dott.ssa Maria Teresa Mercante (Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"), titolare dell'impianto di cui alla notifica TE/IC/Imp2/25/001, all'utilizzo dello stesso per attività implicanti l'impiego di microrganismi geneticamente modificati.

Si richiama il titolare dell'impianto all'osservanza delle disposizioni contenute nel sopracitato decreto legislativo, con particolare riferimento agli obblighi di cui all'art. 12 (modifica delle notifiche).

Autorizzazione ministeriale

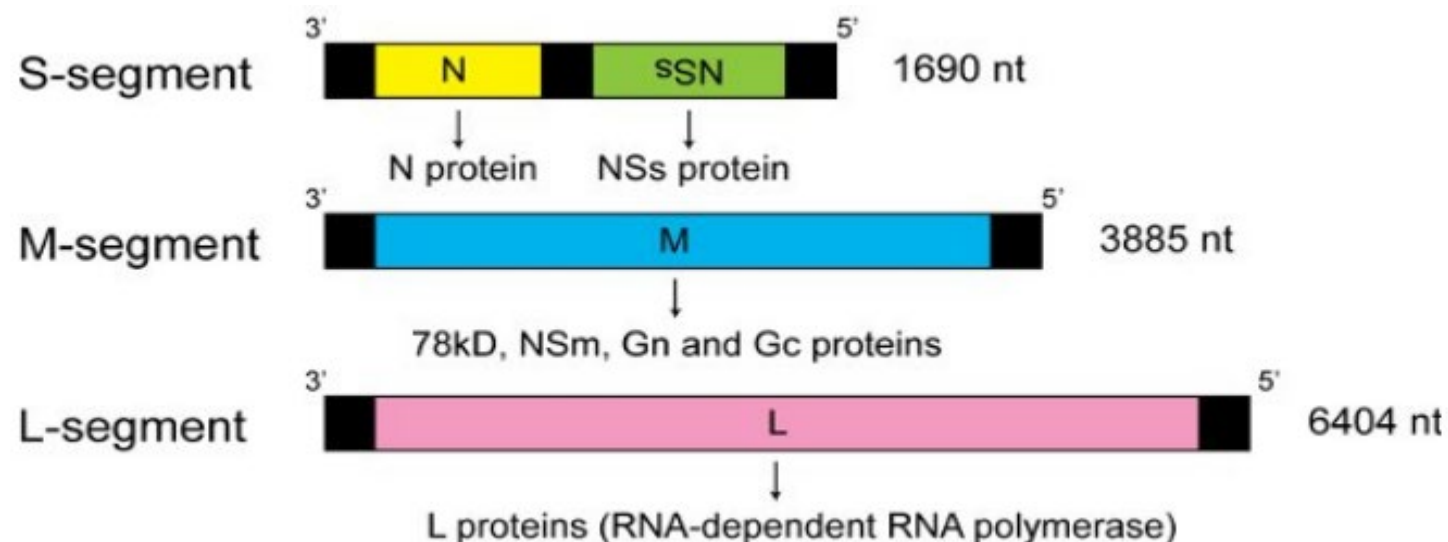


Fasi di sviluppo del vaccino

- **1** – Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine **Gn** e **Gc**
- **2** – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti **Gn** e **Gc**
- **3** – Sviluppo delle formulazioni vaccinali e della strategia **DIVA** a **doppio marcatore** (KLH^+ / N^-)
- **4** – Valutazione della sicurezza e dell'immunogenicità nel modello murino e dell'applicabilità nella strategia **DIVA**

Struttura genoma

1 – Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine Gn/Gc



- **S:** utilizza una strategia ambisenso e codifica per la nucleoproteina (N) e per la proteina non strutturale (NSs)
- **M:** codifica per le glicoproteine Gn (G1) e Gc (G2), e per altre proteine non strutturali
- **L:** codifica per la RNA polimerasi RNA-dipendente

Progettazione ed analisi in silico

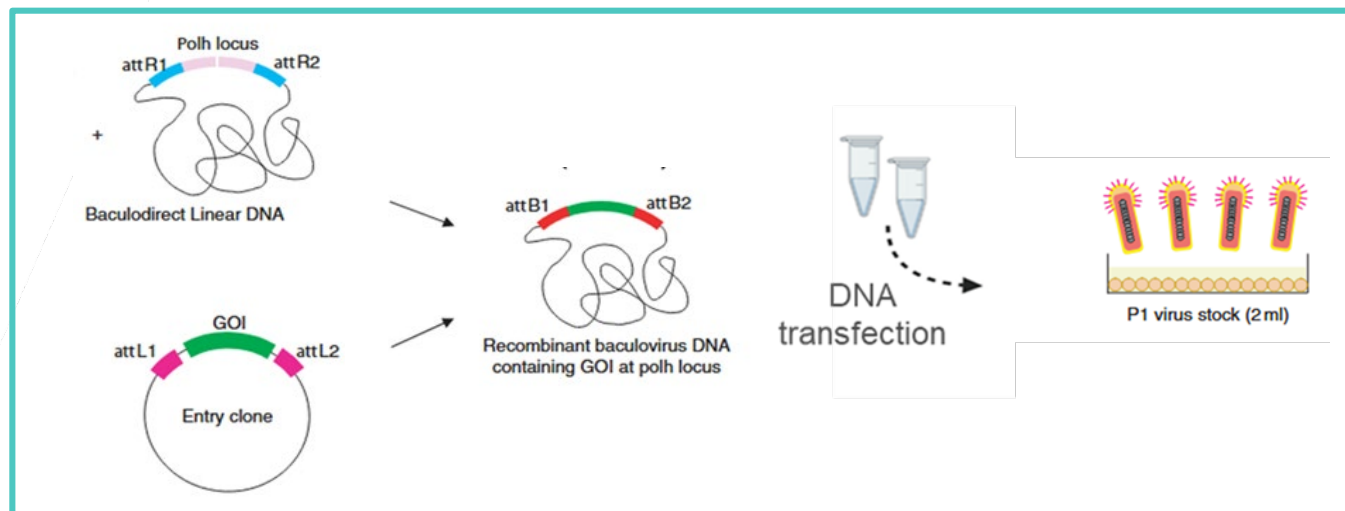
1 – Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine Gn/Gc

- Selezione sequenza Gn/Gc
- Analisi bioinformatica
- Selezione del costrutto
- Aggiunta dei tag V5 e 6xHis in C-terminale
- Predizione strutturale

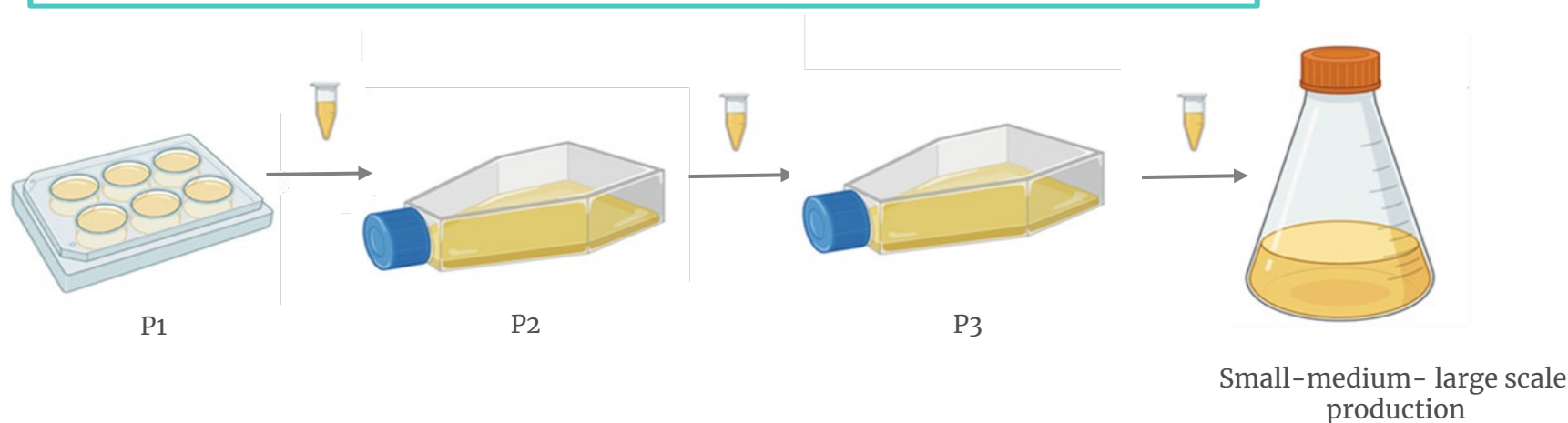
Strumento	Obiettivo
DNASar_Lasergene	Analisi e confronto delle sequenze
ExPASy	Valutazione delle proprietà chimico-fisiche
AlphaFold	Predizione della struttura tridimensionale

Baculovirus Expression System

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc



- External service
- BSL 3 RVF
- BSL 2 Baculovirus



Produzione piccola-media scala

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc

- MOI (Multiplicity of Infection): 0,1 MOI; 0,01 MOI; 0,001 MOI
- Parametri cellulari: numero; vitalità; diametro; titolo virale;
- Surnatante/pellet diversi time-point
- Caratterizzazione diretta ed indiretta
- Condizioni di purificazione:
 - Colonna; Binding/wash buffer; condizioni di eluizione;
- Valutazione presenza baculovirus e inattivazione/purificazione

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Risultati preliminari

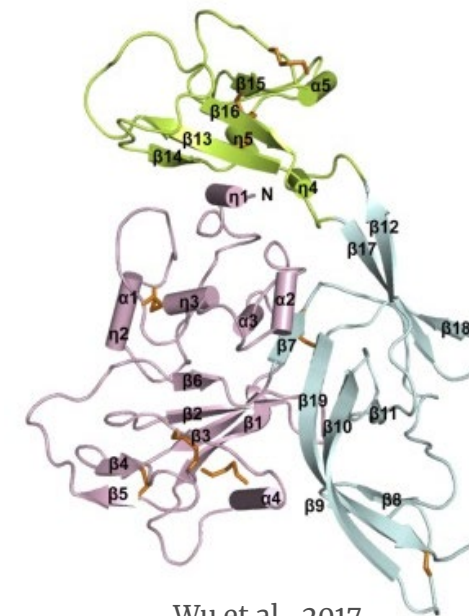
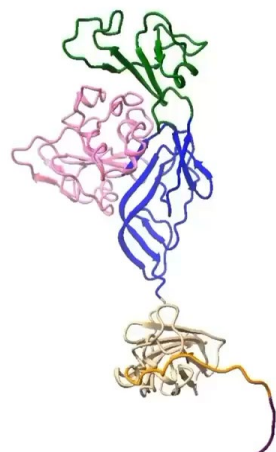
1 – Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine **Gn/Gc**

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti **Gn e Gc**

Analisi strutturale (AlphaFold)

1 - Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine Gn/Gc

recGn



Wu et al., 2017

- Folding globale conservato

- Organizzazione compatibile con la proteina nativa

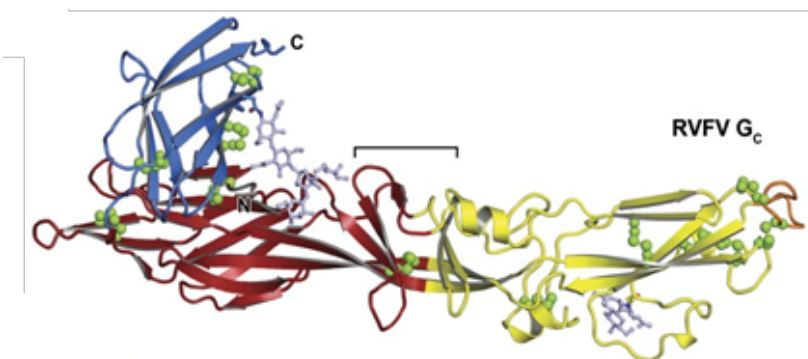
- Assenza di evidenti alterazioni strutturali

- Mantenimento delle regioni antigeniche di interesse

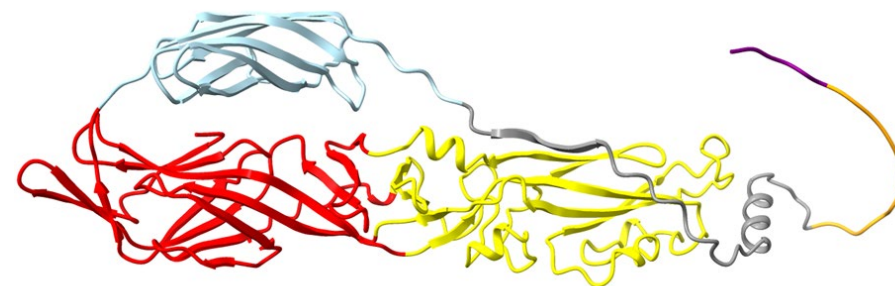
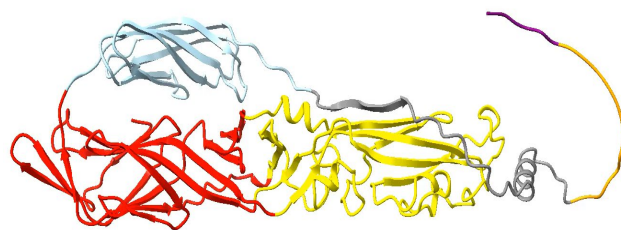
recGc

Analisi strutturale (AlphaFold)

1 - Analisi delle sequenze e progettazione dei costrutti di espressione delle glicoproteine Gn/Gc



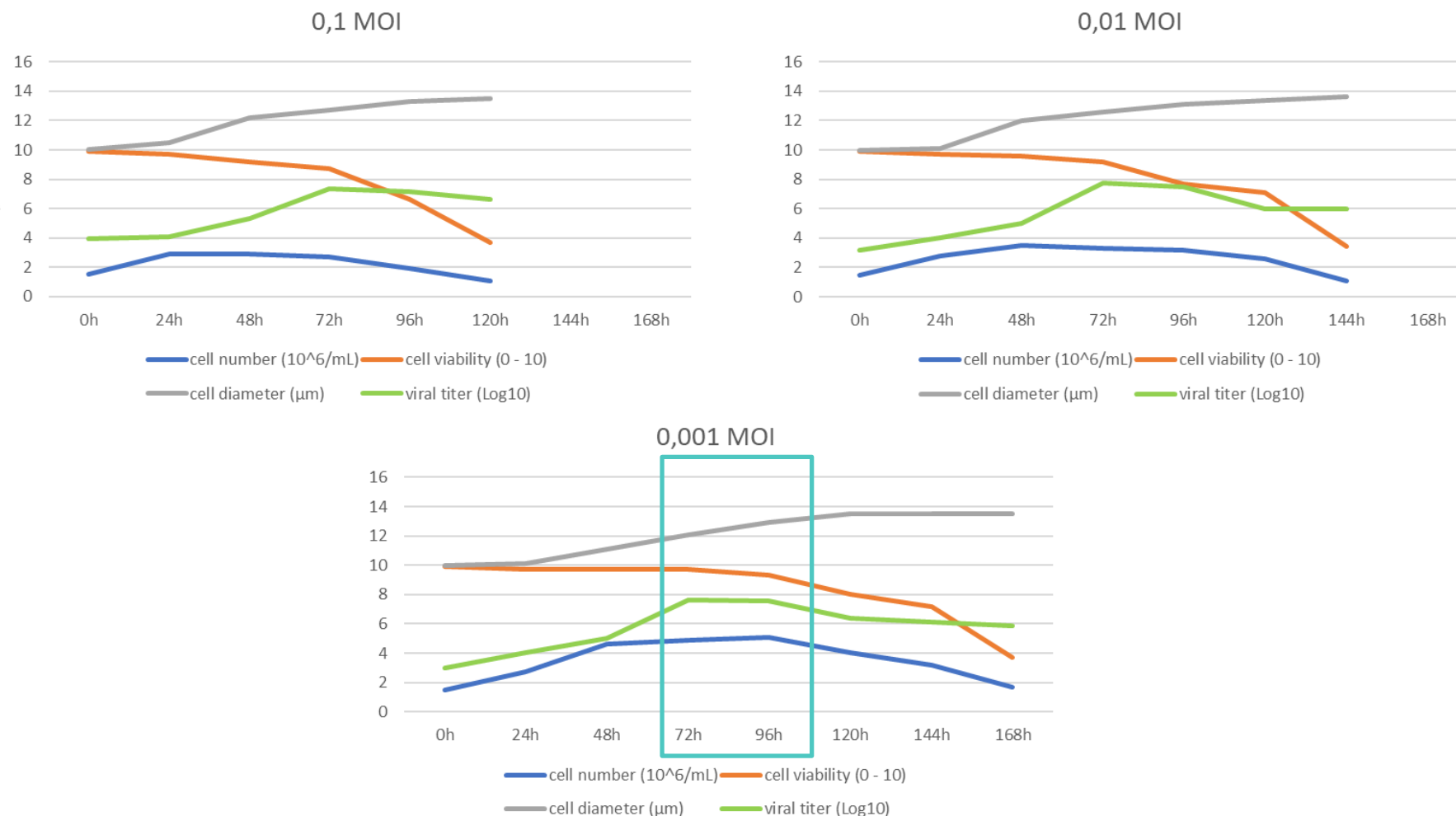
Dessau et al., 2013



- Mantenimento del corretto ripiegamento proteico
- Conformazione sovrapponibile a quella della proteina wild-type
- Integrità strutturale preservata
- Integrità delle regioni immunogeniche rilevanti

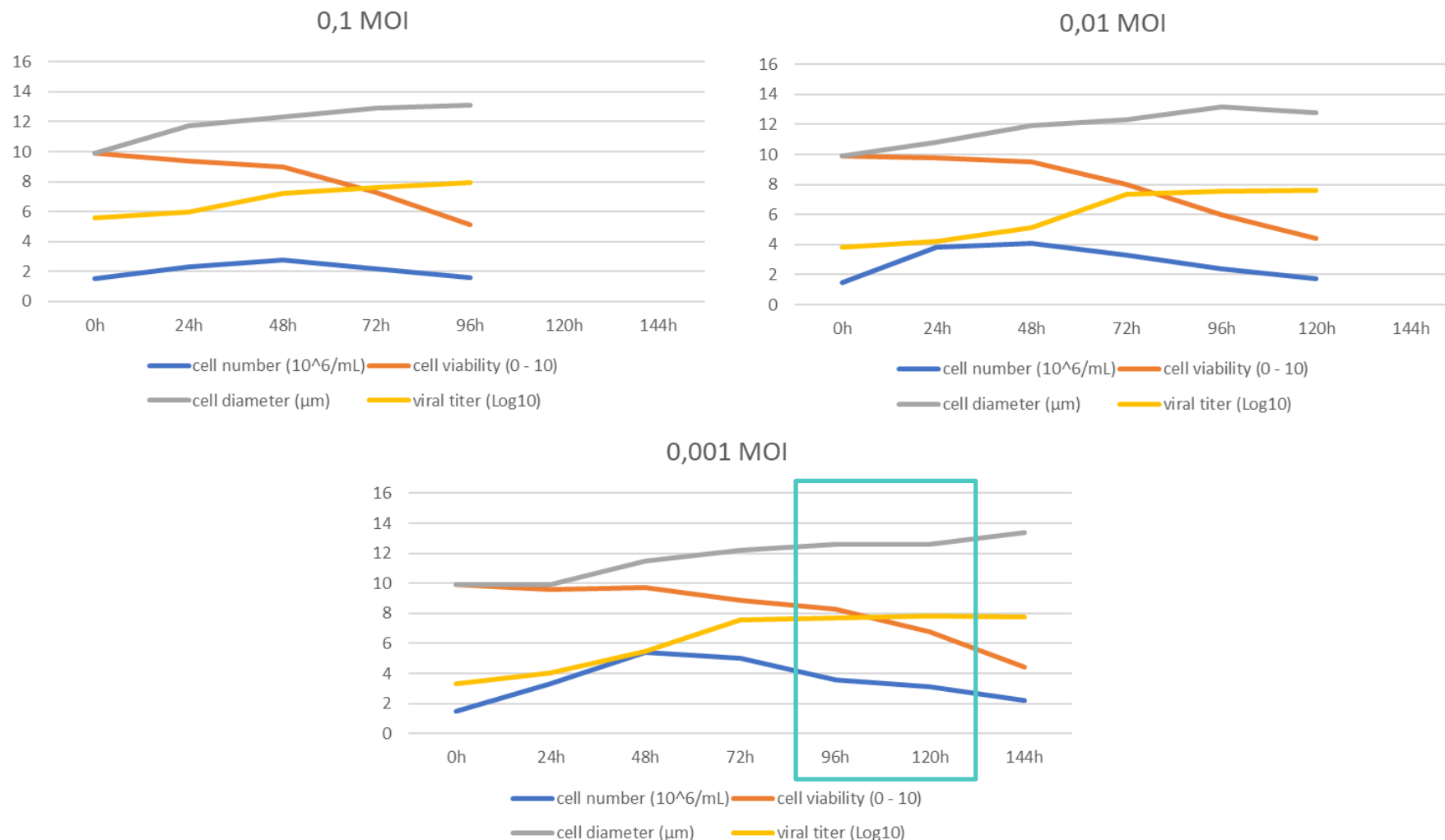
Ottimizzazione produzione recGn

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc



Ottimizzazione produzione recGc

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc



IZS

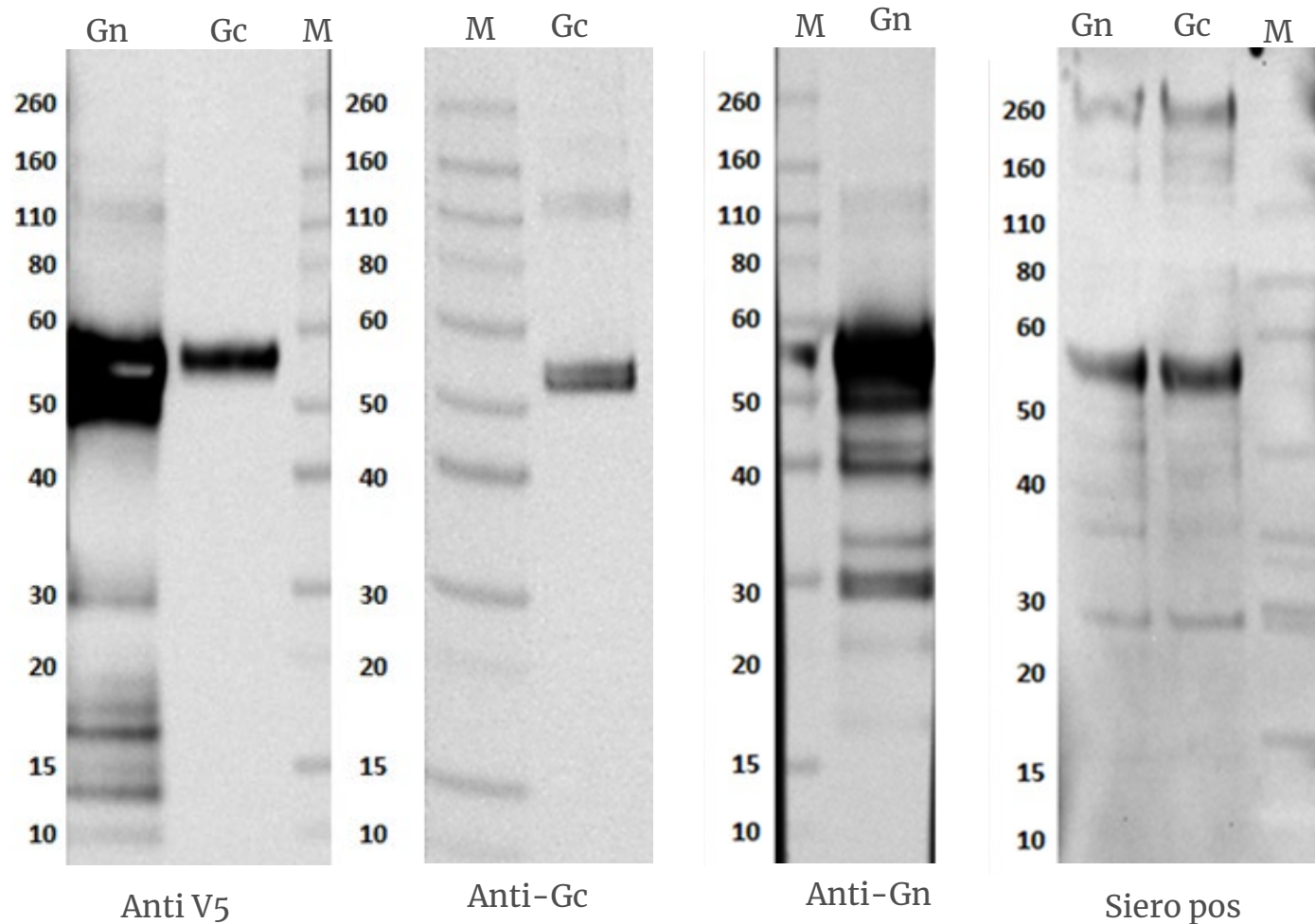
T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPOREALE"

Caratterizzazione

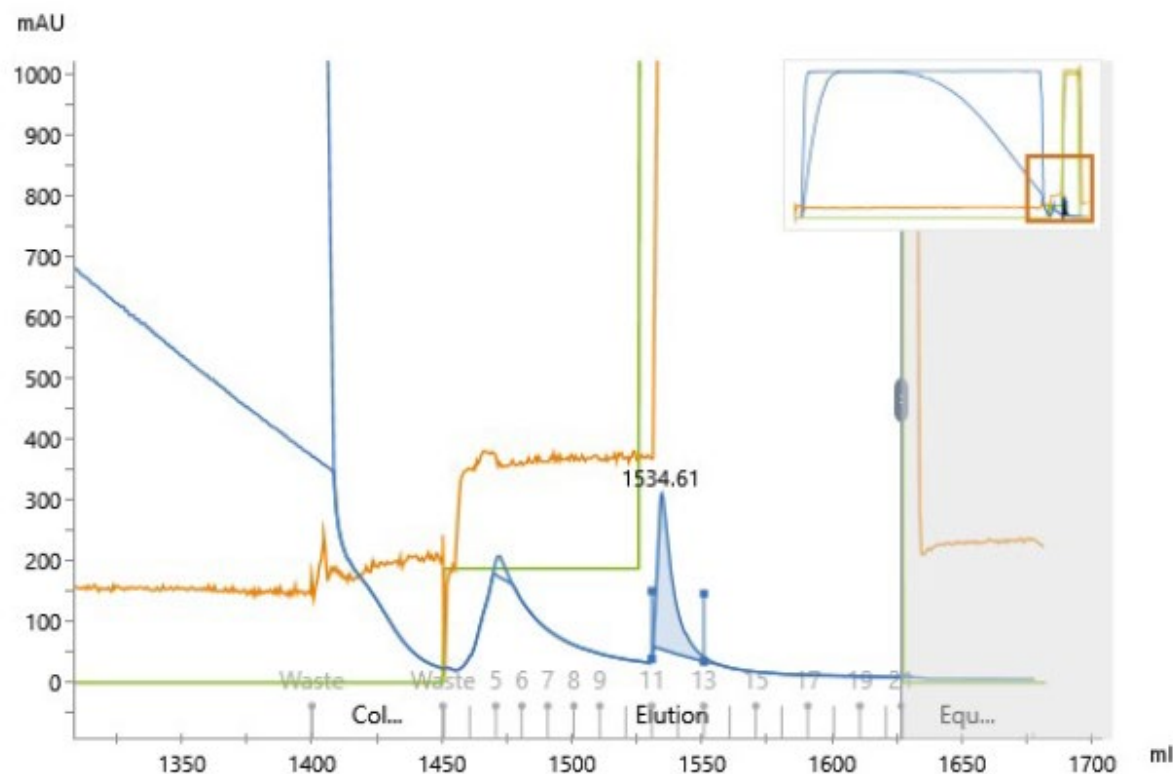
2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc



recGc

Purificazione IMAC

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc

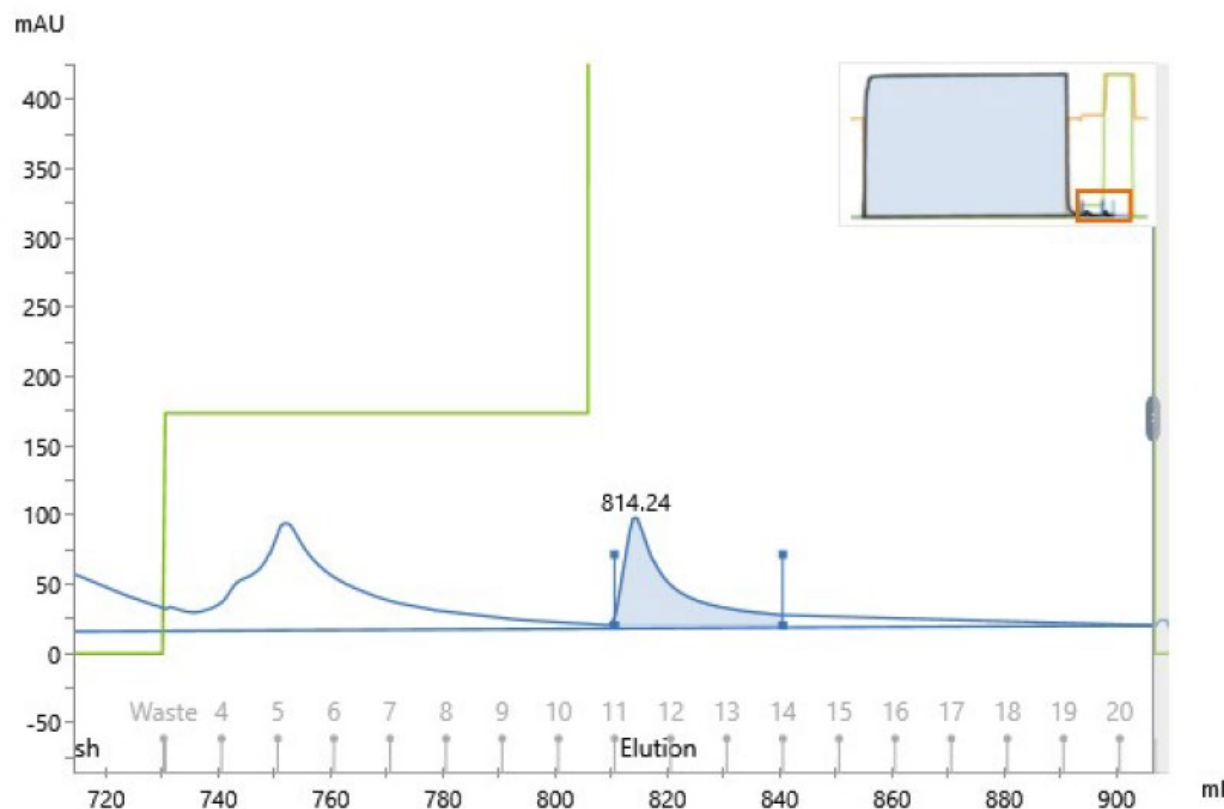


Peack	Area (ml*MAU)	Area %	Ext Coeff	Fraction(s)	Volume	Amount	Concentration
Peack A	1710	100.00	1.000	11 - 12	20.053	8.549	0.426

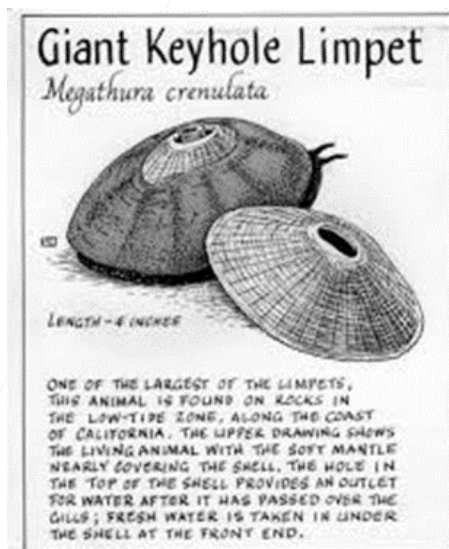
recGn

Purificazione IMAC

2 – Produzione, purificazione e caratterizzazione delle proteine ricombinanti Gn e Gc



Peack	Area (ml*MAU)	Area %	Ext Coeff	Fraction(s)	Volume	Amount	Concentration
Peack A	765.2	100.00	1.000	11 - 13	29.979	3.826	0.128



Attività programmate

3 – Sviluppo delle formulazioni vaccinali e della strategia DIVA a doppio marcatore (KLH⁺ / N⁻)

Group type	Formulazione	Composizione
1	Vaccino 1	Gn + Gc + KLH (+ adiuvante)
2	Vaccino 2	Gn + Gc (+ adiuvante)
3	Vaccino 3	Gn (+ adiuvante)
4	Vaccino 4	Gc (+ adiuvante)
5	Placebo	PBS (+ adiuvante)

effetc size	α err prob	Power (1-β err prob)	sample size n
0,5	0,05	0,82	60
0,8	0,05	0,87	30
1	0,05	0,92	24

Studio preclinico in vivo

DISEGNO SPERIMENTALE E TIMELINE

GRUPPI E TRATTAMENTI



T0
giorni



Monitoraggio Giornaliero



T21
giorni



Fase di Monitoraggio

T35

T35, T49

Se i titoli T35 calano:
possibili booster aggiuntivi
(max 4 totali, ogni 21 giorni)

T63
(Endpoint)



ENDPOINT SPERIMENTALE E ANALISI

A T63 (Dopo Eutanasia/Anestesia)



ANALISI SIEROLOGICA

ELISA SNT

ELISA N, ELISA Gn,
ELISA Gc, ELISA KLH

SIERONEUTRALIZZAZIONE



STUDI DI STIMOLAZIONE IN VITRO
(Sangue e Splenociti)

ANALISI DEI DATI E OBIETTIVI



- Valutare la cinetica della risposta
- Confrontare la potenza della formulazione
- Analizzare la stabilità del titolo

- Produzione di lotti per studi sperimentali
- Sperimentazione in modello murino per valutazione immunologica
- Valutazione preliminare del concetto DIVA dual marker in vivo

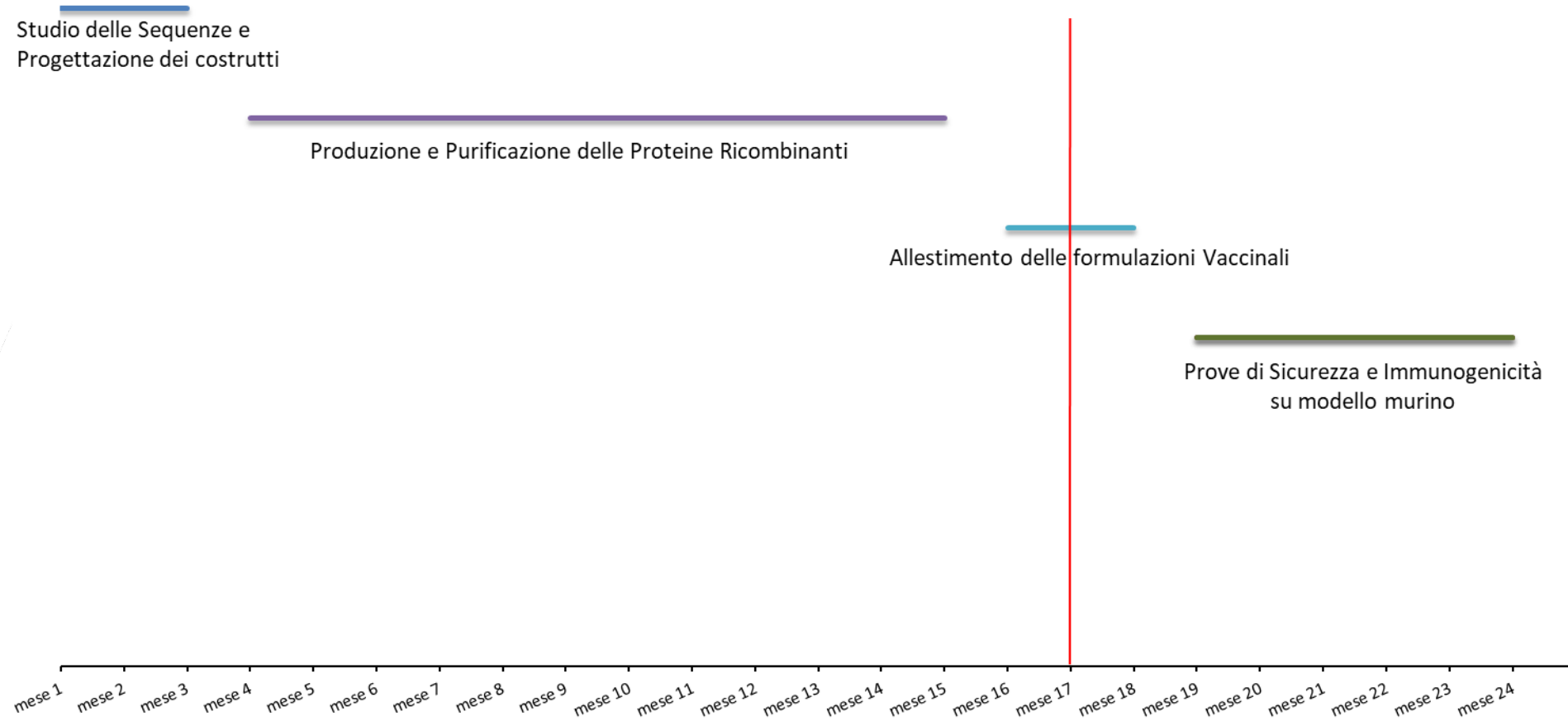
IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Attività completate, in corso e future



Prospettive future

- Sperimentazione su specie di destino
- Valutazione dell'efficacia immunizzante
- Valutazione in campo dell'applicabilità del vaccino nella strategia DIVA

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPOREALE"

Maria Teresa Mercante
Gaetano Federico Ronchi
Caterina Laguardia
Gisella Armillotta
Sara Capista
Francesca Parolini
Mariangela Iorio
Lilia Testa
Sara Traini
Sara Fanì
Cristiano Palucci

