

Maria Pia Fuggetta,
Giulia Lanzilli

Istituto di Neurobiologia e Medicina
Molecolare, Consiglio Nazionale delle
Ricerche, Area Torvergata,
Roma, Italia

Attivazione delle risposte immunitarie mediante vaccini batterici

Riassunto

La relativa inefficacia di alcune risposte immunitarie in età pediatrica ed il fenomeno di "senescenza" del sistema immunitario nell'anziano, rappresentano delle condizioni immunologiche strettamente correlate con l'osservazione di infezioni batteriche ricorrenti delle vie respiratorie in queste particolari popolazioni di pazienti. La loro vulnerabilità verso gli agenti infettivi, fa quindi emergere l'esigenza di individuare opportune strategie vaccinali indirizzate a pre-attivare il sistema immunitario, stimolandone la risposta nella sua globalità (immunità innata e specifica). Valutando i differenti meccanismi di intervento delle diverse cellule impegnate nella risposta immunitaria dopo aggressione da parte di un patogeno, si evince come l'obiettivo principale di un'efficace strategia di vaccinoprofilassi possa tradursi nel potenziamento della funzione delle cellule dendritiche, importante tramite fra le cellule fagocitiche e l'attivazione dei linfociti e quindi interfaccia tra immunità innata e specifica. Recenti studi clinico-sperimentali hanno permesso di identificare le basi molecolari dell'effetto immunostimolante di un nuovo vaccino, commercialmente noto come Ismigen, somministrabile per via sublingua-

Le infezioni ricorrenti, specie quelle delle alte vie respiratorie rappresentano un problema comune nell'età pediatrica e nei soggetti anziani, che può portare a importanti limitazioni della vita sociale dei soggetti predisposti (1). Nel bambino, il sistema immunitario va incontro a un processo di maturazione nel corso dei primi anni di vita e in questa fase, la relativa inefficacia di alcune delle risposte immunitarie, soprattutto quelle anticorpali, favorisce il recidivare di infezioni batteriche e le complicanze batteriche di infezioni che spesso hanno un'origine virale (2). D'altro canto, nel soggetto anziano si osserva una generale senescenza del sistema immunitario che risulta essere ridotto nel numero delle cellule effettrici e nella loro capacità di essere attivate. Questa situazione di particolare vulnerabilità nei confronti di agenti infettivi determina l'esigenza di porre in atto strategie terapeutiche opportune che possono consistere in profilassi antibiotiche o in terapie di vaccinazione con preparati di origine batterica che mirano a pre-attivare il sistema immunitario.

Quando parliamo di risposta immunitaria ci riferiamo ad una complessa strategia che si articola su molteplici

sistemi di difesa. La risposta immunitaria si fonda su due diversi tipi di azioni che vengono generalmente identificate come: immunità innata (o naturale, o non specifica) e immunità specifica (o adattativa, perché si adatta al tipo di antigene che deve essere fronteggiato) (3). Il primo livello di difesa dell'immunità innata è costituito dalle barriere fisiche costituite dagli epitelii che rivestono tutte le superficie che sono all'interfaccia con l'ambiente esterno, quali la cute, l'albero respiratorio e il tratto gastrointestinale. Questo rivestimento non svolge solo un'azione di barriera fisica protettiva ma produce anche una serie di sostanze dotate esse stesse di azione battericida (ad es. le defensine) e alberga al suo interno leucociti effettrici dell'immunità innata, quali i fagociti mononucleati (monociti/macrofagi) e le cellule dendritiche. L'immunità innata può inoltre contare sull'azione delle cellule fagocitiche polimorfonucleate (in particolare modo i granulociti neutrofili) e delle cellule natural killer (NK) che sono presenti nel circolo ematico e che possono essere rapidamente reclutate nei tessuti periferici in caso di infezione (Figura 1). Quando un agente infettivo riesce ad oltrepassa-

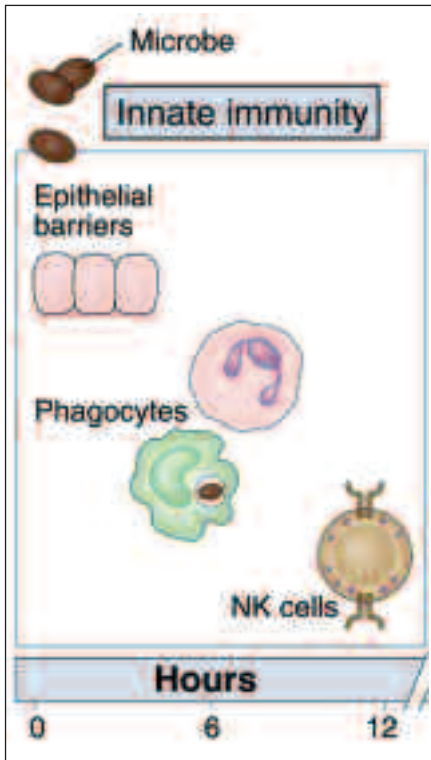


Figura 1 - L'immunità innata come prima linea di difesa contro i patogeni. La prima linea di difesa del nostro organismo è rappresentata dall'immunità innata. Questo sistema comprende le barriere meccaniche esercitate dai tessuti epiteliali e dai loro prodotti di secrezione, e le cellule dell'immunità naturale, quali le cellule fagocitiche (granulociti neutrofili e fagociti mononucleati) e le cellule natural killer (NK)

re la barriera epiteliale esso viene riconosciuto dai leucociti tissutali residenti che insieme alle cellule epiteliali innescano un processo infiammatorio che porta al reclutamento delle cellule fagocitiche (macrofagi e neutrofili) che hanno il compito di riconoscere il patogeno e provvedere alla sua uccisione. I fagociti possono riconoscere un patogeno attraverso due

strategie. La prima consiste in un riconoscimento diretto mediante una serie di recettori di membrana che riconoscono dei "profili molecolari" tipici dei patogeni: ad esempio l'endotossina identifica i batteri Gram-, i peptidoglicani i batteri Gram+ e le molecole di RNA a doppia elica, i virus. Questi profili molecolari (in inglese, patterns) non sono mai espressi da una cellula eucariotica e quindi identificano in modo inequivocabile la natura dell'agente patogeno (Figura 2). I recettori che riconoscono questi patterns (da cui il nome di Pattern Recognition Receptors, ovvero PRR) sono espressi in modo non clonale (cioè da tutti i monociti o neutrofili), in linea germinativa (cioè dalla nascita di una cellula, senza venire successivamente modificati durante la vita della cellula stessa, come avviene per i linfociti). Le cellule fagocitiche possono riconoscere un patogeno anche indirettamente, attraverso recettori che riconoscono proteine che hanno opsonizzato, cioè rivestito, il patogeno, quale gli anticorpi o alcune proteine della cascata del complemento. Indipendentemente dal modo con cui questo avviene, il riconoscimento del patogeno porta all'attivazione della cellula fagocitica e alla messa in atto della sua attività citotossica che mira all'eliminazione del patogeno.

In tutti gli epiteli sono presenti anche le cellule dendritiche, queste cellule rappresentano il punto di passaggio tra l'immunità naturale e quella specifica. Infatti, le cellule dendritiche sono deputate alla cattura di un patogeno, al suo trasporto ai linfonodi regionali e alla presentazione degli

le e ottenuto per lisi meccanica di otto diversi ceppi batterici, selezionati tra quelli principalmente responsabili delle infezioni delle alte e basse vie respiratorie. Dai test *in vitro* questo preparato si è rivelato in grado di indurre una significativa attivazione delle cellule dendritiche, evidenziata dall'incremento dell'espressione di membrana di alcune molecole costimolatorie, quali CD83, CD80 e CD86 (Cangemi G. et al 2004), e l'induzione della produzione di citochine (IL-2, IFN gamma, IL-10), elementi cruciali per l'attivazione dei linfociti T e B (Lanzilli G et al., 2005).

La capacità di Ismigen di attivare il sistema immunitario quando somministrato *in vivo* è stata esaminata in modo più approfondito in un recente studio (Lanzilli G et al, 2006). Lo studio ha evidenziato un'espansione numerica di una sottopopolazione di cellule B della memoria: tali cellule sono responsabili di una più veloce ed efficiente risposta anticorpale in caso di un successivo incontro con lo stesso antigene. Il riscontro clinico della capacità del vaccino orale, di attivare il sistema immunitario risulta dall'innalzamento dei livelli delle principali classi di immunoglobuline seriche (IgM, IgG e IgA) e delle IgA secretorie salivari in pazienti particolarmente suscettibili alle infezioni respiratorie.

L'attivazione della risposta immunitaria è risultata strettamente correlata ad una riduzione della frequenza degli episodi infettivi nei pazienti trattati rispetto al placebo. Nel loro complesso, gli studi indicano che la somministrazione per via sublinguale del lisato batterico ottenuto per lisi meccanica è in grado di promuovere l'attivazione delle risposte immunitarie innate e specifiche sia *in vitro* che *in vivo*.

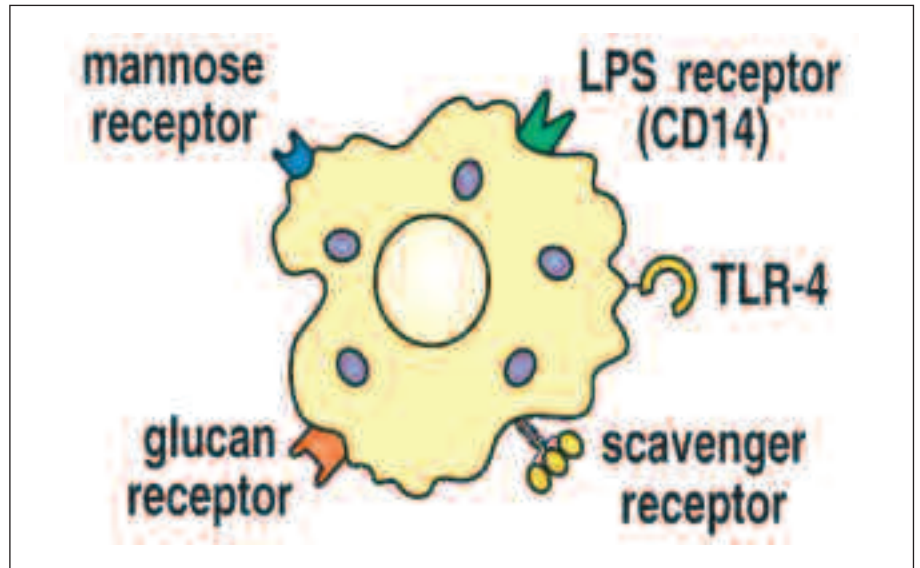


Figura 2 - Le cellule fagocitiche riconoscono i patogeni mediante i **Pattern Recognition Receptors (PRR)**. Il riconoscimento dei patogeni da parte delle cellule dell'immunità innata avviene grazie a dei recettori che sono in grado di legare dei profili molecolari tipici delle cellule batteriche o virali. Per profilo molecolare si intende una struttura che è tipica di una classe di patogeni (come ad esempio l'endotossina per i batteri Gram-) e che li contraddistingue in modo inequivocabile

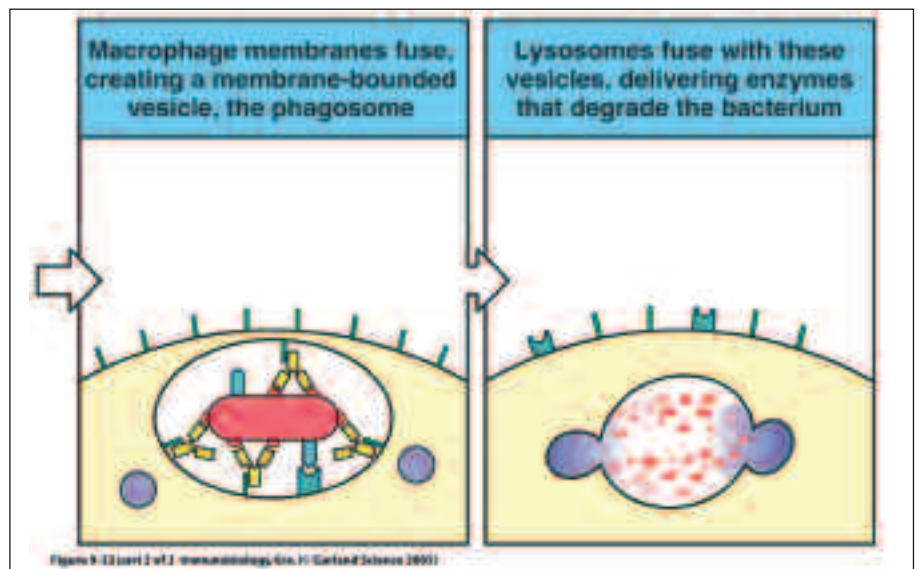


Figura 3 - Le cellule fagocitiche sono dotate di attività battericida. In seguito al suo riconoscimento, il patogeno viene fagocitato, cioè inglobato all'interno di una vescicola, il fagosoma, dove la cellula fagocitica potrà esercitare la sua azione citotossica

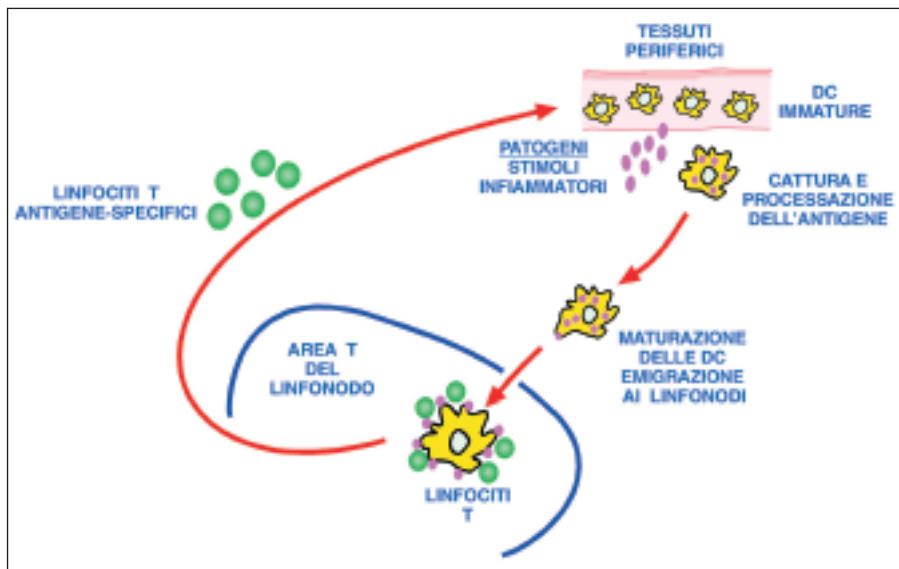


Figura 4 - La cellula dendritica si colloca all'interfaccia tra l'immunità innata e l'immunità specifica. Una delle cellule dell'immunità specifica, la cellula dendritica, ha il compito non solo di degradare i patogeni, ma anche di presentarli ai linfociti T per attivare una risposta immunitaria specifica. Queste cellule sono localizzate in tutti i tessuti e in particolare a livello dei tessuti epiteliali, quali la cute e le mucose che rivestono l'albero respiratorio. Il loro compito è quello di trasportare gli antigeni dai tessuti periferici ai linfonodi regionali per presentarli successivamente ai linfociti T vergini che qui si trovano in numero particolarmente elevato.

antigeni ai linfociti T vergini (Figura 4). Le cellule dendritiche possono quindi essere considerate gli "interuttori" che danno inizio all'immunità specifica. Durante la presentazione dell'antigene, le cellule dendritiche esprimono molecole costimolatorie, quali il CD83, CD80 e CD86, e secerono citochine che svolgono un ruolo cruciale nell'attivazione dei linfociti T (Figura 5). La produzione dell'IL-12 determina la polarizzazione dei linfociti T in senso Th1, mentre l'assenza di questa citochina in presenza della produzione di IL-4 determina la polarizzazione dei linfociti in senso Th2. I linfociti Th1 producono elevati livelli di interferone gamma (IFN γ), una citochina in grado di potenziare

l'attività citotossica delle cellule fagocitiche. D'altro canto, i linfociti Th2, mediante la produzione di citochine quali l'IL-4 e l'IL-10, sono in grado di potenziare la produzione anticorpale (4). Questa breve descrizione permette di comprendere come l'obiettivo di potenziare le difese immunitarie si possa tradurre nella possibilità di potenziare l'azione delle cellule dendritiche e mediante queste promuovere l'attivazione dei linfociti e delle cellule fagocitiche.

Studi recenti hanno cercato di definire le basi molecolari dell'effetto immunostimolatorio di vaccini batterici. Ismigen è il nome commerciale di una preparazione ottenuta mediante lisi meccanica di otto diversi ceppi

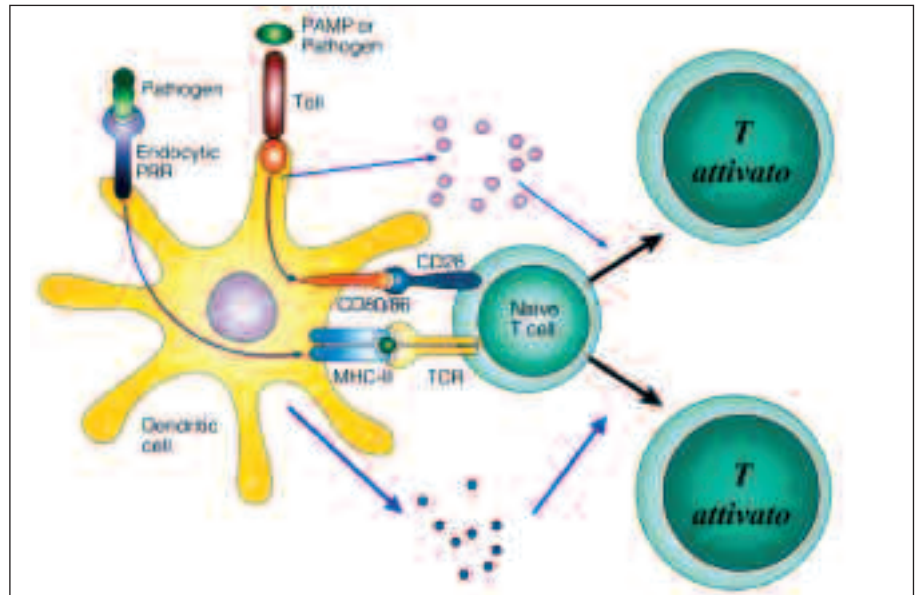


Figura 5 - La cellula dendritica attiva e indirizza la risposta dei linfociti T. L'incontro tra la cellula dendritica, che ha catturato gli antigeni batterici, e il linfocita T vergine, dotato del recettore specifico per uno di questi antigeni, provoca l'attivazione della risposta T. Il tipo di risposta messa in atto dal linfocita T attivato (ad es Th1 o Th2) dipenderà dal tipo di attivazione ricevuto al momento dell'incontro con la cellula dendritica, cioè dal tipo e dalla quantità di citochine e di molecole costimolatorie espresse dalla cellula dendritica

batterici, tra quelli che più comunemente caratterizzano le infezioni delle alte vie respiratorie. Questo preparato, testato in vitro su leucociti purificati dal sangue di soggetti sani si è rivelato in grado di indurre l'attivazione delle cellule dendritiche, come evidenziato dall'aumento dell'espressione di membrana di alcune molecole costimolatorie, quali CD83 (Figura 6) oltre che di CD80 e CD86 (5). Inoltre, Ismigen si è rivelato in grado di indurre la produzione di citochine cruciali per l'attivazione dei linfociti T e B, quali IL-12, IFN γ e IL-10 (Figura 7) (6). La prima risposta funzionale di un linfocita attivato consiste nel processo che prende il nome di "espansione clonale", cioè

la proliferazione di quei cloni linfocitari che possiedono il recettore adatto per riconoscere l'antigene in questione. Questo processo è regolato dalla produzione di una citochina, l'IL-2, che agisce in modo autochrino attraverso il legame al suo recettore ad alta affinità. Il recettore ad alta affinità per l'IL-2, è costituito da tre catene di cui la catena alpha prende il nome di CD25 ed è espressa solo dai linfociti attivati. Quindi, l'espressione di CD25 da parte di un linfocita ne denota il suo stato di attivazione. L'attivazione in vitro con Ismigen è in grado di promuovere l'espressione di CD25 nei linfociti B e nelle due principali sottopopolazioni di linfociti T, i linfociti CD4⁺ (o linfociti T hel-

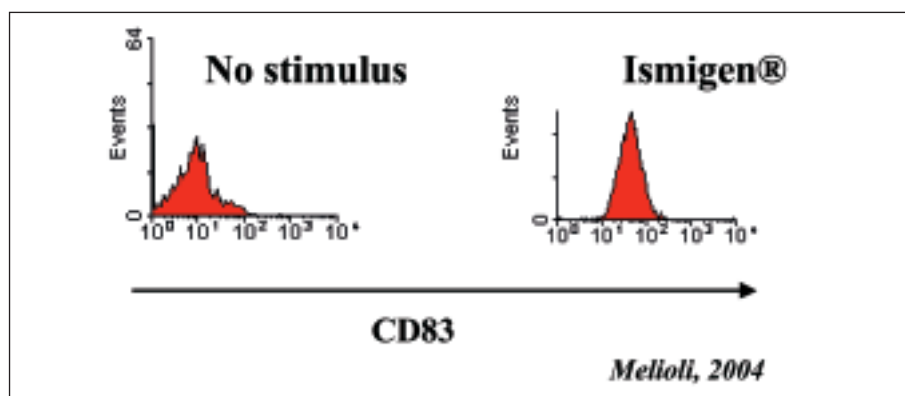


Figura 6 - **Ismigen attiva le cellule dendritiche.** Dati ottenuti in vitro, utilizzando la tecnica della citofluorimetria, hanno dimostrato che Ismigen è in grado di indurre l'attivazione delle cellule dendritiche, come dimostrato dallo spostamento a destra sull'asse dell'ascissa della curva relativa all'espressione di CD83, un marcatore di maturazione. Questo studio è stato condotto in vitro utilizzando leucociti circolanti di soggetti sani

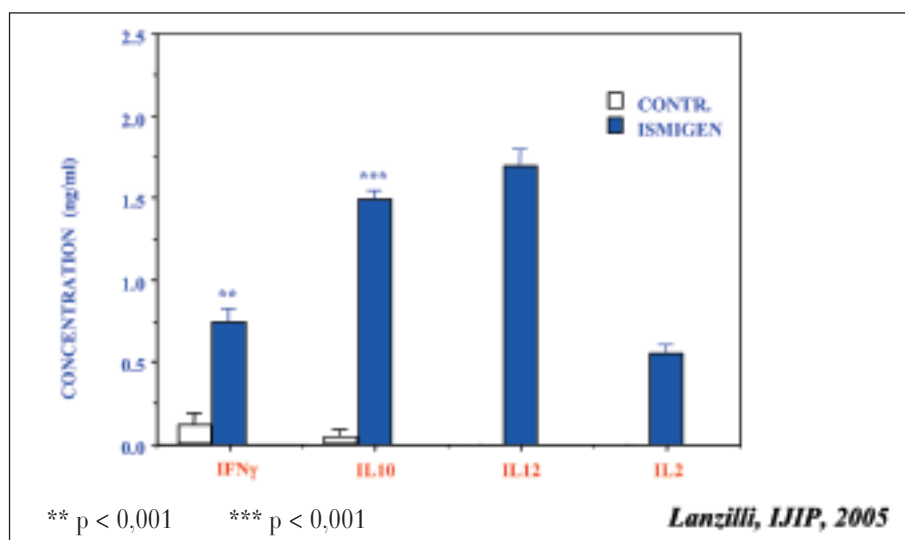


Figura 7 - **Ismigen induce la produzione di citochine da parte di PBMC.** In uno studio recentemente condotto è stato dimostrato che Ismigen promuove il rilascio delle principali citochine coinvolte nell'attivazione di una risposta immunitaria: IFN γ , IL-10, IL-12 e IL-2. Questo significa che Ismigen è in grado di promuovere l'attivazione del sistema immunitario

per) e i linfociti T CD8⁺ (o linfociti T citotossici) (Figura 8) (6). Nel loro complesso, questi risultati indicano

che in vitro, Ismigen è in grado di indurre l'attivazione delle cellule dendritiche e dei linfociti T e B (5, 6).

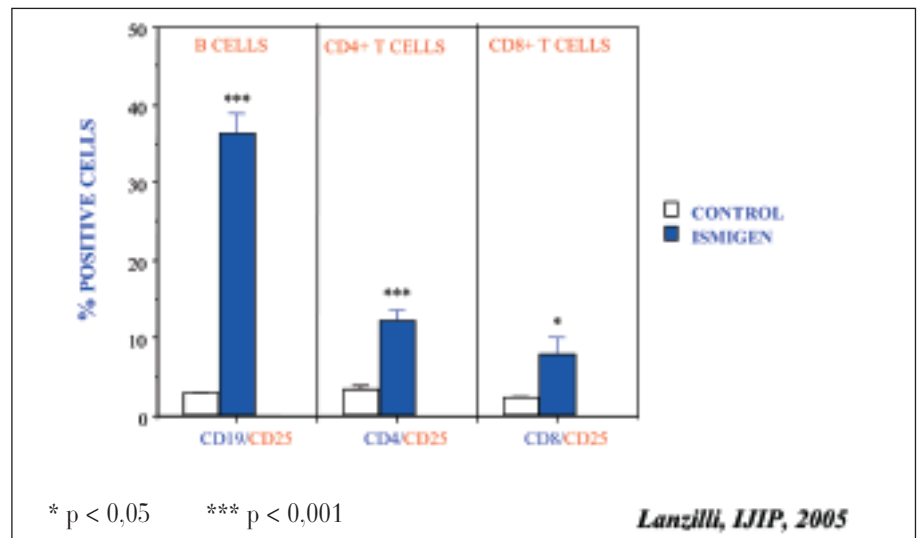


Figura 8 - **Ismigen induce l'espressione di IL-2R α (CD25) sui linfociti B e T in vitro.** L'incubazione in vitro di leucociti con Ismigen determina l'aumento dell'espressione di CD25 sulle tre principali sottopopolazioni linfocitarie: i linfociti B, i linfociti T CD4⁺ e i linfociti T CD8⁺.

La capacità di Ismigen di attivare il sistema immunitario quando somministrato in vivo è stata esaminata attraverso due studi clinici. Il primo, consiste in un trial a doppio cieco condotto su un gruppo di suore di clausura soggette a episodi ricorrenti di infezioni delle alte vie respiratorie (7). In questo studio, Ismigen è stato somministrato alla dose giornaliera di 50 mg/d per dieci giorni consecutivi, come via di somministrazione è stato usato l'assorbimento orale. Il trattamento è stato ripetuto per tre mesi successivi e la valutazione dei parametri immunologici è stata effettuata a tre tempi diversi dall'inizio del trattamento, prima dell'inizio (T0), dopo un mese (T1) e dopo tre mesi (T2). L'assorbimento orale rappresenta la via elettiva di somministrazione per questo tipo di compo-

sto, infatti il microambiente presente nelle stazioni linfonodali regionali istruisce i linfociti T effettori a dirigersi nei tessuti in cui l'antigene è stato inizialmente rilevato. I linfociti saranno quindi indotti a ritornare a livello della mucosa orale e delle alte vie aeree. Il trattamento con Ismigen produce un aumento dei livelli serici delle principali classi di immunoglobuline: IgM, IgG e IgA, ed un aumento dei livelli di IgA secretorie a livello salivare. L'incremento della risposta umorale è stato positivamente associato a una significativa riduzione del numero di episodi infettivi delle vie respiratorie dei pazienti trattati rispetto al gruppo controllo (Figura 9) (7). L'effetto di Ismigen sulla produzione anticorpale è stato studiato in modo più approfondito in un secondo studio (8). In questo studio sono

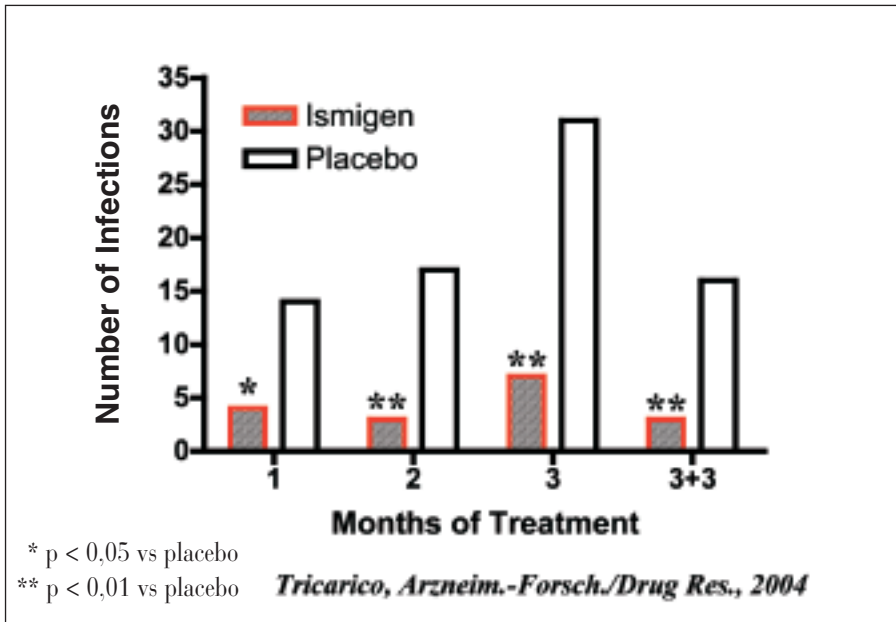


Figura 9 - Il trattamento con Ismigen riduce la frequenza di episodi infettivi delle vie respiratorie. L'aumento dei livelli di immunoglobuline, nei pazienti trattati con Ismigen, è associato ad una riduzione significativa degli episodi infettivi delle vie respiratorie sia durante i tre mesi del trattamento che in quelli successivi

stati esaminati dieci soggetti, tutti caratterizzati da infezioni ricorrenti nei dodici mesi precedenti all'inizio del trattamento. In questo gruppo di pazienti, gli episodi infettivi prevalenti erano riniti (39,2%), tonsilliti (33,6%) e faringiti (26,7%); lo schema di trattamento impiegato era simile a quello dello studio precedente. Anche in questo caso, il trattamento con Ismigen ha indotto una attivazione dei linfociti B circolanti, valutata come aumento dell'espressione di CD25. Lo studio ha inoltre evidenziato un'espansione numerica di una sottopopolazione di cellule B della memoria. È necessario qui ricordare che l'attivazione dei linfociti B ha due principali conseguenze funzionali: l'espansione clonale delle cellule

che possiedono il recettore specifico per un dato antigene e la generazione di cellule della memoria che saranno responsabili di una più veloce ed efficiente risposta anticorpale in caso di un successivo incontro con lo stesso antigene. Nel caso che le cellule della memoria siano state generate in seguito al riconoscimento di antigeni di natura proteica (antigeni T-dipendenti) esse possono produrre immunoglobuline della classe IgG o IgM. Al contrario, i linfociti B della memoria generati in risposta ad antigeni di natura non proteica (T-indipendenti), come nel caso degli antigeni polisaccaridici che caratterizzano i batteri capsulati, producono esclusivamente IgM e prendono il nome di "IgM memory". La ridotta presenza

di cellule "IgM memory" è stata direttamente correlata ad una ridotta capacità di fronteggiare infezioni da parte di microbi dotati di antigeni polisaccaridici (9). I linfociti "IgM memory" possono essere individuati sulla base dell'espressione di membrana di particolari marcatori cellulari (CD24 e CD27). Nello studio in questione, il trattamento con Ismigen si è rivelato in grado di aumentare il numero di linfociti "IgM memory" e di ridurre in parallelo l'incidenza degli episodi infettivi.

Nel loro complesso, questi studi indicano che Ismigen è in grado di promuovere l'attivazione delle risposte

immunitarie innate e specifiche sia in vitro che in vivo. L'azione di Ismigen a livello dei diversi meccanismi effettori del sistema immunitario costituisce quindi il probabile meccanismo d'azione del farmaco con conseguente riduzione degli episodi infettivi ricorrenti nei soggetti predisposti trattati. In conclusione questi dati supportano l'ipotesi che una attivazione del sistema immunitario ad opera di vaccini a base di lisati batterici possa rappresentare un efficace approccio terapeutico nella prevenzione delle infezioni ricorrenti delle vie aeree.

eRn

Bibliografia essenziale

- Hopp R. Evaluation of recurrent respiratory tract infection in children, *Current Problems in Paediatrics* 1996; 148-58.
- Duse M, Bondioni MP, Ugazio AG. Le basi patogenetiche delle infezioni respiratorie ricorrenti. In: Il bambino con infezioni ricorrenti, Ed. Ugazio AG e Cavagli G, Masson, 2003: 27-55.
- Delves JP, Roitt IM. The Immune System: First of Two Parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 37-49.
- Delves JP, Roitt IM. The Immune System: Second of Two Parts. *The New England Journal of Medicine* 2000; 343: 108-17.
- Cangemi G, Morandi B, Ferlazzo G, Melioli G. The maturation of dendritic cells mediated by a polyvalent mechanical bacterial lysate (PBML) results in the secretion of cytokines inducing an anti-bacterial polarization of the locoregional immune-response. *European Respiratory Journal: 14th ERS Annual Congress*. GlasgowUK 2004; Vol 24, Sup 48.
- Lanzilli G, Falchetti R, Tricarico M, Ungheri D, Fuggetta MP. In vitro effect of an immunostimulating bacterial lysate on human lymphocyte function. *Int J Immunophatol Pharmacol* 2005; 18 (2): 245-54.
- Tricarico D, Varricchio A, D'Ambrosio S, Ascione E, Motta G. Prevention of Recurrent Upper Respiratory Tract Infections in a Community of Cloistered Nuns Using a New Immunostimulating Bacterial Lysate. A randomized, double-blind clinical trial. *Arzneimittelforschung* 2004; 54: 57-63.
- Lanzilli G, Falchetti R, Cottarelli A, Macchi A Ungheri D, Fuggetta MP. In vivo effect of an immunostimulating bacterial lysate on human B lymphocytes. Lanzilli G. *Int J Immunophatol Pharmacol* 2006; 19 (3); 551-9.
- Carsetti, Rosado MM, Donnanno S, Guazzi, V, Soresina A, Meini A, Plebani A, Aiuti F and Quinti I, The loss of IgM memory B cells correlates with clinical disease in common variable immunodeficiency, *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 412-7