

23Aprile

Veicoli per la somministrazione intranasale di un vaccino

Il naso!
Una soluzione sotto gli occhi di tutti

La somministrazione intranasale di vaccini, utilizzando ad esempio uno spray, è una modalità attraente di immunizzazione. La mucosa nasale, è una sede strategica per la stretta associazione al NALT il tessuto linfoide associato al rinofaringe (Kiyono, H. 2004)

NALT contiene tutte le cellule linfoidee necessarie per l'induzione e la regolazione delle risposte immunitarie della mucosa agli antigeni che vengono rilasciati nella cavità nasale; è un potente sito aia ai fini dell'induzione che per una mancata risposta sistemica in quanto capace di modulare meccanismi di tolleranza attraverso la produzione di segnali regolatori positivi e negativi per l'induzione rispettivamente dell'immunità antigene-specifica e della tolleranza. (Prakken, BJ 1997) Di fatto è definibile come un "Ambiente Th 0". indicando che queste cellule T sono in grado di diventare Th1 o Th 2 in seguito ad esposizione antigenica (Vajdy, M. & O'Hagan 2001)

Per una somministrazione ottimale di un vaccino sono necessari adiuvanti e veicoli specifici.

Sviluppo di vaccini basati su NALT

La vaccinazione nasale si è dimostrata un regime efficace per la stimolazione del sistema immunitario respiratorio che richiede una dose di antigene molto inferiore rispetto alla vaccinazione orale per l'induzione di risposte immunitarie sistemiche e mucose antigene-specifiche. (Mestecky J)

Veicoli per antigeni solubili

Gli antigeni sono noti per essere più immunogenici in forma particellare che in forma solubile, ma sono vulnerabili agli enzimi di degradazione dell'antigene e agli acidi associati all'ambiente mucoso. Per superare questi ostacoli, molti sforzi sono stati concentrati sulla creazione di nuovi veicoli vaccinali non tossici e non immunogenici in grado di fornire efficacemente anche la forma solubile di antigene al tessuto induttivo della mucosa organizzato. Tali veicoli devono proteggere i componenti del vaccino dalla degradazione, migliorare il loro assorbimento dalle superfici mucose e forse funzionare come adiuvante. (Yuki Y. 2003)

Proteine fusogeniche

Tra i vari candidati per il rilascio dell'antigene della mucosa, la **proteina di fusione associata al virus Sendai** sembra particolarmente adatta a funzionare come una molecola che guida l'antigene attraverso l'epitelio della mucosa (Yonemitsu Y 2000)

Liposomi fusogenici

La proteina di fusione può essere coniugata a liposomi che contengono l'antigene di interesse. Il trasferimento può essere monitorato con marcaggio fluorescente che assicura il trasferimento fino alle cellule M (Kunisawa, J. 2001) . Inoltre, è stato dimostrato che un liposoma fusogenico HVJ che trasporta l'antigene della glicoproteina 160 dell'HIV è un potente strumento per indurre IgG sieriche specifiche per gp160 e IgA mucosale specifica per gp160 è stata rilevata anche nel lavaggio nasale, saliva, estratto fecale e lavaggio vaginale Dimostrando un trasporto fusogenici (o liposomi HVJ) trasporta efficace capace di attivare la produzione di Ig A - antigene-specifiche nei siti

effettori della mucosa distanti. Inoltre, questo metodo di immunizzazione può anche la produzione di IgG) nel compartimento sistemico (Sakaue, G 2003)

Veicoli verso M cell specifici

Poiché le cellule M per il campionamento dell'antigene sono sparse in tutto l'epitelio NALT, sembra logico sviluppare un vaccino nasale mirato alle cellule M. Un approccio promettente è stato quello di utilizzare una molecola coinvolta nel normale corso dell'invasione di un agente infettivo.

Reovirus

Il Reovirus, un patogeno enterico, è noto per invadere il suo ospite attraverso le cellule M che si trovano nell'epitelio delle placche di Peyer. La proteina *emoagglutinina $\sigma 1$ virale* (45 kDa) del reovirus ha un ruolo cruciale nell'adesione e nell'ingresso nelle cellule M. È stato dimostrato che il virus riconosce le cellule M di topo presenti nelle vie aeree e la forma ricombinante della proteina $\sigma 1$ può legarsi alle cellule M associate all'epitelio NALT. Sulla base di questi risultati, sono stati fatti tentativi per sviluppare un vaccino a DNA mirato alle cellule M utilizzando la *proteina $\sigma 1$ come molecola guida*. Se coniugata a un vettore di espressione eucariotico che codifica per luciferasi (nota come pCMVLuc) e somministrata per via intranasale, la proteina $\sigma 1$ può legarsi specificamente alla superficie apicale delle cellule M che si trovano nell'epitelio follicolare di NALT; porta quindi alla generazione di risposte IgG sieriche specifiche per luciferasi e IgA della mucosa (Wu, Y. 2001). Un vaccino nasale assemblato utilizzando la proteina $\sigma 1$ e la gp160 ha prodotto risposte CTL specifiche per gp160 in vari compartimenti immunitari sistemici e associati alla mucosa, inclusi rispettivamente il tessuto riproduttivo e la milza (Wang X 2003)

BCG carrier

Poiché solo raramente causa gravi complicazioni, il BCG, un vaccino comunemente usato per il controllo della tubercolosi, è considerato un vaccino a basso rischio. La forma ricombinante di BCG è un utile veicolo di somministrazione dell'antigene vaccino, perché ha una forte attività adiuvante che può indurre risposte immunitarie sia umorali che cellulo-mediate (Honda, M 1995).

Infatti, la somministrazione sistemica di rBCG che esprime l'antigene dell'HIV ha dimostrato di indurre efficacemente l'immunità cellulo-mediata. La somministrazione intranasale di rBCG che esprime V3J1, un epitopo neutralizzante dell'HIV, può indurre IgG specifiche del peptide V3 che ha attività neutralizzante per più di 0,5-1 anni sia in condizioni normali che immunodeficienti (interferone- γ -carente o *IL-4* / -) topi. Inoltre, è stato dimostrato che anche le IgG sieriche indotte da V3J1-rBCG neutralizzano efficacemente un ceppo omologo di HIV 43. Di conseguenza, rBCG si mostra promettente come un efficace veicolo di immunizzazione nasale per l'induzione di risposte anticorpali antigene-specifiche prolungate.

Questi risultati sottolineano ulteriormente l'efficacia dell'immunizzazione mirata a NALT per l'induzione di risposte immunitarie antigene-specifiche umorali e / o cellulo-mediate nei compartimenti immunitari mucosali e sistemici.

Creazione di adiuvanti sicuri a base di tossine.

Tossine

Sia la tossina del colera prodotta da *Vibrio cholerae* che l'enterotossina ermolabile di *Escherichia coli* funzionano come adiuvanti per migliorare le risposte anticorpali della mucosa e del siero agli antigeni proteici somministrati contemporaneamente per via orale o nasale. Sfortunatamente,

nonostante la loro efficacia come coadiuvanti della mucosa, le forme native della tossina del colera (nCT) e dell'enterotossina termolabile (nLT) causano grave diarrea e quindi non sono adatte per l'uso negli esseri umani. Per superare questi ostacoli, i ricercatori hanno sostituito un singolo amminoacido per generare forme mutanti non tossiche di tossina del colera (mCT) e enterotossina termolabile (mLT) questi mantengono l'adiuvantività delle forme native ma non inducono la ribosilazione dell'ADP associata all'attività tossica.

mCT S61F

Gli sforzi per ideare un adiuvante sicuro a base di tossine di prima generazione si sono concentrati su mCT S61F (in cui la fenilalanina sostituisce la serina in posizione 61) e mCT E112K (in cui la lisina sostituisce l'acido glutammico in posizione 112); queste mutazioni sono state create effettuando una singola sostituzione amminoacidica nel centro attivo dell'ADP-ribosiltransferasi nella subunità A della tossina del colera .

Le due forme mutanti della tossina del colera si sono dimostrate sicure da analisi in vitro dell'attività di ribosilazione di ADP e formazione di AMP ciclico, nonché da analisi in vivo per sintomi simili alla diarrea. Quando la proteina di superficie pneumococcica A (PspA) - un nuovo antigene vaccinale candidato per la prevenzione dell'infezione da Streptococcus pneumoniae - è stata somministrata per via nasale con mCT, sono state suscitate risposte IgA mucose antigene-specifiche e IgG sistemiche ⁹⁰. I topi immunizzati per via intranasale con PspA e mCT sono stati anche protetti contro un'infezione letale con S. pneumoniae. È interessante notare che quando il vaccino contro il tetroide tetanico (che è attualmente somministrato per iniezione) è stato somministrato per via nasale con uno di questi due mCT, ha generato un'immunità protettiva contro la sfida con la tossina ⁹¹. Uno studio indipendente ha anche dimostrato che mCT E112K è il più sicuro ed efficace degli adiuvanti mutanti a base di tossine attualmente disponibili (Hagiwara, Y 1999)

Adiuvanti chimerici

Per migliorare ulteriormente l'efficacia dell'adiuvante mucoso mCT, è stato costruito un adiuvante di tipo chimerico di seconda generazione dalla subunità A di mCT (mCTA) e dalla subunità B di nLT (nLTB); pertanto, l'adiuvante ha le proprietà immunobiologiche sia della tossina del colera che dell'enterotossina tremolabile. (Kweon, MN et al.)

Questi risultati supportano l'idea che mCT è un forte candidato per un efficace adiuvante della mucosa per generare immunità protettiva per via nasale di somministrazione. In effetti, questi risultati indicano che l'attuale preferenza per i vaccini di tipo iniettabile dovrebbe essere riconsiderata e in futuro si dovrebbe fare un uso maggiore di vaccini di tipo spray che includono mCT e altri adiuvanti sicuri a base di tossine

Vettori virali

Virus influenzale

L'immunizzazione nasale con emoagglutinina del virus influenzale più il nuovo adiuvante chimerico della mucosa mCTA – nLTB è in grado di produrre risposte IgG e IgA sieriche specifiche per emoagglutinina. Questi risultati mostrano che i vaccini nasali contenenti mCT o mCTA – nLTB sono efficaci per l'induzione dell'immunità protettiva. (Kweon, MN 2002)

Tra la fine degli anni '50 e l'inizio degli anni '60, l'efficacia dell'immunizzazione con un vaccino somministrato per via nasale contro l'infezione da virus influenzale è stata dimostrata in un ampio studio clinico a Osaka, in Giappone, in cui è stato somministrato un vaccino spray nasale contenente virus influenzali vivi attenuati. più di 10.000 volontari (Nakamura, K 1960, Okuno, Y. 1965)

Negli ultimi anni del secolo scorso, due tipi di vaccini antinfluenzali somministrati per via nasale, una forma inattivata e una forma viva attenuata, sono stati introdotti rispettivamente in Svizzera e negli Stati Uniti.

Berna Biotech AG

Nel 1997, una forma inattivata di vaccino nasale contenente una piccola quantità di nLT come adiuvante della mucosa è stata introdotta in Svizzera. Tuttavia, questo vaccino antinfluenzale è stato ritirato dal mercato a causa dello sviluppo di BELL'S PALSY da parte di alcuni destinatari dopo la vaccinazione nasale.

Una relazione causale tra il vaccino antinfluenzale inattivato somministrato per via nasale utilizzato in Svizzera e l'incidenza della paralisi di Bell è stata formalmente stabilita in un recente studio caso-controllo. In questa fase, le cause e la patogenesi della paralisi di Bell rimangono poco chiare; tuttavia, poiché è stato dimostrato che nLT ha proprietà pro-infiammatorie e possibile tossicità neurologica, si sospetta che l'agente eziologico sia l'nLT co-formulato che è presente nel vaccino antinfluenzale inattivato. Questi risultati evidenziano che lo sviluppo di un adiuvante mucoso sicuro è cruciale se si vogliono compiere progressi verso un vaccino mucoso sicuro ed efficace (Mutsch M 2004)

FluMist

Durante l'anno scorso, sulla base di promettenti studi clinici che mostrano l'induzione di immunità protettiva, un vaccino influenzale adattato a freddo intranasale, noto come 'FluMist', è stato reso disponibile per sani americani di età da 5 a 49. quindi sono stati necessari più di 35 anni per tradurre questa scoperta in un vaccino intranasale contro l'infezione da virus influenzale.

Più recentemente, il concetto di immunizzazione nasale è stato proposto adottato per lo sviluppo di un vaccino contro la sindrome respiratoria acuta grave (SARS). Come abbiamo visto in più tappe di questo cronoracconto vaccinale diversi Vaccini sperimentali hanno una solida base sperimentale (fase 1 e 2). La somministrato per via nasale contro la SARS che consiste in un virus parainfluenzale attenuato ricombinante che esprime la proteina spike dell'involucro del coronavirus SARS è stato in grado di indurre l'immunità protettiva nelle scimmie verdi africane, inclusi gli anticorpi neutralizzanti specifici del coronavirus SARS. L'auspicio è che possa concretizzarsi rapidamente una fase 3 per realizzare uno o più vaccini efficaci e sicuri anti Sars-cov-2. E' quello che valuteremo nei prossimi giorni

RIFERIMENTI

-Mestecky, J Kiyono, H. & McGhee, JR in *Fundamental Immunology* 5th edn Ch. 31 (ed. Paul, WE) 965–1020 (Academic, San Diego, 2003).

-Yuki Y. & Kiyono, H. Nuova generazione di coadiuvanti della mucosa per l'induzione dell'immunità protettiva. *Rev. Med. Virol.* 13, 293–310 (2003)

-Maoka, K. et al. L'immunizzazione nasale di primati non umani con bavaglio p55 del virus dell'immunodeficienza scimmiesca e adiuvante della tossina del colera induce TH1 / TH2 per le risposte immunitarie specifiche del virus nei tessuti riproduttivi. *J. Immunol.* 161, 5952–5958 (1998).

-Kuroono, Y. et al. L'immunizzazione nasale induce risposte TH1 e TH2 specifiche per *Haemophilus influenzae* con IgA della mucosa e anticorpi IgG sistemici per l'immunità protettiva. *J. Infect. Dis.* 180, 122–132 (1999).

-Yanagita, M. et al. Immunità del tessuto linforeticolare associato al rinofaringeo (NALT): risposte IgA regolate dalle cellule TH1 e TH2 specifiche delle fimbrie per l'inibizione dell'attaccamento batterico alle cellule epiteliali e la conseguente produzione di citochine infiammatorie. *J. Immunol.* 162, 3559–3565 (1999).

- Yonemitsu, Y. et al. Trasferimento genico efficiente all'epitelio delle vie aeree utilizzando il virus Sendai ricombinante. *Nature Biotechnol.* 18 , 970–973 (2000).
- Alpar HO et al. Somavarapu, S., Atuah, KN & Bramwell, VW Particelle mucoadesive biodegradabili per l'antigene nasale e polmonare e la consegna del DNA. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57 , 411–430 (2005).
- Singh, M. & O'Hagan, DT Recenti progressi negli adiuvanti del vaccino. *Pharm. Ris.* 19 , 715–728 (2002).
- Vajdy, M. et al. Adiuvanti della mucosa e sistemi di somministrazione per vaccini a base di proteine, DNA e RNA. *Immunol. Cell Biol.* 82 , 617–627 (2004).
- Kiyono, H. & Fukuyama, S. NALT- contro l'immunità della mucosa mediata da patch di Peyer. *Nature Rev. Immunol.* 4 , 699–710 (2004).
- Prakken, BJ, et al. La tolleranza nasale indotta da peptidi per un epitopo delle cellule T della proteina 60 da shock termico micobatterico nei ratti sopprime sia l'artrite adiuvante che l'artrite sperimentale indotta non microbica. *Proc. Natl Acad. Sci. STATI UNITI D'AMERICA.* 94 , 3284–3289 (1997).
- Hiroi, T. et al. Sistema immunitario nasale: caratteristici ambienti di tipo TH0 e TH1 / TH2 nei tessuti linfoidi associati nasali murini e nel passaggio nasale, rispettivamente. *Euro. J. Immunol.* 28 , 3346–3353 (1998).
- Vajdy, M. & O'Hagan, DT Microparticles per l'immunizzazione intranasale. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 51 , 127–141 (2001).
- Yonemitsu, Y. et al. Trasferimento genico efficiente all'epitelio delle vie aeree utilizzando il virus Sendai ricombinante. *Nature Biotechnol.* 18 , 970–973 (2000).
- Kunisawa J. et al. La proteina di fusione del virus Sendai media l'induzione simultanea di risposte immunitarie sistemiche e mucose di classe I / II dipendenti da MHC attraverso il sistema immunitario del tessuto linforeticolare associato al rinofaringe. *J. Immunol.* 167 , 1406–1412 (2001).
- Sakaue, G. et al. Vaccino della mucosa dell'HIV: l'immunizzazione nasale con il virus emoagglutinante gp160-incapsulato del liposoma giapponese induce CTL antigene-specifici e risposte anticorpali neutralizzanti. *J. Immunol.* 170 , 495–502 (2003).
- Wu, Y. et al. Vaccinazione DNA mirata alle cellule M. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98 , 9318–9323 (2001).
- Wang, X., Hone, DM, Haddad, A., Shata, MT e Pascual, vaccinazione del DNA delle cellule DW M per l'immunità CTL all'HIV. *J. Immunol.* 171 , 4717–4725 (2003).
- Honda, M. et al. Risposte immunitarie protettive indotte dalla secrezione di una proteina chimerica solubile da un vaccino candidato vettore ricombinante *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin per il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 in piccoli animali. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92 , 10693-10697 (1995).
- Hagiwara, Y. et al. Mutanti della tossina del colera come adiuvante efficace e sicuro per il vaccino antinfluenzale nasale. *Vaccine* 17 , 2918-2926 (1999).
- Kweon, MN et al. Un adiuvante chimerico non tossico di enterotossina induce immunità protettiva in entrambi i compartimenti mucosali e sistemici con anticorpi IgE ridotti. *J. Infect. Dis.* 186 , 1261–1269 (2002).
- Nakamura, K. & Okuno, Y. Vaccinazione con virus influenzale vivo attenuato presso l'ospedale universitario di Osaka nel 1960. *Virus* 11 , 349–354 (1961).
- Okuno, Y. & Nakamura, K. Efficacia profilattica del vaccino influenzale vivo nel 1965. *Biken J.* 9 , 89–95 (1966).
- Mutsch, M. et al. Uso del vaccino antinfluenzale intranasale inattivato e rischio di paralisi di Bell in Svizzera. *N. Engl. J. Med.* 350 , 896–903 (2004).