

**13Maggio**

## **Dall'ago al linfonodo: i percorsi delle nanoparticelle antigeniche**

*Non ricorderai i passi che hai fatto nel cammino  
ma le impronte che hai lasciato.*

### **I vaccini con nanoparticelle**

Una strategia particolarmente efficace per migliorare le risposte umorali è attraverso la formulazione di antigeni in una *struttura particellare multivalente*, che imita la struttura di un virus. I vaccini con nanoparticelle presentano una serie di vantaggi teorici per la stimolazione immunitaria rispetto agli *immunogeni solubili*, tra cui un maggiore traffico linfatico, una maggiore cattura nei linfonodi da parte delle *cellule presentanti l'antigene (APC)* e una migliore attivazione delle *cellule B* antigene-specifiche attraverso la reticolazione del recettore (**Moyer TJ,2016**)

Praticamente la formazione di *antigeni particolati* può essere ottenuta fondendo immunogeni a una proteina che subisce l'autoassemblaggio con altre subunità per formare una nanoparticella, o tramite collegamento chimico a vescicole lipidiche sintetiche, particelle polimeriche o altri materiali inerti. Le *nanoparticelle* di vaccino sono tipicamente progettate con diametri di **~ 100 nm o inferiori**, poiché le particelle in questo intervallo di dimensioni mostrano un drenaggio efficace dai siti di iniezione nei vasi linfatici per un traffico efficace verso il drenaggio dei linfonodi

### **Un drenaggio linfatico "fast"**

I vaccini vengono generalmente somministrati per via parenterale. Dopo l'iniezione, gli antigeni del particolato con dimensioni maggiori di **~ 5 nm** sono troppo grandi per entrare nel sistema vascolare sanguigno in modo efficiente e vengono invece convocati nei vasi linfatici. Gli antigeni solubili e le particelle di diametro inferiore

a **~ 100 nm** vengono efficacemente trasferiti attraverso la linfa ai linfonodi drenanti

Al raggiungimento del nodo drenante, piccoli antigeni solubili (di dimensioni inferiori a **~ 70 kDa**) possono essere trasportati nelle aree dei linfociti T o nei follicoli dei LN attraverso i condotti del collagene o attraverso gli spazi vuoti nel pavimento del seno sottocapsulare (**Pape KA 2007**)

L'ingresso nei condotti è mediato da portali nelle cellule endoteliali linfatiche ricoperti da un complesso di filtraggio dimensionale formato dalla proteina associata alla vescicola plasmalemma. Sebbene si pensasse che le nanoparticelle fossero troppo grandi per passare in modo efficiente il filtro PLVP, dati recenti hanno dimostrato che sia le particelle di virus vaccinia che zika possono accedere ai condotti e penetrare in profondità nei LN. (**Rantakari P 2015**)

### **Il filtro PLVAP**

*PLVAP è una proteina endoteliale prototipica dei vasi sanguigni, viene sintetizzata nelle cellule endoteliali linfatiche di rivestimento del seno che coprono i condotti distali. Meccanicamente, ha una funzione di filtraggio*

### **La cooperazione macrofagi cellule dendritiche per la cattura antigenica**

In alternativa, gli antigeni del particolato vengono catturati dai *macrofagi* e dalle cellule dendritiche che rivestono il *seno sottocapsulare (SCS)*. I macrofagi SCS esprimono una serie di recettori che consentono la cattura dell'antigene, inclusi i recettori del complemento, i *recettori Fc* e il *CD169*, e non interiorizzano e degradano rapidamente gli antigeni del particolato catturato. Le particelle catturate dai macrofagi del seno vengono trasferite sulle loro superfici cellulari o tramite transitosi alle cellule B follicolari in migrazione appena sotto il pavimento capsulare. Le cellule dendritiche che catturano l'antigene nei seni corticali o midollari possono presentare l'antigene localmente o migrare nel parenchima per avviare il priming delle cellule T e B. Oltre al drenaggio linfatico diretto, le particelle possono anche essere catturate nel tessuto periferico da monociti e cellule dendritiche, che possono trasportare attivamente l'antigene nel parenchima LN (**Itano AA, 2003**)

### Possano entrare in azione meccanismi alternativi

Oltre alla cattura da parte degli APC, molti altri meccanismi possono influire sull'ingresso dell'antigene nei LN. Le cellule endoteliali linfatiche esprimono recettori scavenger e hanno dimostrato di catturare particelle virali. Gli antigeni del particolato sono anche suscettibili a una rapida proteolisi nella linfa e / o nel SCS e i componenti proteici degli antigeni del particolato possono raggiungere rapidamente le cellule B in profondità nei follicoli .

### L'attivazione dei percorsi

Quale dei percorsi sopra descritti viene attivato dipende dalla precisa composizione e dimensione dell'antigene / particella ed è influenzato dalla scelta dell'adiuvante del vaccino. Tuttavia, è probabile che più percorsi di traffico avvengano simultaneamente in parallelo per un particolare immunogeno vaccinale.

Una volta che gli antigeni sono passati nel parenchima LN, possono essere trasferiti a siti diversi con implicazioni distinte per la risposta immunitaria che ne deriva. Per l'immunità umorale, è fondamentale la localizzazione dell'antigene nei follicoli e nei centri germinali (GC), dove le cellule B innescate dall'antigene sono soggette a proliferazione e ipermutazione somatica. Le cellule dendritiche follicolari (FDC) svolgono un ruolo importante nei GC, presentando antigeni immobilizzati ai linfociti B per periodi prolungati (Kranich J 2016)

Si ritiene principalmente che le FDC presentino l'antigene sulle loro superfici dendritiche tramite Fc e i recettori del complemento (CR1 e CR2), e i topi carenti di CR1 / 2 mostrano risposte anticorpali sostanzialmente alterate alla vaccinazione

Le nanoparticelle e gli immunocomplessi possono essere trasportati alle FDC in modo dipendente dal complemento. L'opsonizzazione del complemento (C) avviene tramite una delle 3 vie: la via classica che coinvolge IgM o IgG legate alla particella, la via della lectina che coinvolge la lectina legante il mannosio (MBL) che riconosce gli zuccheri sulla superficie della particella, o tramite deposizione spontanea del complemento sulla particella affiorare attraverso il percorso alternativo. I macrofagi SCS che catturano le particelle C-opsonizzate trasferiscono l'antigene a cellule B non antigene-specifiche che migrano vicino ai seni linfatici, che successivamente rilasciano questi antigeni alle FDC in modo CR1 / 2-dipendente (Cyster JG 2010)

### Esistono percorsi alternativi

Oltre al traffico mediato dal complemento, sono stati descritti altri percorsi per il trasporto degli antigeni del particolato agli FDC. È stato dimostrato che le DC midollari catturano le particelle virali dell'influenza attraverso il recettore della lectina SIGN-R1 e le trasportano verso le FDC sebbene non sia chiaro se queste DC trasportino l'antigene fino alle FDC o se il trasferimento alle cellule B avvenga in alcuni punto intermedio. Recentemente, è stato identificato un percorso per il trasferimento diretto di particelle virali avvolte alle FDC, per cui la proteina legante la fosfatidil serina MFG-E8 agisce come un adattatore che lega le membrane virali alle integrine sui macrofagi SCS, che possono quindi trasferire direttamente le particelle virali alle FDC adiacenti. Pertanto, esistono numerosi meccanismi di sovrapposizione per trasportare in modo efficiente gli antigeni del particolato alla rete FDC. ( Park C 2019)

### La criticità delle dimensioni delle particelle

La dimensione delle particelle è un secondo parametro chiave. Recenti studi sistematici che utilizzano nanoparticelle d'oro coniugate in superficie con gli antigeni modello hanno mostrato che l'accesso ai follicoli è fortemente influenzato dalla dimensione delle particelle. Nanoparticelle <15 nm di diam. è entrato rapidamente nelle regioni interfollicolari del LN, nel SCS e nei follicoli dopo l'immunizzazione, ma è stato eliminato dai follicoli entro 48 ore. Al contrario, maggiori 50 o 100 nm diam. le particelle coniugate con l'antigene sono state in gran parte confinate al SCS 2 ore dopo

l'immunizzazione, ma sono state trasferite nei follicoli entro 12 ore e vi sono persistite per diverse settimane in modo dipendente dal recettore C3 e del complemento. Il controllo istologico ha confermato che queste particelle localizzate nel follicolo si sono colocalizzate con FDC e GC in tempi successivi. L'imaging TEM ha rivelato che le piccole nanoparticelle erano prevalentemente endocitate dalle FDC, mentre le particelle più grandi erano immobilizzate sulla superficie extracellulare delle FDC, suggerendo una localizzazione efficace per l'acquisizione dell'antigene da parte dei linfociti B affini (Zhang YN 2019)

#### [Ruolo potenziali degli adiuvanti e degli inflammosomi](#)

L'inclusione di un adiuvante, o come componente della nanoparticella o come ulteriore funzionalizzazione superficiale, è un terzo approccio per immunità umorale e altera infiammazione-driven adiuvante linfonodo in modi diversi che possono influenzare il traffico antigene. Ad esempio, è stato recentemente dimostrato che i vaccini con nanoparticelle influenzali inattivate dai raggi UV interiorizzati dai macrofagi linfonodali innescano una morte cellulare simil-necrotica mediata dall'inflammasoma, promuovendo una cascata pro-infiammatoria di citochine e chemochine nei linfonodi che rispondono mentre contemporaneamente rimuovono questi macrofagi come potenziali agenti di trasferimento dell'antigene. Questo meccanismo potrebbe essere potenzialmente attivo in molti vaccini con nanoparticelle poiché gli inflammasomi vengono attivati in risposta a un'ampia varietà di composizioni di nanoparticelle. (Chatziandreu N 2017)

#### Riferimenti

- Moyer TJ et al. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest.* 2016 Mar 1;126(3):799-808.
- Pape KA et al. The humoral immune response is initiated in lymph nodes by B cells that acquire soluble antigen directly in the follicles. *Immunity.* 2007 Apr;26(4):491-502.
- Rantakari Pet al .The endothelial protein PLVAP in lymphatics controls the entry of lymphocytes and antigens into lymph nodes. *Nat Immunol.* 2015 Apr;16(4):386-96.
- Itano AA et al. Distinct dendritic cell populations sequentially present antigen to CD4 T cells and stimulate different aspects of cell-mediated immunity. *Immunity.* 2003 Jul;19(1):47-57.
- Kranich J et al. How Follicular Dendritic Cells Shape the B-Cell Antigenome. *Front Immunol.* 2016 Jun 21;7:225.
- Cyster JG. B cell follicles and antigen encounters of the third kind. *Nat Immunol.* 2010 Nov;11(11):989-96.
- Park C et al. An integrin/MFG-E8 shuttle loads HIV-1 viral-like particles onto follicular dendritic cells in mouse lymph node. *Elife.* 2019 Dec 6;8:e47776.
- Zhang YN et al. Nanoparticle Size Influences Antigen Retention and Presentation in Lymph Node Follicles for Humoral Immunity. *Nano Lett.* 2019 Oct 9;19(10):7226-7235.
- Chatziandreu N et al Macrophage Death following Influenza Vaccination Initiates the Inflammatory Response that Promotes Dendritic Cell Function in the Draining Lymph Node. *Cell Rep.* 2017 Mar 7;18(10):2427-2440.