

21Aprile

Immunizzazione trans-mucosale: una missione impossibile?

Impossibile non è una regola, è una sfida.

Impossibile non è uguale per tutti.

Impossibile non è per sempre

Muhammad Ali

Premessa

Le vie mucose (in particolare le vie orale e nasale) sono state utilizzate per la somministrazione di farmaci per millenni, aghi e siringhe pre-datati. Diversi secoli fa, la somministrazione nasale di *croste essiccate di lesioni da vaiolo* e la somministrazione orale di *pulci da mucche con vaiolo bovino* erano praticate in Cina come mezzo di immunizzazione contro il vaiolo. Fu il vaccino *antipolio orale Sabin*, tuttavia, che portò alla ribalta l'immunizzazione della mucosa, all'inizio degli anni '60, e che ebbe un ruolo importante nel programma per l'eradicazione globale della poliomielite. Da allora sono stati commercializzati diversi vaccini per le mucose. Poiché molti agenti patogeni, ad esempio l'HIV e il virus dell'influenza, e Sars-cov-2 entrano nel corpo attraverso i tessuti della mucosa, lo sviluppo di vaccini che offrono l'immunità della mucosa ha ricevuto uno scarso interesse

Pregiudizi e problemi da risolvere

E' innegabile che, l'immunità delle mucose e i vaccini delle mucose hanno attratto meno della loro quota dovuta di ricerca e sviluppo per una serie di motivazioni

a-la maggior parte delle infezioni e delle allergie ambientali hanno il loro *portale di ingresso* dalle mucose e questo è valutato un fattore confondente..

b-sono poche note le *reazioni causali* tra mucosa e immunità sistemica, sia per sviluppare vaccini che hanno come target la mucosa

c-non sono disponibili metodi che facilitano il *monitoraggio* delle risposte immunitarie della mucosa negli esseri umani, inclusi neonati e bambini piccoli., I test pratici per valutare la reattività delle cellule T della mucosa in ambito clinico e sul territorio sono ancora *scarsi* e mancano metodi per definire *l'efficacia* negli esseri umani.

d-anche se le risposte immunitarie mucose nel braccio umorale-secretorio del sistema immunitario si sviluppano prima della *risposta immunitaria sistemica*, conferendo un indubbio vantaggio alla vaccinazione mucosale nei neonati, tuttavia. *tolleranza mucosale* si sviluppa molto più tardi. Questo dato può spiegare, in parte, la frequenza (e spesso la natura transitoria) delle allergie alimentari nei bambini piccoli.

e-non esiste ancora una conoscenza precisa dell'*ontogenesi* delle diverse cellule regolatrici della mucosa per le quali il targeting selettivo e l'attivazione da parte di appropriati sistemi di rilascio e agenti immunomodulatori potrebbero essere vantaggiosi per prevenire allergie e reazioni infiammatorie dannose per i tessuti.

f-recentemente sono stati compiuti progressi significativi nello sviluppo di sistemi di somministrazione di vaccini migliorati per le mucose e siano stati progettati anche nuovi adiuvanti della mucosa, tuttavia la loro utilità negli esseri umani deve ancora essere stabilita esattamente.

g- resta da verificare fino a che punto i profili di sicurezza ed efficacia stabiliti nei modelli animali siano veri in soggetti umani geneticamente diversi che possono anche differire in modo significativo nella loro flora intestinale, stato nutrizionale e precedente esperienza immunologica, tutti fattori che sono stati trovati per influenzare l'efficacia del vaccino mucosale. In effetti, è stato riscontrato che diversi vaccini mucosali, tra cui il vaccino orale vivo contro il colera e il vaccino

contro il rotavirus, funzionano meno bene nei paesi in via di sviluppo rispetto ai paesi industrializzati.

Il 12 settembre 1962 John F. Kennedy affermava che : *“in questo decennio abbiamo scelto di andare sulla luna e di fare cose simili, non perché era facile, ma perché era difficile”* penso che questo sia lo spirito che un ricercatore debba avere quando decide di fare qualcosa “difficile”.

Dopo aver analizzato *quello che non sappiamo* sulle mucose vediamo se *quello che sappiamo* può aiutarci a pianificare un vaccino che somministrato attraverso una mucosa sia in grado di dare una immunità sovrapponibile o superiore a quella indotta da un vaccino per via intramuscolare

MALT mucose-associated lymphoid tissue

Le mucose che ricoprono il tratto aerodigestivo e urogenitale, la congiuntiva oculare, l'orecchio interno e i dotti di tutte le ghiandole esocrine sono dotate di potenti *meccanismi di pulizia meccanica e chimica* che degradano e neutralizzano la maggior parte dei corpi estranei.

Un sistema immunitario specifico *innato e adattivo* diffuso e altamente specializzato protegge le superfici mucosali e conseguentemente anche l'interno del corpo, da potenziali insulti ambientali e contiene circa l'80% di tutti gli immunociti costituendo il (MALT) il più grande sistema di organi linfoidi dei mammiferi . Il sistema immunitario della mucosa ha tre funzioni principali:

- *proteggere* le membrane mucose dalla colonizzazione e dall'invasione di *patogeni* ,
- *prevenire* l'assorbimento di *antigeni non degradati*, comprese le proteine estranee derivate dall'alimentazione, da microrganismi commensali, e da materiale aerodisperso
- *inibire* lo sviluppo di risposte immunitarie potenzialmente dannose

Il MALT è altamente compartimentato e funziona indipendentemente dall'apparato immunitario sistemico. È organizzato in microcompartimenti linfoidi anatomicamente definiti come *placche di Peyer*, i linfonodi mesenterici, l'appendice e i follicoli solitari nell'intestino e le tonsille e le adenoidi all'ingresso del tratto aerodigestivo, che fungono da principali siti induttivi della mucosa dove le risposte immunitarie vengono avviate (Mowat AM 2003)

Il MALT si continua anche nel parenchima degli organi della mucosa e delle ghiandole esocrine, che formano i siti effettori della mucosa dove si manifestano le risposte immunitarie; è popolato da sottopopolazioni di cellule B, cellule T e cellule accessorie fenotipicamente e funzionalmente distinte rispetto ai tessuti linfoidi sistemici.

APC cellule presentanti l'antigene

Gli antigeni assorbiti dalle cellule epiteliali assorbenti e dalle cellule epiteliali specializzate 'M' possono essere trasportati o catturati direttamente da cellule presentatrici di antigeni 'professionali' (APC; comprese cellule dendritiche (DC), linfociti B e macrofagi) e presentati a CD4 + e CD8 + convenzionali Cellule T $\alpha\beta$, tutte situate nei siti induttivi.

Le risposte immunitarie nei tessuti mucosi sono regolate dalla natura dell'antigene, dal tipo di APC coinvolti e dal microambiente locale. Con la maggior parte dei tipi di antigeni non patogeni (*p. Es.* , Proteine alimentari), il percorso "predefinito" per le cellule dendritiche mucose DC mucose e delle APC sembra essere quello di generare T helper 2 (T H 2) e vari tipi di risposta delle cellule T regolatorie. Questo può determinare una soppressione attiva dell'immunità sistemica definita

“tolleranza orale”.

Antigeni e adiuvanti, compresa la maggior parte degli agenti patogeni, che ospitano motivi rilevati dagli APC della mucosa come “segnali di pericolo” (p. Es., Ligandi del recettore Toll-like (TLR)), d'altra parte, e condizioni proinfiammatorie in generale, favoriscono lo sviluppo di più forti e più ampie risposte immunitarie che coinvolgono entrambi i bracci effettori dell'immunità umorale-secretoria e cellulare e inoltre non portano alla tolleranza orale

Gli immunociti della mucosa sensibilizzata, sia cellule B che cellule T, lasciano il sito di incontro iniziale con l'antigene, da una placca di Peyer transitano attraverso la linfa, entrano in circolo e quindi seminano siti mucosi selezionati, principalmente la mucosa di differenziarsi in cellule di memoria o effettori.

L'affinità anatomica di tali cellule sembra essere largamente determinata dalle integrine sito-specifiche (“recettori homing”) sulla loro superficie e dai recettori specifici del tessuto mucoso complementare (“addressins”) sulle cellule endoteliali vascolari (Kunkel, EJ & Butcher 2003). Inoltre, le chemochine prodotte nel microambiente locale promuovono la chemiotassi verso i tessuti della mucosa e regolano l'espressione dell'integrina sugli immunociti della mucosa, controllando così la migrazione cellulare (Campbell, DJ 2003)

Si tratta pertanto di un “*sistema immunitario mucoso comune*” in base al quale gli immunociti attivati in un sito diffondono l'immunità ai tessuti mucosi remoti piuttosto che ai siti sistemici. Allo stesso tempo, poiché le chemochine, le integrine e le citochine sono espresse in modo differenziato tra i tessuti mucosi, questo fatto può anche in parte spiegare perché, all'interno del sistema immunitario mucoso, esiste un grado significativo di compartimentalizzazione che collega specifici siti induttivi della mucosa con particolari siti effettori (es., l'intestino con le ghiandole mammarie e il naso con le mucose respiratorie e genitali).

Compartimentazione delle immunizzazioni

La compartimentazione all'interno del sistema immunitario della mucosa pone vincoli alla scelta della via di vaccinazione per indurre risposte immunitarie efficaci nei siti desiderati

Pertanto, mentre *l'immunizzazione orale* può indurre risposte anticorpali nell'intestino tenue (nel segmento prossimale), nel colon ascendente e nelle ghiandole mammarie e salivari, è relativamente inefficace nell'evocare una risposta anticorpale IgA nei segmenti distali dell'intestino crasso, tonsille o mucosa del tratto genitale femminile.

Al contrario, *l'immunizzazione rettale* evoca forti risposte anticorpali locali nel retto ma poca, se non nessuna, risposta nell'intestino tenue e nel colon prossimale

L'immunizzazione nasale o tonsillare nell'uomo determina risposte anticorpali nella mucosa delle vie aeree superiori e nelle secrezioni regionali (saliva, secrezioni nasali) senza evocare una risposta immunitaria nell'intestino. È stato riscontrato che non solo l'immunizzazione vaginale ma anche nasale dà origine a risposte anticorpali IgA e IgG significative nella mucosa cervicovaginale

Immunità adattiva ed IgA

Oltre alla funzione barriera, ai meccanismi di pulizia meccanica e ai diversi fattori chimici antimicrobici o defensine forniti dall'epitelio di rivestimento di diversi tessuti della mucosa, la stessa mucosa contiene una serie di altre cellule del sistema immunitario innato, inclusi neutrofili

e macrofagi fagocitici, DC, NK cellule e mastociti. Attraverso una varietà di meccanismi, queste cellule contribuiscono in modo significativo alla difesa dell'ospite contro i patogeni e all'avvio di risposte immunitarie mucose adattive.

La difesa immunitaria umorale adattativa alle superfici mucose è in larga misura mediata da anticorpi IgA secretori (SIgA), la classe di immunoglobuline predominante nelle secrezioni esterne umane. La resistenza della SIgA alle proteasi rende questi anticorpi particolarmente adatti per il funzionamento nelle secrezioni mucose. Negli esseri umani, è stato dimostrato che il fattore di crescita trasformante (TGF) β e l'interleuchina (IL) -10 insieme all'IL-4 promuovono il passaggio delle cellule B a IgA e la differenziazione in cellule produttrici di IgA.

A questo proposito, oltre alle cellule T della mucosa, che producono grandi quantità di IL-4, IL-10 e TGF- β , le cellule mucoepiteliali umane forniscono una delle principali fonti di TGF- β e IL-10, suggerendo che la cooperazione tra linfociti vicini e le cellule epiteliali nel microambiente mucoso sono fondamentali per programmare la maturazione preferenziale delle cellule B IgA-commesse.

Sebbene la SIgA sia il meccanismo di difesa umorale predominante sulle superfici mucose, sulle IgM e IgG prodotte localmente e nel tratto respiratorio inferiore e nella mucosa genito-urinaria, anche le IgG derivate dal siero possono contribuire in modo significativo alla difesa immunitaria.

Linfociti T regolatori

Nonostante la loro posizione strategica come i primi immunociti a incontrare agenti patogeni che hanno invaso una superficie epiteliale, i meccanismi d'azione dei linfociti T regolatori intraepiteliali sono ancora in gran parte sconosciuti.

Anche il fegato sembra avere un ruolo significativo nel mantenere il silenzio immunologico nei confronti del materiale antigenico innocuo presente negli alimenti. Pertanto, la protezione degli organi della mucosa dalle malattie autoaggressive e allergiche sembra coinvolgere diversi livelli di regolazione.

L'attivazione, l'espansione e la sopravvivenza di queste varie cellule regolatrici sembrano essere controllate da tipi specializzati di APC, in particolare cellule dendritiche (DC) tessuto-specifico come DC sinusoidali epatiche, alcune sottopopolazioni di DC nelle placche di Peyer, linfonodi mesenterici e piccoli villi intestinali, o nel polmoni. Pertanto, le DC della mucosa, a seconda di diversi fattori importanti come la loro posizione nei tessuti, il lignaggio a cui appartengono e la natura degli stimoli di maturazione, possono determinare il carattere delle risposte immunitarie che ne derivano.

Necessità di migliori formulazioni di vaccini mucosali

Lo sviluppo di vaccini mucosali, sia per la prevenzione delle malattie infettive che per l'immunoterapia a tolleranza orale, richiede un efficiente rilascio dell'antigene e sistemi adiuvanti. Idealmente, tali sistemi dovrebbero -proteggere il vaccino dall'eliminazione fisica e dalla digestione enzimatica, -colpire i siti induttivi della mucosa comprese le membrane, o cellule M, -almeno per i vaccini contro le infezioni, stimolare adeguatamente il sistema immunitario innato per generare un'immunità adattativa efficace.

Sistemi di rilascio della mucosa.

È stata sviluppata una moltitudine di tali veicoli, inclusi vari sistemi inerti nonché sistemi di vettori batterici o virali attenuati vivi

I più noti tra i sistemi inerti sono varie strutture a base di lipidi con antigeni intrappolati, come liposomi, complessi immunostimolanti (ISCOM) e cosiddetti cochleates; diversi tipi di particelle biodegradabili a base di amido o copolimeri di acido lattico e glicolico; e differenti proteine leganti la mucosa, comprese sia lectine vegetali classiche che proteine batteriche come le porzioni di subunità leganti della tossina del colera o dell'enterotossina termolabile di *E. coli*, a cui gli antigeni sono stati legati chimicamente o come proteine di fusione genica.

Tra i tanti vettori batterici vivi sviluppati, si possono distinguere due categorie principali: quelle basate su patogeni attenuati come *Salmonella typhi* o *S. paratyphi*, Bacille Calmette-Guérin o *Bordetella pertussis*; e quelli che usano batteri commensali, come i lattobacilli o alcuni streptococchi e stafilococchi.

L'uso iniziale di vaccinia come candidato vettore primario del virus è stato progressivamente sostituito da altri poxvirus, come il poxvirus canarino, e da adenovirus. Molti dei vettori vivi di origine sia batterica che virale sono stati anche progettati per fornire varie citochine per stimolare ulteriormente o modulare le risposte immunitarie indotte.

Ma sebbene molti di questi sistemi abbiano mostrato risultati promettenti negli studi sugli animali, non esiste ancora né un vettore inerte né un vettore vivo approvato per l'uso umano.

Recentemente sono stati riportati risultati promettenti dall'uso dei cosiddetti pseudovirus, o particelle simili a virus (VLP). Si tratta di strutture centrali virali autoassemblanti, non replicanti, spesso da virus non avvolti, che vengono prodotte in modo ricombinante *in vitro*. I VLP sono economici e facili da produrre, oltre che altamente immunogenici, e sono quindi di interesse commerciale come vaccini virali a pieno titolo. Le VLP possono, tuttavia, essere utilizzate anche come trasportatori e adiuvanti combinati sia per antigeni estranei espressi in modo ricombinante sulla loro superficie, sia per vaccini a DNA trasportati all'interno di VLP. I VLP sono particolarmente interessanti dal punto di vista del vaccino mucoso, poiché offrono l'opportunità di utilizzare la via naturale di trasmissione del virus genitore per la somministrazione del vaccino.

Coadiuvanti

Quando si tratta di adiuvanti specifici, gli adiuvanti della mucosa meglio studiati e più potenti nei sistemi sperimentali sono la tossina del colera e l'enterotossina termolabile *E. coli*, e recentemente sono stati fatti molti sforzi per generare derivati tossicologicamente accettabili di queste tossine con attività adiuvante mantenuta per uso umano

Uno di questi prodotti è il CTB prodotto per ricombinazione completamente non tossico, che, a seconda della natura dell'antigene co-somministrato, può essere utilizzato per promuovere l'immunità della mucosa (principalmente SIgA) ai patogeni o la tolleranza antinfiammatoria periferica agli antigeni auto o agli allergeni

Sono state prodotte anche enterotossine mutanti termolabili o proteine della tossina del colera in cui la subunità A (A1) tossico-attiva è stata modificata in vari modi per rimuovere l'attività "tossica" di ribosilazione dell'ADP, che porta alla tossicità. In generale, una perdita di tossicità è stata abbinata a una corrispondente perdita di adiuvantività, ma alcune proteine sono disponibili

con adjuvantività significativa in assenza di tossicità rilevabile quando somministrate per via nasale .

Il DNA batterico o gli oligodesossinucleotidi sintetici contenenti "motivi CpG" non metilati (CpG ODN) rappresentano un altro tipo promettente di adiuvante della mucosa. CpG ODN stimola le cellule che esprimono il recettore Toll-like 9, avviando così una cascata immunomodulante. Sebbene ancora considerato principalmente per l'uso sistemico, CpG ODN è stato trovato dopo somministrazione nasale, orale o vaginale per migliorare notevolmente l'immunità della mucosa innata e adattativa nei modelli animali effetti che erano particolarmente pronunciati quando CpG ODN era collegato al B proteina subunità della tossina del colera [100](#) .(Harandi, AM 20049

Riferimenti

- Mowat AM Basi anatomiche della tolleranza e dell'immunità agli antigeni intestinali. *Nat. Rev. Immunol.* 3 , 331–341 (2003).
- Kunkel, EJ & Butcher, EC Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.* 3 , 822–829 (2003)
- Campbell, DJ, Debes, GF, Johnston, B., Wilson, E. & Butcher, EC Targeting delle risposte delle cellule T mediante espressione selettiva del recettore delle chemochine. *Semin. Immunol.* 15 , 277–286 (2003).
- Harandi, AM e Holmgren, J. CpG DNA come potente induttore dell'immunità della mucosa: implicazioni per l'immunoprofilassi e l'immunoterapia delle infezioni della mucosa. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 5 , 141–145 (2004).