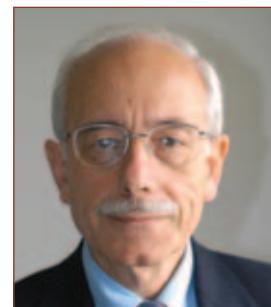


LA MESSA A PUNTO DI UN VACCINO ANTIMALARICO: PROGRESSI E PROBLEMI



Giancarlo Majori

Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

Nel 1955 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) lanciò la campagna mondiale di eradicazione della malaria basata sull'impiego del DDT applicato all'interno delle abitazioni contro gli anofeli vettori e sull'uso dei farmaci antimalarici per l'eliminazione del plasmodio nell'uomo. La campagna di lotta portò, verso la fine degli anni '60, all'eradicazione della malaria in tutti

i Paesi sviluppati (Paesi del Mediterraneo, molte regioni dei tropici, ecc.), laddove la parassitosi era endemica, e all'interruzione della trasmissione in gran parte delle aree dell'Asia tropicale e dell'America Latina (ad esempio, in Brasile il numero dei casi diminuirono da 6 milioni a 37.000). Per quanto riguarda l'Africa, la campagna interessò soltanto tre Paesi poiché, sulla base dei risultati di progetti pilota,

non fu ritenuta fattibile la sua estensione nella restante parte del continente. I primi risultati della lotta antimalarica furono straordinari, ma negli anni successivi non si registrarono miglioramenti derivanti dalla strategia di lotta adottata, anzi la resistenza dei vettori al DDT e del plasmodio alla cloroquina, farmaco insuperabile per efficacia ed economicità, influirono pesantemente sull'andamento del

LA MALARIA IN SINTESI

La malaria è una malattia infettiva causata da protozoi del genere *Plasmodium*. Sono circa 150 le specie di plasmodi malarici che parassitano ospiti vertebrati, quali rettili, uccelli, primati e uomo. I plasmodi sono dotati di notevole specificità parassitaria. Le specie di plasmodio che causano la malaria nell'uomo sono quattro: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale* e *P. malariae*, agenti eziologici di varie forme di malattia. *P. falciparum* è l'agente eziologico della terzana maligna, tristemente nota per la sua elevata letalità. La malaria viene trasmessa da uomo a uomo quasi esclusivamente attraverso la puntura di zanzare femmine del genere *Anopheles* che si infettano se pungono un soggetto malarico (sono rari i casi di malaria trasmessa accidentalmente per trasfusione o per uso di siringhe contaminate) (Figura 1). La sintomatologia malarica è caratterizzata da accessi febbrili (coincidenti con la rottura dei globuli rossi e la successiva invasione di nuovi eritrociti), brividi, splenomegalia e anemia. La zanzara infetta trasmette la malaria a tutti i soggetti che riesce a pungere nell'arco del suo ciclo vitale, inoculando insieme con la saliva gli "sporozoiti" in essa contenuti, ovvero le forme infettanti del plasmodio. Gli sporozoiti rimangono in circolo per non più di mezz'ora, per poi localizzarsi nel fegato dove ha inizio la "fase epatica" o "eso-eritrocitaria". In questa fase gli sporozoiti crescono e si dividono in numerosi "merozoiti" intracellulari. Dopo il completamento dello sviluppo si ha la rottura degli epatociti infettati e l'immissione dei merozoiti nel torrente sanguigno. I merozoiti si attaccano ai recettori di membrana dei globuli rossi e iniziano una fase di sviluppo nota come "ciclo eritrocitario". All'interno dell'eritrocita il parassita è riconoscibile all'osservazione al microscopio per la forma ad anello del trofozoita. I trofozoiti si accrescono nutrendosi dell'emoglobina eritrocitaria, si dividono e raggiungono lo stadio di "schizonte". Dopo una serie di divisioni nucleari, gli eritrociti si rompono liberando numerosi merozoiti che iniziano di nuovo il ciclo di invasione e sviluppo in altri globuli rossi, ovvero nuovi "cicli eritrocitari". In *P. vivax* e *P. ovale* i parassiti epatici persistono sotto forma di "ipnozoiti" per dar luogo dopo mesi o anni a una o più ondate di infezioni dei globuli rossi, note come "recidive malariche". Alcuni merozoiti che invadono i globuli rossi si trasformano in "gametociti" maschili e femminili. Quando una zanzara punge un individuo malarico ingerisce queste forme sessuate che, all'interno dello stomaco, si accoppiano (ciclo sessuato o "sporogonico") per dar luogo a numerosi oocineti contenenti dopo maturazione migliaia di sporozoiti che invadono le ghiandole salivari del vettore. A questo punto l'anofele è in condizione di trasmettere la malaria al soggetto che viene punto. E il ciclo continua.

programma di eradicazione, al punto che numerose aree ex-endemiche furono reinvasse dalla parassitosi.

Nel 1969 l'OMS abbandonò la strategia dell'eradicazione per sostituirla con quella del controllo, ossia una riduzione programmata della morbosità e mortalità. Nel 1992 elaborò una nuova strategia di lotta con priorità massima al controllo della malattia più che dell'infezione, e quindi enfasi alla diagnosi precoce e al trattamento immediato nell'ambito di programmi gestiti dal sistema sanitario di base. In molti Paesi, quali Thailandia, Cina, Brasile, Isole Salomone, Filippine, Vietnam, i risultati ottenuti in termini di controllo sono stati buoni, ma non si può dire lo stesso per tanti altri, e soprattutto per quelli dell'Africa Sub-sahariana.

L'attesa di un vaccino contro la malaria

La messa a punto di un vaccino antimalarico è un obiettivo inseguito da più di 30 anni a questa parte, ma non ancora raggiunto.

Quali sono gli aspetti che rendono difficile la messa a punto di un vaccino?

L'immunità naturale si ottiene lentamente e soltanto a seguito di una continua esposizione all'infezione. Un neonato in zona endemica ha un'immunità passiva che gli deriva dalla madre fino all'età di 6 mesi. Successivamente, è soggetto all'infezione. L'immunità antimalarica che la popolazione acquisisce col tempo non è un'immunità sterilizzante. Tale immunità, chiamata dalla scuola francese "premunizione", è in buona sostanza una "pace armata" che dura e si irrobustisce fino a che vi è esposizione al plasmodio. L'immunità, ottenuta così faticosamente, si perde in breve tempo dopo aver lasciato le zone malariche. Inoltre essa è legata ai vari ceppi di *P. falciparum*.

È immediata a questo punto la seguente riflessione: si riuscirà a mettere a punto un vaccino antimalarico più potente dell'infezione naturale?

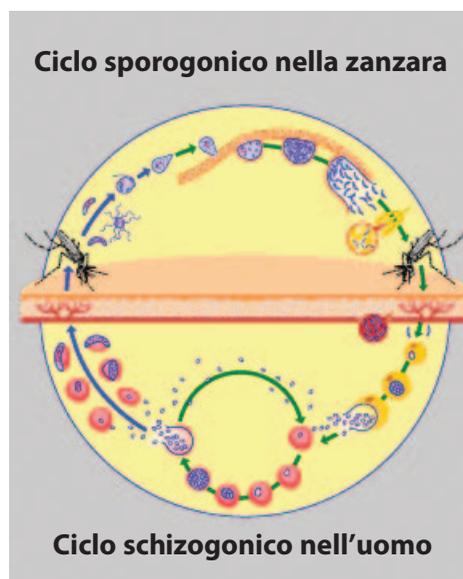


Figura 1 - Ciclo di sviluppo del plasmodio della malaria

Su cosa si basa la speranza di mettere a punto un vaccino antimalarico?

È stato osservato che mentre ripetute somministrazioni naturali di sporozoi non sviluppano un'immunità immediata, una singola somministrazione di sporozoi irradiati/attenuati produce nell'uomo, nei primati e nei roditori un'immunità parziale o totale.

I soggetti che vivono in zone ad alta trasmissione malarica acquistano nel tempo un'immunità ►

EPIDEMIOLOGIA DELLA MALARIA

Attualmente, circa il 40% della popolazione mondiale è ancora a rischio d'infezione malarica. Tale popolazione vive nei Paesi più poveri del pianeta, dove il reddito pro capite annuo medio è inferiore a 400 dollari USA, autorizzando a definire la malaria una patologia della povertà (Figura 2). I Paesi a endemia malarica sono circa 100. Il 90% della mortalità per malaria si verifica nell'Africa Sub-sahariana. *P. falciparum* è l'agente eziologico della terzana maligna, l'unica forma di malaria altamente letale, se non curata in tempi rapidi. L'OMS stima che i casi clinici di malaria siano 300-500 milioni all'anno, con più di 1 milione di decessi: ogni 10 secondi un africano muore per malaria. La maggior parte della mortalità si ha nella fascia di età 1-5 anni. Infatti sono molti i bambini che, colpiti da un attacco acuto di malaria, vanno poi incontro a una forma cerebrale con coma ed esito fatale. In Africa la malaria causa approssimativamente il 20% della mortalità infantile; sono tanti i casi di anemia grave che si instaura a seguito di ripetute infezioni malariche. Coloro che sopravvivono possono essere colpiti da sequele neurologiche che spesso compromettono in modo grave lo sviluppo e l'apprendimento scolastico. Nell'Africa Sub-sahariana il 30-50% delle visite ambulatoriali e il 50% dei ricoveri sono dovuti a malaria. Nelle zone endemiche le donne in gravidanza sono 4 volte più suscettibili agli attacchi malarici; il 60% degli aborti è dovuto a malaria. In Africa la malaria causa una perdita di produzione valutata intorno a 12 miliardi di dollari USA.

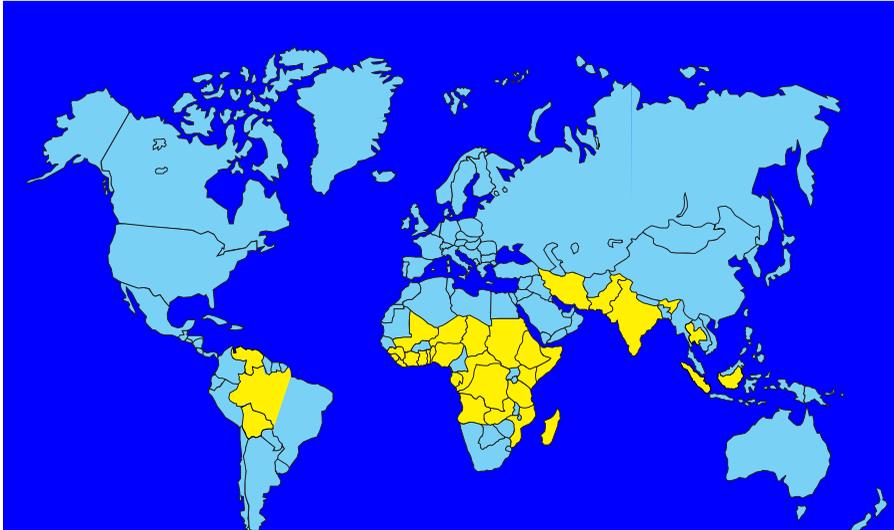


Figura 2 - Paesi a endemia malarica con reddito pro capite annuo medio di 400 dollari USA

clinica, inizialmente nei confronti della severità dell'infezione e successivamente anche della sintomatologia clinica in sé.

I soggetti infettati sviluppano una parziale immunità nei confronti dei parassiti, al punto che gli adulti presentano una parassitemia di solito non elevata e senza manifestazioni cliniche.

L'immunità può essere trasferita passivamente da un soggetto immune a uno non immune mediante somministrazione di immunoglobuline, con evidente dimostrazione che l'immunità nei confronti degli stadi ematici è mediata da anticorpi.

La prima pubblicazione sulla vaccinazione nell'uomo con sporozoi irradiati risale al 1973. Esaurita l'iniziale fase di studio sulla protezione antimalarica con somministrazione di sporozoi irradiati, questa metodologia è stata abbandonata. Da allora sono stati fatti progressi enormi, ma il cammino per la messa a punto di un vaccino antimalarico è ancora lungo. L'uso della tecnologia del DNA ricombinante per generare vaccini a base di sub-unità proteiche, il completamento del se-

quenzamento del genoma di *P. falciparum*, la conoscenza sempre maggiore del polimorfismo del DNA, dell'RNA messaggero e dei profili di espressione delle proteine hanno consentito di fare passi avanti sulla conoscenza delle interazioni molecolari parassita-ospite e vettore-parassita.

Per poter sviluppare un vaccino contro la malaria si richiede molto di più della conoscenza degli aspetti molecolari, patogenetici ed epidemiologici delle specie plasmidiali: bisogna capire in che modo la risposta immunitaria dell'ospite interagisce con il parassita. Tale conoscenza consente di progettare candidati vaccini che stimolano l'esatto effettore del sistema immunitario e che assicurano un'immunogenicità e protezione nei confronti dei vari stadi del parassita malarico.

Negli ultimi 20 anni sono stati effettuati più di 40 sperimentazioni cliniche usando peptidi sintetici o proteine ricombinanti basate su antigeni malarici di *P. falciparum*. Dei circa 5.300 antigeni codificati di *P. falciparum*, soltanto di 20 se ne conosce il ruolo protettivo nei confronti

dell'infezione e resta ancora da chiarire l'esatta natura della risposta immune protettiva. Sappiamo che lo sporozoite, libero di muoversi in circolo per pochissimo tempo, dovrà essere aggredito rapidamente da un anticorpo a titolo elevato e di elevata specificità, per evitare che ogni sporozoite non neutralizzato dall'anticorpo dia luogo, una volta

raggiunto il fegato, a più di 40.000 merozoiti che continuano poi a svilupparsi nei globuli rossi. Nella fase epatica, inoltre, potrà intervenire un'immunità cellulare (risposta di tipo Th1) con stimolazione di linfociti citotossici (sia CD4⁺ che CD8⁺) che possono identificare e distruggere le cellule epatiche infette e i parassiti in essa contenuti. Durante la fase ematica, il parassita si nasconde nell'eritrocita. Dal momento che i globuli rossi non esprimono peptidi MHC di classe I o MHC di classe II, la risposta immune dipende dai processi anticorpali associati. Ad esempio, le cellule citotossiche e il complemento litico possono avere un ruolo nell'eliminazione degli eritrociti infetti, e l'infezione naturale può esercitare un'azione di richiamo.

Strategie per produrre un vaccino antimalarico

Considerando il ciclo di sviluppo del plasmodio malarico, sono stati considerati essenzialmente sei bersagli per la messa a punto di un vaccino:

- gli sporozoit (gli anticorpi anti-sporozoit bloccano l'invasione degli epatociti);
- gli stadi epatici (l'IFN- γ rilasciato dai CD8⁺ induce produzione di NO - potente sostanza antiparassitaria - da parte degli epatociti; i linfociti T citotossici CD8⁺ e le cellule NK esercitano una citotossicità e inducono apoptosi; le cellule NK più gli anticorpi esercitano citotossicità cellulare anticorpo-dipendente);
- i merozoiti (gli anticorpi bloccano l'invasione dei globuli rossi);
- le tossine (gli anticorpi bloccano le tossine impedendo l'insorgere della sintomatologia clinica della malaria non complicata e grave);
- i globuli rossi infettati (gli antigeni plasmodiali espressi sulla superficie delle emazie infettate diventano "visibili" agli anticorpi e l'azione si svolge mediante opsonizzazione, citotossicità cellulare anticorpo-dipendente, lisi cellulare mediata dal complemento, citochine secrete da CD4⁺ e da monociti);
- gli stadi sessuati (gli anticorpi bloccano la fertilizzazione o il passaggio dell'oocinete attraverso la parete dello stomaco della zanzara).

Tipi di vaccino

L'effetto del vaccino dipende dall'antigene/i selezionati. Sono in molti a ritenere che il vaccino, per essere efficace, debba essere composto da più stadi del ciclo di sviluppo del plasmodio.

Gli antigeni presi in considerazione come possibili candidati vaccini sono quelli delle seguenti proteine: proteina circusporozoi-

tica (CSP) e sporozoitica (SSP-2); trombospondina (TRAP); antigene dello stadio epatico (LSA-1); proteina di superficie del merozoita (MSP-1 e MSP-2); proteine associate alle rhoptrie (RAP-1 e RAP-2), gli antigeni leganti gli eritrociti (EBA-175) e apicali della membrana degli stadi asessuati (AMA-1); antigeni dell'oocinete Pfs 25 e antigene specifico del gametocita Pfg27.

Gli studi sperimentali effettuati in questi ultimi decenni sono stati indirizzati verso 3 tipi di vaccini:

- *Vaccini pre-eritrocitari* - Se efficaci al 100%, essi proteggerebbero dall'invasione delle cellule epatiche e/o distruggerebbero i parassiti negli epatociti infettati. L'ospite non avrà nessuna infezione malarica e quindi nessuna manifestazione clinica e nello stesso tempo si bloccherebbe la trasmissione della malaria. Sarebbe ideale per i viaggiatori non immuni che si recano in zone malariche.
- *Vaccini eritrocitari* - I vaccini degli stadi ematici indurrebbero la produzione di elevati titoli anticorpali in grado di prevenire sia l'invasione dei globuli rossi da parte dei merozoiti sia l'eliminazione delle emazie parassitate e sia la sequestrazione degli eritrociti parassitari che è alla base dell'eziopatogenesi della malaria grave.
- *Vaccini che bloccano la trasmissione della malaria* - Essi indurrebbero immunità nei confronti degli stadi che infettano il vettore con conseguente impedimento della trasmissione della malaria. Questi vaccini, non prevenendo l'infezione nel vaccinato, vanno sotto il nome di "vaccini altruisti".

Vi sono oggi da 25 a 75 candidati vaccini. In genere non più del 20% raggiunge la fase 1 e solo il 20% raggiunge la fase 3. La fase di sperimentazione clinica 2a/b accerta la sicurezza, la risposta immunitaria e dà indicazione preliminare sull'efficacia (la fase 3 riguarda sicurezza e efficacia, la fase 4 il follow-up sulla sicurezza e efficacia). Il ciclo completo di sperimentazione dura in genere dai 10 ai 12 anni e richiede la sperimentazione su 50.000-100.000 volontari, con un costo totale stimato in più di 500 milioni di dollari USA.

La recente collaborazione tra la Glaxo-Smithkline e l'US Walter Reed Army Institute of Research ha consentito la produzione di una proteina ricombinante (RTS,S/AS02) formata dalla fusione della proteina circusporozoitica (CSP), con l'antigene di superficie dell'epatite B (HbsAg). L'adiuvante impiegato è stato l'AS02.

Il vaccino pre-eritrocitario RTS,S/AS02 in sperimentazione è un potente induttore di cellule di tipo Th1 che generano alte concentrazioni di IgG verso la regione ripetuta CSP e di risposta in termini di proliferazione di linfociti alla RTS,S. Il vaccino, in tre dosi intramuscolari, è stato sperimentato nel mese di agosto 2004 nel sud del Mozambico su una popolazione di 2.022 bambini di 1-4 anni. I risultati più interessanti sono stati una riduzione del 30% di attacchi di malaria e del 60% di malaria grave, con una protezione di circa sei mesi. Il messaggio più incoraggiante è stato quello di aver trovato una procedura promettente e riproducibile, che consentirà sicuramente di migliorare il prodotto in termini di efficacia e di durata protettiva. ■