

APPROCCI PER LO STUDIO DI UN NUOVO VACCINO ANTITUBERCOLARE



**Lanfranco Fattorini, Carla Palma, Federico Giannoni,
Manuela Pardini, Elisabetta Iona, Lara Brunori e Antonio Cassone**
Dipartimento di Malattie Infettive, Parassitarie ed Immunomediate, ISS

La tubercolosi (TB) è una malattia infettiva che può interessare tutti gli organi ma che colpisce prevalentemente i polmoni e, nell'infanzia, le meningi, causata da un batterio, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (1). Il rischio di trasmettere la malattia da un malato a una persona ricettiva è in funzione del numero dei bacilli emessi, della durata del contatto e della quantità di aria condivisa. A seguito dell'inalazione di MTB si possono avere varie conseguenze quali l'eliminazione del batterio, un'infezione subclinica, una malattia (TB primaria) limitata nel tempo o estremamente grave. È da sottolineare che, nell'uomo infetto, MTB non viene quasi mai completamente eliminato, anzi è capace di rimanere vitale anche per tutta la vita in una fase detta di dormienza (TB latente) che non induce nel soggetto alcun segno clinico o patologico. Alcuni fattori di rischio quali mancanza di condizioni igieniche, malnutrizione, vecchiaia e indebolimento delle difese immunitarie consentono la riattivazione di MTB e lo sviluppo della malattia. Dati epidemiologici indicano che circa il 90% dei soggetti infetti non sviluppa la TB mentre il 5% va incontro a malattia nei due anni successivi all'infezione e il 5% sviluppa la malattia in un momento successivo della vita. La presenza di infezione può essere rivelata mediante un test cutaneo (intradermoreazione secondo Mantoux) che indica l'avvenuto contatto con MTB ma non la malattia in atto.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima che a livello mondiale le persone infette da MTB siano 2 miliardi, ovvero un terzo dell'umanità, e che ogni anno circa 8 milioni sviluppino la malattia e 1,8 milioni (5.000 al giorno)

muoiano a causa di essa, di cui il 98% nei Paesi poveri. Si calcola che, soprattutto in Africa, un terzo delle persone infette con HIV siano infette anche con MTB e che la TB sia responsabile della morte di un paziente su tre affetto da AIDS. Sebbene le aree in cui la TB è endemica siano prevalentemente le aree povere del mondo, il problema della TB non lascia immuni i Paesi più industrializzati, sia a causa dei movimenti immigratori da Paesi poveri, sia per il turismo, sia infine per la presenza di sacche di povertà e di condizioni di vita insalubri che caratterizzano molti Paesi occidentali. A livello individuale, la TB è abbastanza controllabile dalla terapia antibiotica ma il trattamento, per essere efficace, deve essere condotto con una scelta accurata di antibiotici e per un tempo considerevole (6 mesi). Questo regime terapeutico è relativamente semplice da mantenere nei Paesi occidentali, ma la situazione è più complessa nei Paesi poveri e l'OMS compie sforzi enormi per ►



diffondere quanto più possibile in Africa, Asia e nei Paesi dell'ex Unione Sovietica la cosiddetta "terapia direttamente osservata" (DOT) allo scopo di assicurare che i pazienti assumano veramente i farmaci antitubercolari sì da limitare il numero dei malati e lo sviluppo di batteri resistenti agli antibiotici.

Il vaccino antitubercolare attualmente in uso offre scarsa protezione

Purtroppo, agli sforzi terapeutici assolutamente meritevoli da parte dell'OMS non corrisponde sempre un controllo efficace della TB e delle sue forme resistenti nei vari Paesi. Non vi è alcun dubbio, pertanto, che a livello di popolazione, come per altre malattie infettive, il vero controllo della TB potrà essere ottenuto solo attraverso l'uso di un vaccino efficace che impedisca il propagarsi della malattia.

L'unico vaccino antitubercolare attualmente in uso è un vaccino vivo attenuato, il bacillo di Calmette-Guérin (BCG). Il BCG deriva da un ceppo di *Mycobacterium bovis* selezionato da Albert Calmette e Camille Guérin negli anni che vanno dal 1908 al 1921. Il ceppo, dopo molti passaggi *in vitro* per ridurne la patogenicità, venne somministrato per la prima volta a un neonato nel 1921. Tra il 1921 e il 1927, in altri 969 bambini vaccinati con il BCG solo il 3,9% morì di TB mentre nei bambini non vaccinati la mortalità fu del 32,6%. Nel corso del tempo, l'originario ceppo di BCG, in seguito a processi di selezione e mantenimento in coltura, si è ulteriormente diversificato, dando origine a ceppi (Pasteur, Copenhagen, Glaxo, Brazil, Japan, Russia) con variegate caratteristiche antigeniche. Finora più di 3 miliardi di persone sono state vaccinate con i vari ceppi derivanti dall'originario BCG, per cui, dopo più di 80 anni di somministrazione, se non si hanno dubbi sulla sua sicurezza i dati di efficacia sono piuttosto contraddittori. Molti trials clinici indicano che quando il BCG viene somministrato in età neonatale l'efficacia è limitata nel tempo in quanto la popolazione sembra essere protetta fino a 5-10 anni di vita soprattutto verso la TB meningea e miliare. Il vaccino non è invece efficace nell'adulto né per la prevenzione della TB polmonare né per impedire la riattivazione della TB latente. Le cause della mancanza di protezione nell'adulto non sono



note. Non si sa, ad esempio, se insorgano fattori come le differenze del sistema immunitario tra bambino e adulto o la particolare capacità di MTB di instaurare nel tempo una serie di strategie per evadere o deviare la risposta immunitaria, che in un primo momento nei bambini risulta essere protettiva. Nonostante il BCG abbia una limitata efficacia preventiva e non contribuisca a eliminare la malattia, il suo uso allo scopo di debellare almeno nei bambini la TB è raccomandato dall'OMS nei Paesi in cui la malattia è endemica e dove la spesa sanitaria non può permettersi gli elevati costi del trattamento antibiotico.

In Italia, un Paese a bassa prevalenza in cui il tasso annuo di malattia tubercolare è inferiore a 10 casi su 100.000, il DPR n. 465 del 7 novembre 2001, pubblicato sulla *Gazzetta Ufficiale* n. 7 del 9 gennaio 2002, ha stabilito che la vaccinazione antitubercolare è obbligatoria soltanto per: a) neonati e bambini di età inferiore a 5 anni, con test tubercolinico negativo, conviventi o aventi contatti stretti con persone affette da TB in fase contagiosa, qualora persista il rischio di contagio; b) personale sanitario, studenti in medicina, allievi infermieri e chiunque, a qualunque titolo, con test tubercolinico negativo, operi in ambienti sanitari ad alto rischio di esposizione a ceppi di MTB multifarmacoresistenti oppure che operi in ambienti ad alto rischio di TB e non possa, in caso di cuticonversione, essere sottoposto a terapia preventiva perché presenta controindicazioni cliniche all'uso di farmaci specifici.

È possibile lo sviluppo di un nuovo vaccino antitubercolare più efficace del BCG?

Recentemente sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione dell'immunogenicità del BCG e molte proteine comuni al BCG e al MTB - ricordiamo, ad esempio, il complesso antigenico 85 - sono state caratterizzate e studiate per la loro capacità di indurre risposte immunitarie. Il BCG, sia in modelli animali che nell'uomo, è altamente immunogenico, cioè contiene ed esprime potenti antigeni riconosciuti dal sistema immune dell'ospite, con risposte umorali e cellulari. Ed è proprio la capacità di attivare la risposta cellulosa-mediata alla base dei meccanismi di protezione poiché è possibile trasferire la protezione dell'animale immunizzato a quello non immunizzato attraverso linfociti attivati ma non attraverso gli anticorpi presenti nei sieri immuni. Sebbene si concordi che la risposta protettiva debba possedere la capacità di attivare la risposta detta T helper 1 (Th1) e indurre linfociti specifici con capacità di uccidere MTB e i macrofagi dove esso cresce e si replica, non è ancora noto un parametro immunologico/clinico correlabile con l'efficacia della vaccinazione. Ciò è dovuto alla complessità della risposta verso i micobatteri, mutevole a seconda delle varie fasi della patologia, con risposte che possono essere per certi versi protettive e in altre condizioni invece deleterie. Lo studio della risposta immunitaria verso la TB è quindi uno strumento importante per identificare le strategie di profilassi antitubercolare, accanto allo sviluppo di nuove formulazioni vaccinali (2). La mancanza di un parametro clinico correlabile con la protezione vaccinale è anch'esso un grosso limite per la valutazione di nuovi vaccini,



poiché per valutarne l'efficacia si deve ricorrere a modelli di infezione nell'animale (principalmente topo e cavia) con un forte dispendio di risorse economiche e lunghi tempi di sperimentazione.

Un tentativo di classificare i numerosi vaccini per uso profilattico attualmente in studio nel mondo è quello di TM Doherty (3) dello Statens Serum Institut di Copenhagen, il quale li ha divisi in due grandi gruppi, quelli da usare per il "priming" e quelli per il "boosting". I primi, pensati per sostituire il BCG e adatti per la vaccinazione dei neonati *naïve* in Paesi ad alta endemia di TB, sono costituiti da micobatteri vivi quali, ad esempio, BCG ricombinanti, iperproduttori dell'antigene 85B, e MTB auxotrofi, incapaci di sintetizzare aminoacidi (4). Il principio su cui si basano i BCG ingegnerizzati è che, avendo il BCG perduto geni immunologicamente importanti durante la selezione iniziale, l'aggiunta e/o l'aumentata espressione di uno o più geni può rendere il vaccino più protettivo del BCG stesso; un approccio promettente è anche quello basato sull'uso di ceppi di BCG privi di ureasi e produttori di listeriolisina in grado di indurre in modo particolare linfociti citotossici. I BCG ingegnerizzati, così come alcuni MTB auxotrofi, hanno dimostrato di essere un po' più protettivi del BCG negli animali; resta però da chiarire la sicurezza di tali preparazioni soprattutto per quello che concerne gli MTB auxotrofi.

Tra i vaccini sperimentali pensati per "boostare", ovvero ristimolare nell'adolescente e nell'adulto la risposta immunitaria indotta dal BCG, vanno ricordati i vaccini a subunità e a DNA, preparati, rispettivamente, con proteine ricombinanti o con plasmidi in grado di esprimere geni codificanti per proteine immunologicamente rilevanti quali antigene 85B, antigene 85A, proteina di fusione 85B-ESAT6 (Ibrido 1), proteina di fusione 72f. In questo gruppo vanno annoverati anche i vaccini a vettori vivi contenenti virus quali "vaccinia virus Ankara (MVA)" e adenovirus, o batteri (*Salmonella typhimurium*), ingegnerizzati per produrre gli antigeni 85A o ESAT6. Per molti di questi vaccini è stata accertata una buona risposta immunologica e protettiva in sperimentazioni di tipo "prime-boosting" in cui il "priming" veniva effettuato con BCG oppure, a seconda dei casi, con proteine o DNA plasmidico, o altre combinazioni.

Un piccolo numero di studi ha anche affrontato il tema dei vaccini terapeutici (chiamati anche di "post-exposure" rispetto all'infezione da MTB, ►



in contrapposizione a quelli profilattici o di “post-exposure” di cui è parlato sopra) allo scopo di controllare la riattivazione della TB latente, molto diffusa nei Paesi poveri, ma finora, a parte rare eccezioni, i risultati non sono stati di grande rilievo.

Finanziamenti per la ricerca di un nuovo vaccino antitubercolare

Recentemente, alcune istituzioni pubbliche e private hanno contribuito con notevoli aiuti finanziari alla ricerca nel campo dei vaccini antitubercolari. Tra questi, ricordiamo il finanziamento della fondazione Bill & Melinda Gates (<http://www.aeras.org/>) coordinato dai “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” e i fondi della Commissione Europea sia nel 5° programma quadro (TBVAC) (http://www.pasteur.fr/recherche/EC_TBvaccine/html/Game.html) che nel 6° programma quadro, quali il nuovo TBVAC (http://europa.eu.int/comm/research/fp6/index_en.html) e il progetto MUVAPRED (<http://www.mucosalimmunity.org/muvapred/>). Quest’ultimo riguarda i vaccini mucosali (intranasali o orali) che, non dovendo usare aghi, sarebbero certamente importanti per i Paesi poveri ad alta endemia di TB e HIV in cui alto è il rischio di contrarre l’infezione da HIV per via parenterale.

In conseguenza di tali finanziamenti e del contributo di alcune aziende farmaceutiche, nel 2004-2005 alcuni vaccini dimostratisi particolarmente protettivi almeno nel topo e nella cavia (BCG ricombinante iperproduttore di 85B, MVA-85A, Ibrido 1, 72f), sono entrati in studi di fase 1 su vo-

lontari umani. Ovviamente per le fasi 2 e soprattutto per la fase 3 (verifica della protezione) occorreranno molti anni per sapere se qualcuno di questi vaccini proteggerà l’uomo meglio del BCG. In ogni modo è stato già riportato che MVA-85A potenzia significativamente nell’uomo la risposta immunologica indotta dal BCG (5). Accanto a questi vaccini sperimentali che hanno già raggiunto la fase clinica, la ricerca di base sta andando avanti per cercare di capire quale sia il tipo di risposta immunitaria che occorre sviluppare per ottenere una risposta in grado di controllare l’infezione e lo sviluppo della patologia tubercolare nel tempo.

La ricerca sulla profilassi antitubercolare all’Istituto Superiore di Sanità

All’ISS sono in corso ricerche volte ad aumentare le conoscenze sulla risposta immunitaria dell’uomo verso l’infezione da MTB e sui meccanismi che il micobatterio sfrutta per la sua persistenza nell’individuo che sono strumentali all’identificazione di una strategia più generale per la profilassi della TB. Contemporaneamente, nel modello murino, sono allo studio nuovi presidi antitubercolari basati sia su vaccini a DNA codificanti per l’antigene 85B e per l’Ibrido 1 sia sull’uso di sistemi di delivery vaccinale per via parenterale e mucosale quali i virosomi. Questi ultimi studi vengono condotti nell’ambito del progetto europeo MUVAPRED. Altre ricerche riguardano l’uso combinato di proteine della dormienza e di proteine precoci di MTB. ■

Riferimenti bibliografici

1. Cassone A, Angarano G, Antinori A *et al.* Tuberculosis, epidemiologia, diagnosi e terapia. Accademia Nazionale di Medicina 2000. MD35.
2. Gagliardi MC, Teloni R, Mariotti S *et al.* Bacillus Calmette-Guerin shares with virulent *Mycobacterium tuberculosis* the capacity to subvert monocyte differentiation into dendritic cell: implication for its efficacy as a vaccine preventing tuberculosis. *Vaccine* 2004;22(29-30):3848-57.
3. Doherty MT. New vaccines against TB. *Tropical Medicine and International Health* 2004;9:818-26.
4. Britton WJ, Palendira U. Improving vaccines against tuberculosis. *Immunol Cell Biol* 2003;81:34-45.
5. McShane H, Pathan AA, Sander CR *et al.* Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans. *Nat Med* 2004; 10:1240-4.