

I meccanismi molecolari delle immunoglobuline per via endovenosa

Paola Pansa, Gabriella Giancane, Marzia Duse



Parole chiave: intravenous immunoglobulin (IVIG), sialilazione, citochina, immunodeficienza

Abstract

L'utilizzo terapeutico delle immunoglobuline endovena (IVIG: IntraVenous ImmunoGlobulin) trova applicazione nelle patologie del sistema immunitario di tipo quantitativo, in termini di difetto (immunodeficienze) o eccesso (patologie autoimmuni), e di tipo qualitativo (infiammatorie). Le categorie descritte delimitano un ampio raggio d'azione delle IVIG, precedentemente appannaggio della sola figura dell'immunologo e attualmente esteso a molteplici ambiti. Il razionale che motiva la scelta terapeutica deriva dalla duplice funzione delle IVIG, sostitutiva da una parte e anti-infiammatoria/immunomodulante dall'altra. La definizione dei meccanismi molecolari specifici e degli elementi cellulari direttamente coinvolti apre nuove prospettive verso l'impiego ottimale e l'eventuale ampliamento delle indicazioni terapeutiche.

Introduzione

L'impiego delle immunoglobuline endovena (IVIG: IntraVenous ImmunoGlobulin) si è andato enormemente ampliando in questi decenni, a partire dalla constatazione che alte dosi di IVIG esercitavano una azione anti-infiammatoria/immunomodulante. Gli sforzi si sono concentrati in due direzioni: da un canto la definizione e comprensione dei meccanismi molecolari sottostanti e degli elementi cellulari coinvolti e dall'altro, la sperimentazione clinica in molte malattie autoimmuni o infiammatorie per definirne l'impiego ottimale. Le sperimentazioni cliniche iniziano negli anni '80 con l'osservazione che pazienti agammaglobulinemici affetti da Porpora Trombocitopenica Idiopatica (PTI), trattati con IVIG ad alte dosi, presentavano inaspettatamente una normalizzazione dei livelli pia-

strinici¹. Da allora, le proprietà regolatorie-immunomodulate delle IVIG sono state fino ad oggi largamente supportate da evidenze di efficacia clinica. La Malattia di Kawasaki, la PTI, la GVHD sono infatti solo alcune delle indicazioni in cui le IVIG costituiscono la terapia di prima linea, approvate dalla FDA e dalle agenzie regolatorie². Non altrettanto rapida è stata la progressione delle nostre conoscenze sui meccanismi cellulari e molecolari che ne stanno alla base. Ora sappiamo che i target delle IVIG sono molteplici: Cellule Dendritiche, Linfociti B, Th2, NK, Polimorfonucleati, Macrofagi e Piastrine. Ciascun elemento effettore agisce sinergicamente (direttamente e indirettamente) in una cascata di eventi notevolmente complessa che si ripercuote infine sui meccanismi di amplificazione della risposta anti-infiammatoria.

Dipartimento di Pediatria e NPI, Università Sapienza, Roma

marzia.duse@gmail.com

Gli Autori dichiarano di non avere alcun conflitto di interesse rispetto agli argomenti trattati nell'articolo.

Meccanismi di azione delle IVIG

Notoriamente, le immunoglobuline (Ig) possiedono una porzione variabile chiamata Fab (*fragment antigen binding*) che si lega all'antigene (Ag) e una porzione costante costituita dalla regione Fc (*fragment crystallizable*) che lega specifici recettori cellulari (FcR), dando luogo alla risposta effettrice. L'interazione delle IgG (come tali o all'interno di immunocomplessi) con i recettori corrispondenti FcγR induce, normalmente, la cascata infiammatoria con innesco di molteplici processi: se le IgG sono dirette verso componenti del self, questo quadro infiammatorio configura malattie autoimmuni vere e proprie.

Tuttavia, quando IgG esogene vengono somministrate in terapia ad alte dosi, la loro funzione si inverte e finiscono con l'esercitare un potente effetto anti-infiammatorio. Inizialmente si pensava fosse dovuto ad un effetto quasi meccanico, di saturazione dei recettori FcγR che non si rendevano con ciò più disponibili per autoanticorpi o immunocomplessi e conseguente "spegnimento" della infiammazione. Più recentemente sembra che a questo meccanismo si associno funzioni più rilevanti, mediate da una piccola, ma fondamentale frazione delle IgG, caratterizzate dal possedere una particolare porzione Fc contenente un glicano con terminazione sialilata in corrispondenza della posizione α2,6 del penultimo galattosio. Il fatto che solo una piccolissima frazione delle IgG, non superiore al 3% (1-3%), abbia queste caratteristiche rende conto anche del perché l'azione anti-infiammatoria si espliciti solo a dosaggi molto alti, 3-6 volte superiori rispetto a quelli abituali utilizzati in terapia sostitutiva. Si è appurato che di fatto solo le Ig che hanno questo Fc, quindi che possiedono sia lo scheletro aminoacidico che il glicano associato, hanno questa proprietà, in quanto le Glicoproteine con struttura simile ma isolata non hanno alcuna attività. In modelli sperimentali animali (murini), è stato chiaramente dimostrato che la porzione Fc 2,6-sialilata delle Ig si lega ai macrofagi splenici attraverso una specifica lectina calcio-dipendente, chiamata SIGN-R1 (*specific ICAM-3 grabbing non integrin-related 1*) che è in grado di legare glicani (mannani e destrani). Infatti, la mancanza di cellule SIGN-R1+ nella milza, la splenectomia, l'alterazione o il blocco del suo dominio di riconoscimento dei carboidrati (CRD – *carbohydrate recognition domain*) o una delezione nel gene codificante per SIGN-R1 annullano l'attività anti-infiammatoria delle IgG. Vi sarebbero poi altri macrofagi peculiari (macrofagi me-

L'interazione delle IgG con i recettori corrispondenti FcγR induce, normalmente, la cascata infiammatoria; tuttavia quando IgG esogene vengono somministrate ad alte dosi, la loro funzione si inverte e finiscono con l'esercitare un potente effetto anti-infiammatorio.

tallofilici MOMA-1+), ricchi in esterasi non-specifiche che potrebbero contribuire alla azione anti-infiammatoria per interazione con le IgG, in quanto si è visto che topi *op/op*, privi di queste cellule, sono incapaci di montare una adeguata risposta anti-infiammatoria, anche dopo alte dosi di IVIG. Il gene ortologo (ovvero omologo tra specie diverse) di SIGN-R1 nell'uomo è chiamato DC-SIGN e codifica per una proteina con sequenza omologa al CRD e uguale specificità di legame, ma che differisce per espressione cellulare, essendo espresso sulle cellule dendritiche che si trovano in numerose regioni dell'organismo e non solo nella zona marginale della milza come nel topo. Questo dato spiegherebbe il perché le IVIG ad alte dosi riescono a sviluppare la loro azione anti-infiammatoria anche nei pazienti splenectomizzati, diversamente da quanto avviene nel topo. Peraltro il gene DC-SIGN nell'uomo è probabilmente coinvolto in diverse e molteplici fasi della risposta immune; il prodotto genico infatti è in grado di legare non solo le Ig-Fc sialilate, con effetto anti-infiammatorio, ma anche le Ig ipo/asialilate la cui produzione è indotta dai marnani virali o batterici. In questo caso l'effetto sarebbe pro-infiammatorio con lo scopo ultimo di indurre la distruzione del patogeno. Lo switching tra Ig-sialilate e Ig-non sialilate suggerisce quindi che il sistema immune è in grado di produrre IgG con struttura diversa e differenzia la struttura delle Ig standard da quelle generate in risposta a stimoli antigenici specifici, con finalità opposte. Nell'un caso protegge l'organismo dall'attivazione dell'infiammazione in condizioni fi-

Lo switching tra Ig-sialilate e Ig-non sialilate suggerisce che il sistema immune è in grado di produrre IgG con struttura diversa e differenzia la struttura delle Ig standard da quelle generate in risposta a stimoli antigenici specifici.

siologiche e nell'altro contribuisce fattivamente alla infiammazione per favorire e rendere efficiente la risposta alle infezioni.

Parenteticamente alcuni virus come l'HIV, hanno sviluppato strategie di sopravvivenza sovvertendo questi meccanismi e inducendo la produzione di Ig che ingannano il sistema immune e lo spingono a indurre uno stato anti-infiammatorio permanente, con mancata clearance virale³.

Una delle principali conseguenze della interazione tra IVIG-Fc sialilate e recettore SIGN-R1/DC-SIGN (e tra i più efficaci meccanismi anti-infiammatori) è rappresentato dall'espressione del recettore inibitorio FcγR (FcγRIIB), presente sulla superficie di macrofagi, cellule B, neutrofili, mastcellule ed eosinofili^{3,4}. Il ruolo

chiave di questo recettore nella tolleranza immunologica e nella risposta anticorpo-mediata è stato ampiamente dimostrato in modelli animali: i topi knock out (FcγRIIB^{-/-}), ovvero totalmente incapaci di esprimere il recettore, sviluppano spontaneamente autoanticorpi e presentano malattie quali lupus, artriti e malattia di Goodpasture in associazione a una più bassa soglia di attivazione dei macrofagi. Ebbene, in questi topini FcγRIIB^{-/-} la somministrazione di IVIG ad alte dosi risultava totalmente inefficace al controllo della/e malattia/e, sostenendo il ruolo cruciale del recettore inibitorio FcγRIIB nei meccanismi molecolari di interazione con le IVIG nella immunosoppressione/regolazione dell'infiammazione⁴ (Fig. 1).

Al contrario, nei topi normali (wild type) per il recettore FcγRIIB, precedentemente condizionati con anticorpi anti-PLT per riprodurre sperimentalmente la Porpora Trombocitopenica Idiopatica (PTI) *in vivo*, l'infusione di IVIG ad alte dosi era in grado di ridurre in misura significativa la clearance piastrinica mediata dai fagociti e misurata come numero di complessi CD41+/CD14+, marcatori linea-specifici rispettivamente di piastrine e macrofagi⁵.

Questi dati sono peraltro stati confermati da ulteriori esperimenti. Da topi donatori sono stati prelevati leucociti e cellule dendritiche, successivamente incubati e attivati con IVIG *in vitro*, e infusi separatamente in topi riceventi. Indotta sperimentalmente la PTI nei riceventi, i livelli piastrinici erano più alti nei topi infusi con leucociti contenenti cellule dendritiche CD11c+ rispetto a quelli infusi con cellule CD11c-, documentando

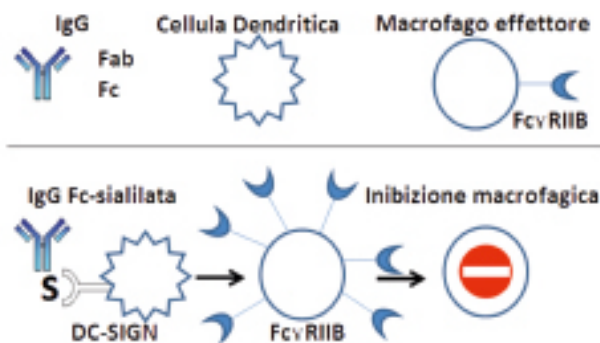


Fig. 1. L'interazione tra il recettore DC-SIGN delle cellule dendritiche e la porzione Fc-sialilata delle IgG potenzia l'espressione del recettore inibitorio FcγRIIB espresso dai macrofagi effettori, responsabili dell'azione pro-infiammatoria e, nella PTI, della clearance piastrinica.

Una delle principali conseguenze della interazione tra IVIG-Fc sialilate e recettore SIGN-R1/DC-SIGN è l'espressione del recettore inibitorio FcγR (FcγRIIB), presente sulla superficie di macrofagi, cellule B, neutrofili, mastcellule ed eosinofili.

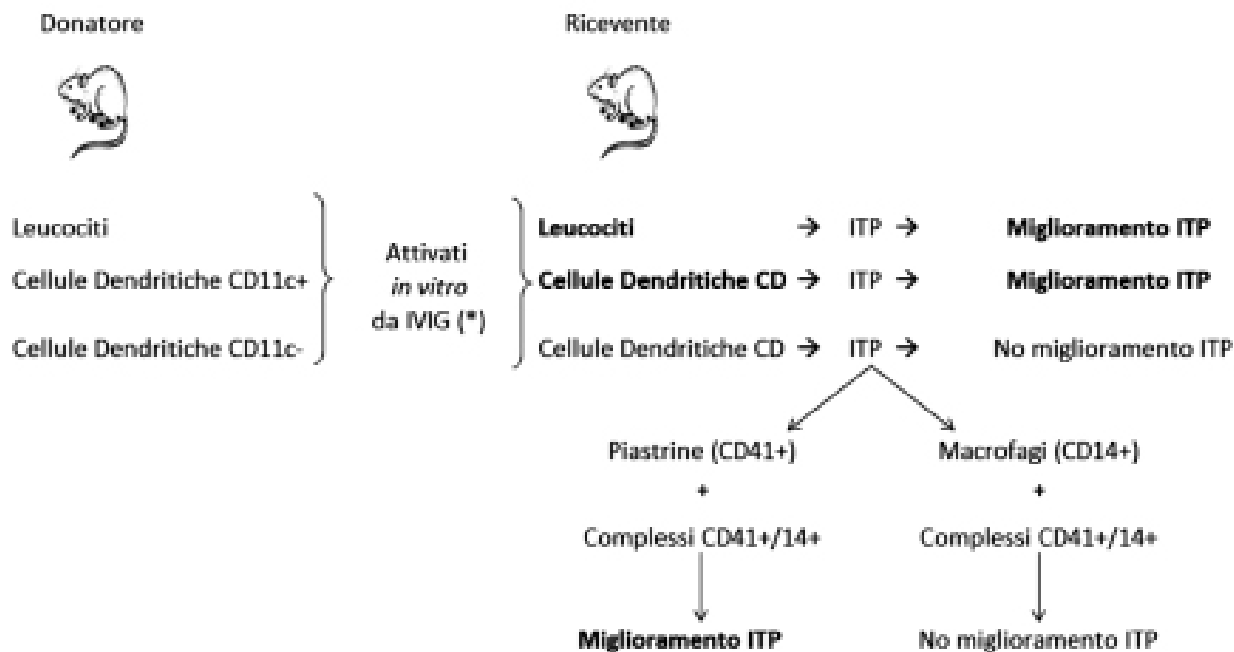


Fig. 2. Ruolo delle IVIG nel modello sperimentale di Porpora Trombocitopenica Autoimmune.

così che il principale target di azione delle IVIG è rappresentato dalle cellule dendritiche. A conferma, piastrine e macrofagi sono stati prelevati dai topi riceventi e incubati separatamente con i complessi cellulari CD41+/CD14+ che rappresentano la fase di clearance piastrinica responsabile della PTI. La riduzione dei complessi si è osservata esclusivamente con l'incubazione di piastrine, e non con macrofagi, dimostrando che le cellule dendritiche direttamente attivate da IVIG, a loro volta, direttamente agiscono sulle piastrine⁴ (Fig. 2).

Un'altra cellula target delle IVIG è rappresentata dal linfocita B e l'effetto anti-infiammatorio si esplica sia per mezzo dei recettori FcγRIIB, sia attraverso i Toll-like Receptors 7 e 9 (TLR7-TLR9). Questi ultimi in particolare sono espressi sulla membrana cellulare dei B linfociti maturi e una volta stimolati, inducono la produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'IL-6. Questi recettori vengono inibiti dalle IVIG, probabilmente ad opera delle Ig Fc-sialilate che legano il CD22 che a sua volta attiva la chinasi SHP-1, regolatore negativo della via dell'NFκB, con in ultima analisi una riduzione della produzione di citochine infiammatorie come l'IL6 ma non delle anti-infiammatorie come l'IL10⁶.

Recentemente, si è anche visto che le IVIG agiscono anche sui linfociti T; sono infatti in grado di in-

durire la produzione di un'altra citochina, l'IL33, a sua volta stimolante la produzione di IL-4 da parte delle cellule Th2, col conseguente aumento dell'espressione dell'FcγRIIB sui monocito-macrofagi ed effetto inibitorio sull'infiammazione⁷. Ed è proprio in base a queste evidenze che alcuni autori hanno sperimentato alte dosi di IVIG nelle malattie respiratorie allergiche, supponendo che l'azione anti-infiammatoria potesse realizzarsi per inibizione delle cellule NK di tipo I attraverso il recettore inibitorio FcγRIIA, con riduzione della produzione principalmente di IL-4⁸.

Più recentemente si è osservata e documentata un'azione delle IVIG anche sui polimorfonucleati (PMNs), di cui modulerebbero il reclutamento. È stata infatti documentata una inibizione dose-dipendente della migrazione transendoteliale dei PMNs attraverso le cellule endoteliali della vena ombelicale umana stimulate da citochine come IL1α e β, TNFα, o IL1β+TNFα. Dal momento che le IVIG non inibiscono al contrario la migrazione transendoteliale dei PMNs indotta da fattori chemotattici (C5a o IL8), è probabile che la interferenza delle IVIG con i meccanismi di migrazione dei PMNs si esplichi solo sulle cellule endoteliali attivate e non quelle a riposo. Infine le IVIG non inibiscono l'adesione

Tab. I. Principali meccanismi di azione anti-infiammatoria/immunomodulante delle IVIG.

Autore	Target cellulare	Recettore	Ipotesi meccanismo d'azione
Anthony et al., 2008 ³	Macrofagi della zona marginale della milza (modello murino) Cellule dendritiche (nell'uomo)	SIGN-R1 (modello murino) DC-SIGN (ortologo umano)	La sialilazione della porzione Fc-IgG ne favorisce il legame con il recettore SIGN-R1 / DC-SIGN espresso sulle cellule dendritiche. Queste ultime, stimulate, mediano un'azione anti-infiammatoria sovra-regolando l'espressione del recettore inibitorio FcγRIIB
Issekutz et al., 2011 ⁹	Polimorfonucleati		Le IVIG inibiscono la migrazione transendoteliale dei PMN, attraverso le cellule endoteliali stimulate da citochine (IL1α e β, TNFα, o IL1β+TNFα), ma non da chemochine (C5a o IL8)
Séité et al., 2011 ⁶	Linfociti B attivi	FcγRIIB, TLR7, TLR9	Blocco della produzione di citochine pro-infiammatorie, come l'IL-6
Huang et al., 2010 ⁵	Cellule dendritiche CD11c+ Leucociti Macrofagi Piastrine	FcγRIII FcγRIIB	Cellule dendritiche CD11c+ e leucociti, attivati da IVIG, inducono, se reinfusi, un miglioramento della PTI I macrofagi in seguito a infusione di IVIG subiscono una sovra regolazione del recettore inibitorio, con conseguente riduzione della clearance piastrinica Le piastrine rappresentano il bersaglio delle cellule dendritiche, responsabili del miglioramento della PTI
Araujo et al., 2011 ⁸	Linfociti NK	FcγRIIIA	Inibizione delle cellule NK
Anthony et al., 2011 ⁷	Linfociti Th2	FcγRIIB	Le IVIG aumentano la produzione di IL-33 e, di conseguenza, IL-4 (Th2 correlata) in grado di stimolare l'espressione del recettore FcγRIIB

Un'altra cellula target delle IVIG è il linfocita B e l'effetto anti-infiammatorio si esplica sia per mezzo dei recettori FcγRIIB, sia attraverso i Toll-like Receptors 7 e 9.

dei PMNs all'endotelio attivato da IL1-β o TNFα, ma interferiscono con gli eventi post-adesione. L'inibizione sembra attribuibile alla porzione F(ab)2 delle Ig ed è scorrelata dai contaminanti del preparato. Queste osservazioni sono tuttavia preliminari e devono essere ancora chiariti molti punti oscuri, ma, se confermate da altri studi, potrebbero portare alla conclusione che gli effetti delle IVIG sui PMNs si esplicano in corso di flogosi cronica, ma non durante la flogosi acuta, in cui il reclutamento dei PMNs è indotto da fattori chemotattici ⁹.

Tab. II. Indicazioni delle IVIG nella terapia sostitutiva.

Indicazioni delle IVIG nella terapia sostitutiva			
Immunodeficienze	Primitive*	Agammaglobulinemia Ipogammaglobulinemia	A.R., X-Linked CVID IPER IgM THI Deficit di risposta anticorpale specifica Deficit di risposta anticorpale specifica Deficit sottoclassi IgG
	Secondarie	Infettive Onco-ematologiche Neonatali	HIV* Sepsi, shock settivo, s. Da shock tossico Polmonite Gastroenterocolite Leucemia a cellule B* Trapianto di midollo osseo* Prematurità

* Approvate dalla FDA (Food and Drugs Administration) ².

IVIG nella terapia sostitutiva: le immunodeficienze

Ben diverso e più intuibile è il meccanismo d'azione dell'IVIG nell'ambito della terapia sostitutiva, equivalendo a quello fisiologicamente svolto dalle Immunoglobuline IgG, unica classe realmente sostituita dai preparati di IVIG che contengono una percentuale superiore al 95% di IgG. Attraverso la infusione di IVIG, si somministrano dosi consistenti di anticorpi ad attività antibatterica e antivirale con conseguente "protezione passiva" da infezioni, si attiva il sistema del complemento e si potenzia la fagocitosi. L'obiettivo della terapia sostitutiva è di mantenere nel paziente ipo-agammaglobulinemico comunque livelli sierici di IgG non inferiori a un determinato cut-off, fissato precedentemente a 500 e attualmente a 700 mg/dL, in base alle evidenze scientifiche di efficacia. Studi recenti dimostrano infatti che IgG sieriche pre-infusionali maggiori/uguali a 700 mg/dL garantiscono una concentrazione ampiamente protettiva di anticorpi specifici anti-Pneumococco e anti-Haemophilus e si accompagnano a una migliore prognosi, documentata dall'assenza di ospedalizzazione per complicanze polmonari ¹⁰. La dose standard raccomandata è pari a 400 mg/Kg con intervallo tra le infusioni di 21-28 giorni ¹¹. Le indicazioni all'utilizzo di IVIG come terapia sostitutiva sono elencate in Tabella II. Tra quelle citate, l'Ipogammaglobulinemia Transitoria dell'Infanzia (THI: Transient Hypogammaglobulinemia of Infancy) non è, ad oggi, elettivamente inclusa tra le indicazioni all'utilizzo di IVIG sancite dalle Linee Guida ¹². Tuttavia, in una coorte di pazienti affetti da THI gravemente sintomatici, è stato dimostrato che un numero limitato di infusioni di

IVIG riduce significativamente (circa 10 volte) l'incidenza di infezioni, con conseguente prevenzione di possibili complicanze e quindi, un documentato beneficio a breve e a lungo termine ¹³. Nel valutare l'appropriatezza dell'impiego delle IVIG è necessario effettuare sempre un bilancio rischio-beneficio nell'ambito di ciascuna malattia, considerando che i preparati di IVIG si confermano a tutt'oggi sicuri ed efficaci ².

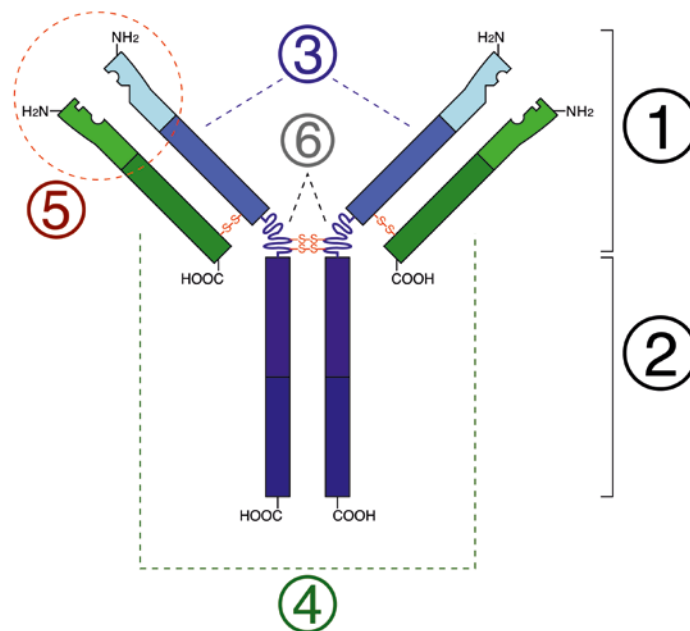
Bibliografia

- 1 Imbach P, Barandun S, d'Apuzzo V, et al. *High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood*. Lancet 1981;1:1228-31.
- 2 Orange JS, Hossny EM, Weiler CR, et al. *Use of intravenous immunoglobulin in human disease: a review of evidence by members of the Primary Immunodeficiency Committee of the American Academy of Allergy, Asthma and Immunology*. J Allergy Clin Immunol 2006;117(4 Suppl):S525-53.
- 3 Anthony RM, Wermeling F, Karlsson MC, et al. *Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG*. Proc Natl Acad Sci USA 2008;105:19571-8.
- 4 Anthony RM, Ravetch JV. *A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs*. J Clin Immunol 2010;30(Suppl. 1):S9-14.
- 5 Huang H-S, Sun D-S, Lien T-S, et al. *Dendritic cells modulate platelet activity in IVIg-mediated amelioration of ITP in mice*. Blood 2010;116:5002-9.
- 6 Séité JF, Guerrier T, Cornec D, et al. *TLR9 responses of B cells are repressed by intravenous immunoglobu-*

lin through the recruitment of phosphatase. J Autoimmun 2011;37:190-7.

- 7 Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, et al. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. Nature 2011;475:110-3.
- 8 Araujo LM, Chauvineau A, Zhu R, et al. Cutting edge: intravenous Ig inhibits invariant NKT cell-mediated allergic airway inflammation through FcγRIIIA-dependent mechanisms. J Immunol 2011;186:3289-93.
- 9 Issekutz AC, Rowter D, Macmillan HF. Intravenous immunoglobulin G (IVIg) inhibits IL-1- and TNF-α-dependent, but not chemotactic-factor-stimulated, neutrophil transendothelial migration. Clin Immunol 2011;141:187-96.

- 10 Chua I, Lagos M, Charalambous BM, et al. Pathogen-specific IgG antibody levels in immunodeficient patients receiving immunoglobulin replacement do not provide additional benefit to therapeutic management over total serum IgG. J Allergy Clin Immunol 2011;127:1410-1.
- 11 Toubi E, Etzioni A. Intravenous immunoglobulin in immunodeficiency states: state of the art. Clin Rev Allergy Immunol 2005;29:167-72.
- 12 Sacher R.A. Intravenous immunoglobulin consensus statement. J Allergy Clin Immunol 2001;108:S139-46.
- 13 Duse M, Iacobini M, Leonardi L, et al. Transient hypogammaglobulinemia of infancy: intravenous immunoglobulin as first line therapy. Int J Immunopathol Pharmacol 2009;23:349-53.



Schema dell'unità di base di una immunoglobulina (anticorpo)

1. Porzione Fab
 2. Porzione Fc
 3. Catena pesante (consiste delle regioni VH, CH1, hinge, CH2 and CH3, dove VH sta per catena pesante variabile e CH sta per catena pesante costante)
 4. Catena leggera (consiste delle regioni VL and CL, dove VL sta per catena leggera variabile e CL sta per catena leggera costante)
 5. antigen binding site (sito di legame con l'antigene)
 6. Regioni hinge
- (*) -S-S: ponti disolfuro.

Le IgG sono composte, come tutte le immunoglobuline, di una coppia di catene leggere e una di catene pesanti. Le catene leggere sono uguali in tutte le immunoglobuline e contengono ognuna due domini Ig, uno variabile e uno costante; le catene pesanti sono invece di tipo γ , peculiari di questo tipo di immunoglobuline, e contengono ognuna un dominio Ig variabile (VL o V γ) e tre domini costanti (CH1/2/3 o C γ 1/2/3).

Le catene γ , inoltre, possono essere prodotte in quattro sottotipi diversi: γ 1, γ 2, γ 3 e γ 4. Perciò, le immunoglobuline G si distinguono in altrettante sottofamiglie, IgG1, IgG2, IgG3 ed IgG4.

(L'immagine è scaricata da Wikimedia Commons e utilizzata con licenza Creative Commons)