



UNIVERSITA' DI PISA

DIPARTIMENTO DI FARMACIA

Corso di Laurea Specialistica in Farmacia

Tesi di Laurea

Interazione tra rituximab e vaccino antinfluenzale in pazienti con artrite reumatoide o linfoma non Hodgkin

Relatore:

Prof. Stefano Fogli

Candidata:

Sara Bianchi

ANNO ACCADEMICO 2015/2016

*Credo che il mio cervello,
sostanzialmente,
sia lo stesso di quando ero ventenne.
Il mio modo di esercitare
il pensiero non è cambiato negli anni.
E non dipende certo da
una mia particolarità,
ma da quell'organo magnifico
che è il cervello.
Se lo coltivi funziona.
Se lo lasci andare e lo metti in pensione si indebolisce.
La sua plasticità è formidabile.
Per questo bisogna continuare a
PENSARE.*

Rita Levi Montalcini

INDICE

Capitolo 1- Gli Anticorpi	5
1.1 Struttura e classificazione degli anticorpi	5
1.2 Legame antigene-anticorpo	9
1.3 Gli anticorpi monoclonali in oncologia e loro meccanismo d'azione	10
1.4 Gli anticorpi monoclonali in reumatologia	14
Capitolo 2- L'artrite reumatoide	15
2.1 Diagnosi dell'artrite reumatoide	16
2.2 Terapia con l'anticorpo monoclonale rituximab	18
Capitolo 3- I vaccini	24
3.1 La vaccinazione antinfluenzale	24
Capitolo 4- Interazione tra rituximab e vaccinazione antinfluenzale in pazienti con artrite reumatoide	27
4.1 Risposta immunitaria cellulare ed umorale	33
Capitolo 5- Vaccinazione anti H1N1 in pazienti con artrite Reumatoide	37
Capitolo 6- Raccomandazioni in reumatologia	43
6.1 Principali vaccinazioni e considerazioni specifiche	43
Capitolo 7- La vaccinazione antinfluenzale nei pazienti oncologici sottoposti a terapia sistemica	48

7.1 Virulenza dell'influenza	49
7.2 Il cancro e l'immunizzazione	50
Capitolo 8- Il linfoma non-Hodgkin	53
Capitolo 9- Utilizzo del rituximab nel linfoma non-Hodgkin	57
Capitolo 10- Efficacia della vaccinazione anti H1N1 in pazienti in cura con rituximab affetti da linfoma non Hodgkin	60
10.1 Vaccinazione contro il virus H1N1 in pazienti con completa remissione dal linfoma non Hodgkin precedentemente trattati con rituximab	64
Capitolo 11: Conclusioni	68
BIBLIOGRAFIA	70

CAPITOLO 1: Gli anticorpi

Il sistema immunitario è finalizzato a proteggere l'ospite dall'invasione di microrganismi patogeni e ad eliminare le malattie. Nelle condizioni di funzionamento ottimale, è in grado di rispondere esclusivamente ai patogeni, mantenendo la capacità di riconoscere antigeni "self" verso i quali è tollerante. La protezione dalle infezioni è fornita dal sistema immunitario innato e dal sistema immunitario adattabile. (Goldsby RA, 2003)

Il sistema immunitario innato è la prima linea di difesa contro gli antigeni ed include sia componenti fisiche, come la cute, che biochimiche come i lisozimi ed i linfociti.

Quando la risposta innata risulta inadeguata a fronteggiare l'infezione, il sistema immunitario adattabile viene mobilitato da segnali mediati dalla risposta innata. Tale sistema ha numerose caratteristiche che includono:

- la capacità di rispondere ad una varietà di antigeni, a ciascuno in maniera specifica;
- discriminare tra antigeni estranei "nonself" e antigeni dell'ospite "self";
- Rispondere ad antigeni precedentemente incontrati in modo da innescare una vigorosa risposta della memoria.

Questa risposta adattabile culmina nella produzione degli anticorpi, che sono gli effettori dell'immunità umorale e nell'attivazione dei linfociti che sono, invece, gli effettori dell'immunità cellulo-mediata (Katzung et al., Piccin editore, 2014).

1.1 Struttura e classificazione degli anticorpi

Gli anticorpi degli esseri umani sono delle glicoproteine costituite da quattro catene polipeptidiche, in particolar modo due pesanti identiche, denominate Fc, ognuna del peso di circa 55 kDa, e due leggere identiche, chiamate Fab, ognuna del peso di circa 24 kDa (Edelman, 1973; Edelman et al., 1969).

Nell'uomo gli anticorpi si possono raggruppare in cinque classi, caratterizzati da diverse sequenze nelle catene pesanti e dotati di differente funzione nella risposta immunitaria (Edelman et al., 1968). Sia nelle catene pesanti sia in quelle leggere le estremità carbossiliche presentano sequenze di aminoacidi più o meno uguali in tutti gli anticorpi, indipendentemente dall'antigene che sono in grado di legare (parte costante o C), mentre le estremità amminiche presentano sequenze molto variabili, in relazione alla specificità per i diversi antigeni (parte variabile o V). Le coppie di catene sono unite tra loro da ponti disolfuro, che si formano tra gli atomi di zolfo dell'aminoacido cisteina presente nelle catene adiacenti in punti corrispondenti.

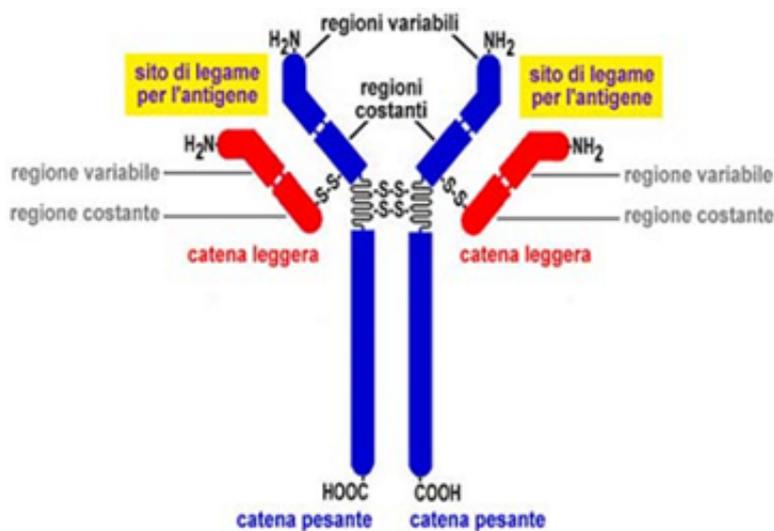


Figura 1: Struttura molecolare di una immunoglobulina.

Gli anticorpi sono altamente specifici, cioè legano il proprio antigene e solo quello, con grandissima specificità attraverso i siti di legame per l'antigene situati nella regione variabile delle catene pesanti e leggere. Le regioni variabili sono diverse per ogni tipo di molecola di anticorpo. Ogni animale può produrre milioni di molecole differenti di anticorpi, ciascuna caratterizzata da un distinto sito di legame per l'antigene (Edelman, 1973; Edelman et al., 1968; Edelman et al., 1969).

Ogni anticorpo riconosce e si lega ad una porzione limitata e specifica dell'antigene, definita determinante antigenico o epitopo che è la porzione di un antigene, come il frammento di una proteina o di un involucro virale. Un singolo antigene presenta generalmente più epitopi diversi, ciascuno riconosciuto da uno specifico anticorpo. I mammiferi producono 5 classi di Ig: IgG, IgM, IgD, IgA, IgE, ciascuna delle quali media una risposta biologica specifica dopo l'attacco all'antigene.

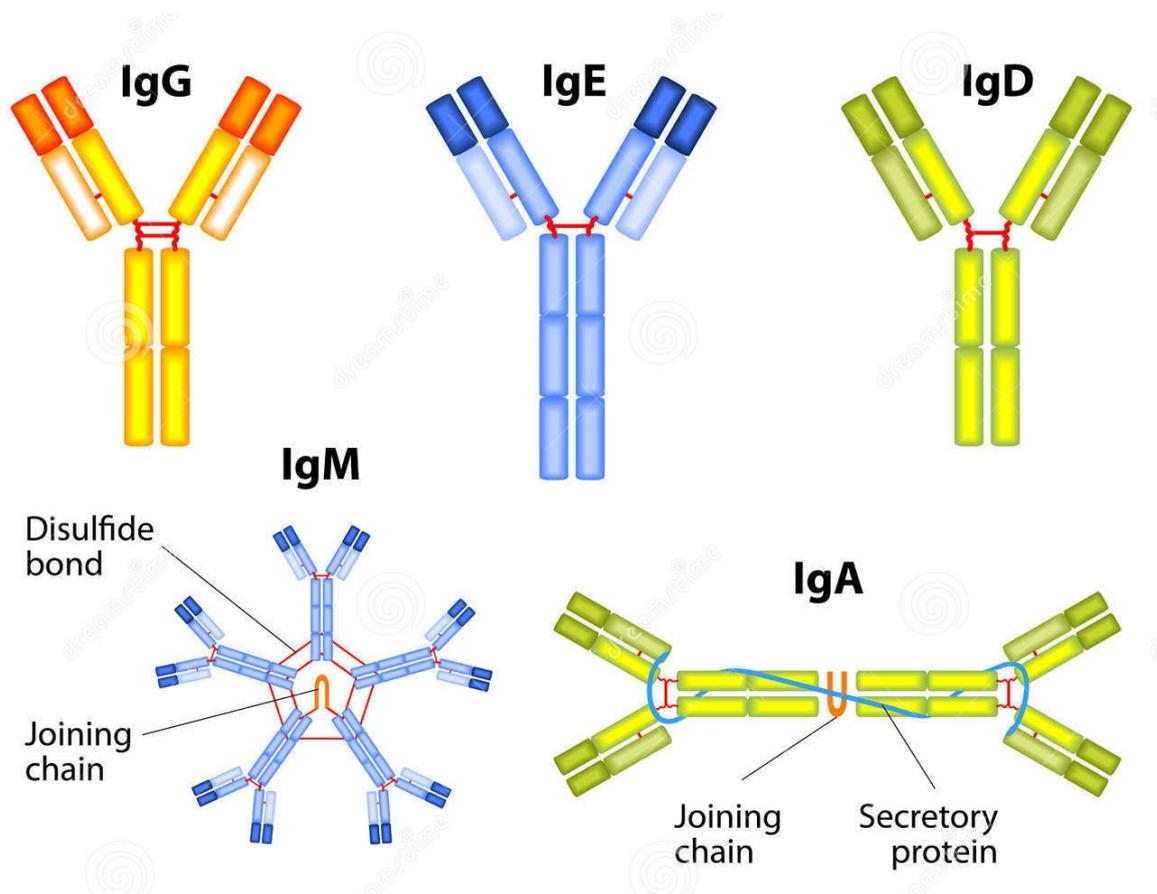


Figura 2: Classificazione delle immunoglobuline

Le IgG sono le immunoglobuline più abbondanti nel sangue di individui sani, circa 10 mg/cm³, e sono responsabili della maggior parte delle reazioni anticorpali, infatti solitamente contribuiscono direttamente alla risposta immunitaria neutralizzando tossine e virus (Bach et al., 1981). In base alle

loro caratteristiche, possono essere individuate 4 sottoclassi di IgG, denominate IgG1,IgG2,IgG3,IgG4 e la numerazione è stata fatta sulla base della loro presenza nel siero (Abbas et al., 2006; Bach et al., 1981). Sono in grado di attraversare la barriera placentare e giungono per questa via dalla madre al feto.

Le IgA sono presenti soprattutto nelle secrezioni, come la saliva, il latte e le lacrime, e in concentrazioni più basse delle IgG nel sangue (Berger et al., 1967). Nelle secrezioni i due monomeri immunoglobulinici sono legati tra di loro per mezzo di una catena detta “catena J” e di un altro polipeptide (detto componente di secrezione). Queste non attraversano la placenta, ma sono presenti nel latte prodotto subito dopo il parto, il colostro, fornendo in tal modo al neonato una protezione contro i microbi presenti nell'ambiente (Koshland, 1985).

Le IgD a livello sierico non sono molto concentrate, si trovano soprattutto sulla membrana cellulare dei linfociti B, nella misura di 0,01-0,14 mg/cm³. Le loro funzioni sono ancora ignote, sembra che siano in grado di legare delle proteine batteriche indipendentemente dalla loro regione variabile (Riesbeck and Nordstrom, 2006).

Le IgE sono presenti in concentrazioni molto basse nel sangue di individui normali, mentre aumentano molto nelle persone predisposte alle allergie. E' stato dimostrato che il loro legame con cellule particolari, i mastociti, causa, in presenza di antigeni specifici, la reazione allergica, inducendo il rilascio da parte delle cellule di mediatori chimici come l'istamina. Non sono in grado di attraversare la placenta (Gould et al., 2003).

Le IgM, infine, sono i primi anticorpi espressi durante lo sviluppo delle cellule B (Zhang et al., 2004). Le cellule B immature esprimono sulla loro superficie delle IgM monomeriche che partecipano alla segnalazione cellulare

(Schamel and Reth, 2000). Si tratta di immunoglobuline di grandi dimensioni, costituite da 5 monomeri di quattro catene peptidiche, ciascuna molecola possiede pertanto 10 siti combinatori per gli antigeni. Anche le IgM non sono in grado di attraversare la placenta (Abbas et al., 2006; Bach et al., 1981).

1.2 Legame antigene-anticorpo

Un antigene viene definito come qualsiasi sostanza che possa essere specificamente legata da un anticorpo. Quasi ogni tipo di molecola biologica, compresi gli zuccheri, i lipidi, gli ormoni, così come macromolecole quali i carboidrati complessi, i fosfolipidi, gli acidi nucleici e le proteine, può fungere da antigene (Abbas, Piccin editore, 2002).

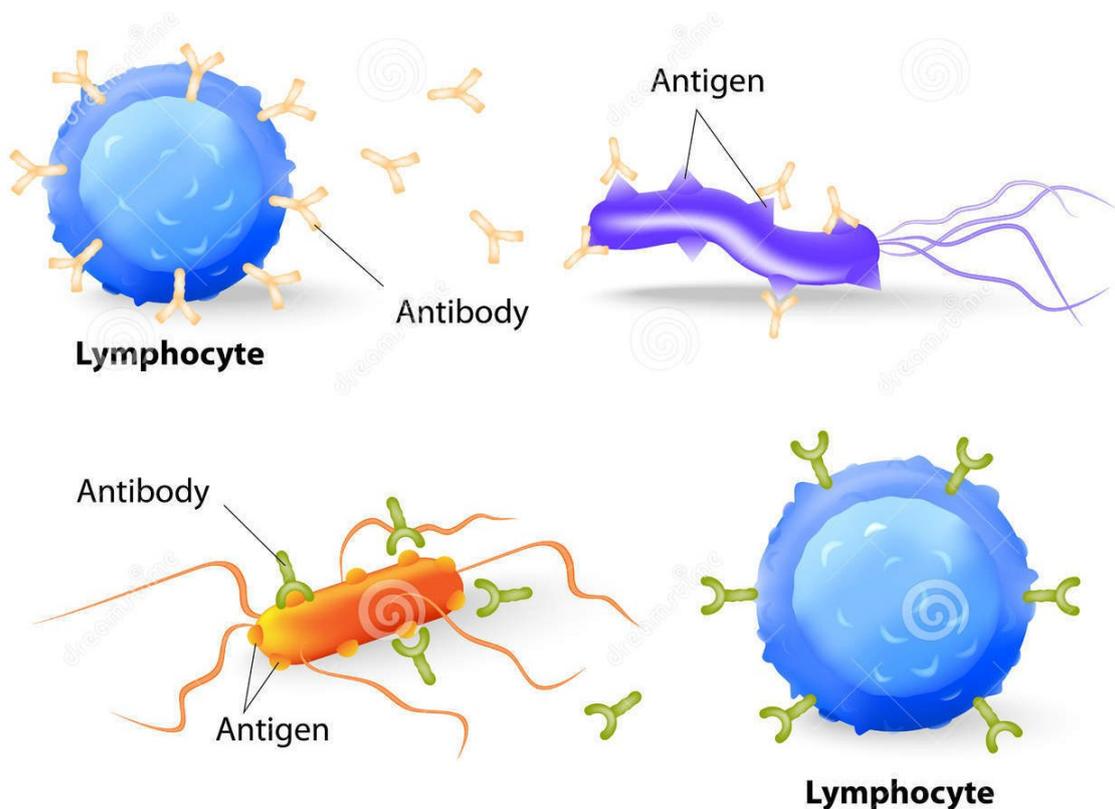


Figura 3: Linfocita, anticorpo ed antigene.

Per comprendere l'interazione tra molecola di antigene e anticorpo è

necessario analizzare la struttura dell'immunoglobulina, identificando la sua collocazione nello spazio quale risultante dell'organizzazione primaria (sequenza aminoacidica), secondaria (riavvolgimento delle catene polipeptidiche), terziaria (costituzione dei domini globulari compatti) e quaternaria (interazione fra i domini globulari appartenenti a catene pesanti e leggere). Il riconoscimento di un antigene da parte di un anticorpo presuppone un legame reversibile e non covalente. I legami chimici implicati nella reazione antigene-anticorpo sono del seguente tipo (possono realizzarsi sia singolarmente che simultaneamente):

- ❖ Legame ionico: dovuto alle forze di interazione elettrostatica. Ne è un esempio il legame del gruppo carbossilico deprotonato $-\text{COO}^-$ col gruppo amminico protonato $-\text{NH}_3^+$.
- ❖ Forze di Van Der Waals: legate alle interazioni dipolari e molto meno intense rispetto al legame ionico.
- ❖ Ponti a idrogeno: sono dovuti all'interazione esercitata da un atomo di idrogeno su atomi di elementi che assumono carica parziale negativa. La forza di questo legame è inferiore rispetto al legame ionico ma nettamente maggiore rispetto alle forze di Van der Waals (Spandrio L. 1978).

1.3 Gli anticorpi monoclonali in oncologia e loro meccanismo d'azione

Lo sviluppo della tecnologia degli "ibridomi" ad opera di Milsten e Kohler nel 1975 ha rivoluzionato il settore degli anticorpi ed ha aumentato marcatamente la purezza e specificità di anticorpi usati in clinica. Più recentemente, tecniche di biologia molecolare sono state usate allo scopo di sviluppare anticorpi monoclonali specifici, per una singola molecola. Librerie combinatoriali di cDNA codificanti per le catene pesanti e leggere delle

immunoglobuline espresse sulla superficie di batteriofagi vengono provate contro antigeni purificati. Il risultato è un frammento anticorpale con specificità ed alta affinità per l'antigene.

I recenti progressi nella capacità di manipolazione dei geni codificanti per immunoglobuline sono sfociati nello sviluppo di una ampia serie di anticorpi monoclonali umanizzati e chimerici, diretti verso bersagli terapeutici.

Vengono prodotti da ibridi cellulari, detti ibridomi, costituiti da Linfociti B murini specifici per un determinato antigene (Ag), fusi con cellule mielomatose non anticorpo secernenti. Tali ibridomi risultano avere sia le caratteristiche di immortalità, proprietà conferita dalle cellule mielomatose, sia la capacità di secernere anticorpi, propria dei linfociti B.

Per produrre un anticorpo monoclonale specifico per un certo antigene è necessario immunizzare un topo con tale antigene e successivamente isolare i linfociti B dalla milza o dai linfonodi dell'animale. Si procede poi alla fusione dei linfociti B con la linea immortalizzata adatta (Abbas, Piccin editore, 2002).

Ultimamente è stata sempre più evidente l'utilità clinica degli anticorpi monoclonali nella terapia del cancro, proprio grazie al loro particolare meccanismo d'azione. Sono infatti progettati per sfruttare particolari debolezze delle cellule tumorali: imitano gli anticorpi che l'organismo produce naturalmente come parte della risposta immunitaria ai germi, ai vaccini e ad altre sostanze o corpi estranei.

Quando l'anticorpo monoclonale si attacca a una cellula tumorale può:

- **Rendere la cellula tumorale più visibile al sistema immunitario.** Il sistema immunitario attacca i corpi estranei che entrano nell'organismo, ma di solito non riconosce le cellule tumorali come

“nemiche”. L’anticorpo monoclonale può essere progettato per attaccarsi a determinate parti delle cellule tumorali. In questo modo l’anticorpo contrassegna le cellule tumorali e le rende più visibili al sistema immunitario. Ad esempio l’anticorpo monoclonale rituximab (Mabthera®) si attacca a una proteina specifica (CD20) presente solo sui linfociti B, un tipo di globuli bianchi. Quando il rituximab si attacca a questa proteina sui linfociti B, li rende più visibili al sistema immunitario che quindi li attacca. Il rituximab fa diminuire il numero di linfociti B, compresi quelli sani, ma l’organismo ne produce di nuovi per sostituirli. In questo modo diminuisce la probabilità di avere dei linfociti B malati.

- **Bloccare i fattori di crescita.** I fattori di crescita sono sostanze chimiche che si attaccano ai recettori delle cellule normali e di quelle tumorali, segnalando alla cellula di crescere. Alcune cellule tumorali hanno molte copie dei recettori del fattore di crescita, e quindi crescono più velocemente delle cellule sane. Gli anticorpi monoclonali sono in grado di bloccare i recettori e impedire ai segnali di crescita di raggiungere la cellula. Il cetuximab (Erbix®), un anticorpo monoclonale approvato per la terapia del tumore del colon e dei tumori della testa e del collo, si attacca ai recettori sulle cellule tumorali che accettano un certo segnale di crescita (il fattore di crescita dell’epidermide, o EGF). Le cellule tumorali e alcune cellule sane si basano su questo segnale per iniziare a dividersi e moltiplicarsi. Impedendo al segnale di raggiungere il bersaglio sulle cellule tumorali si rallenta o si interrompe la crescita del tumore.
- **Impedire la formazione di nuovi vasi sanguigni.** Le cellule tumorali proliferano anche grazie ai vasi sanguigni che le forniscono dell’ossigeno e delle sostanze nutritive necessarie per la loro crescita. Per attrarre i vasi sanguigni, le cellule tumorali emettono dei segnali di

crescita. Gli anticorpi monoclonali che bloccano questi segnali di crescita possono impedire al tumore di essere rifornito dai vasi sanguigni, e quindi di crescere. Se invece il tumore è già inserito in una rete di vasi sanguigni e si bloccano i segnali di crescita, i vasi sanguigni possono morire e il tumore può ridurre le sue dimensioni. Il bevacizumab (Avastin®) è un anticorpo monoclonale approvato per la terapia di diversi tipi di tumore, inibisce un segnale di crescita detto fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) inviato dalle cellule tumorali per produrre nuovi vasi sanguigni. Il bevacizumab intercetta i segnali VEGF del tumore e impedisce loro di raggiungere l'obiettivo.

- **Somministrare radiazioni alle cellule tumorali** (radioimmunoterapia). Combinando una particella radioattiva con un anticorpo monoclonale i medici riescono a somministrare le radiazioni direttamente alle cellule malate. In questo modo la maggior parte delle cellule sane circostanti rimane intatta. Gli anticorpi monoclonali con particelle radioattive permettono di somministrare una quantità minima di radiazioni per un periodo di tempo maggiore rispetto alle terapie tradizionali: i ricercatori ritengono che questa terapia sia efficace come la radioterapia convenzionale ad alti dosaggi. L'anticorpo monoclonale si attacca ai recettori delle cellule tumorali presenti nel sangue e le irradia (www.cancer.org).

Gli anticorpi monoclonali vengono somministrati tramite flebo. La frequenza della terapia dipende dal tipo di tumore e dal tipo di terapia. Alcuni anticorpi monoclonali possono essere usati in combinazione con altri tipi di terapie, come la chemioterapia e la terapia ormonale. Altri invece vengono somministrati da soli.

Gli anticorpi monoclonali in passato venivano usati solo per curare i tumori in stadio avanzato che non rispondevano alla chemioterapia oppure le recidive.

Ora che ne è stata dimostrata l'efficacia, però, alcune terapie con anticorpi monoclonali vengono usate già in fasi meno avanzate della malattia. Ad esempio il rituximab può essere usato come terapia di prima scelta in alcuni tipi di linfoma non Hodgkin (www.cancer.org).

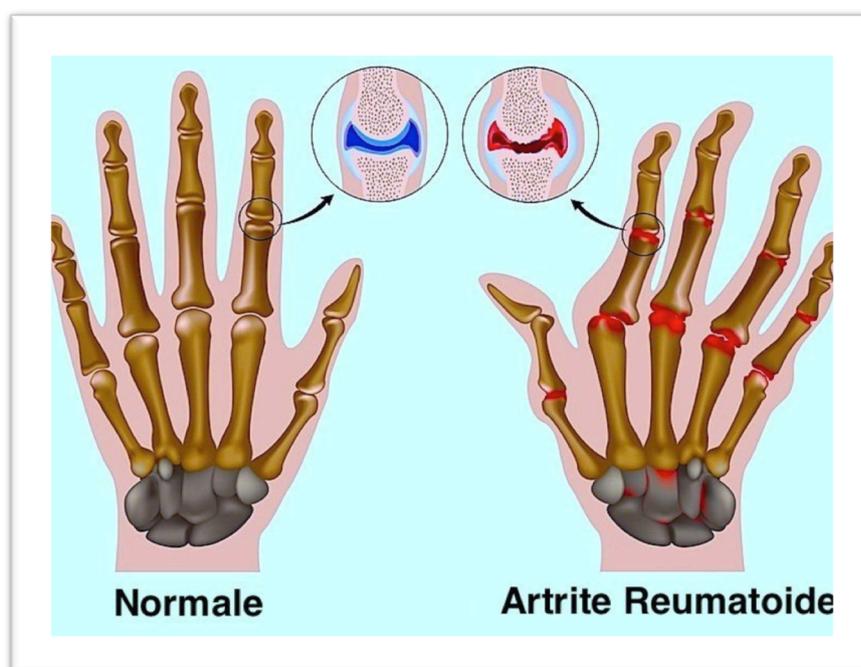
1.4 Gli anticorpi monoclonali in reumatologia

Le malattie reumatiche sono condizioni infiammatorie sistemiche di eziologia sconosciuta per le quali non esistono terapie curative completamente risolutive (Burgio GR. et al., 1997). Negli ultimi anni, grazie alla ricerca biologica e ai suoi progressi, sono state sintetizzate nuove molecole capaci di neutralizzare in maniera selettiva e mirata i principali mediatori del processo infiammatorio. La disponibilità di questi farmaci, conosciuti come anticorpi monoclonali, ha aperto una nuova era nel trattamento delle malattie artritiche, tra cui l'artrite reumatoide, infatti fino a pochi anni fa il trattamento di queste condizioni era basato sull'impiego di farmaci ad azione non specifica.

Gli studi condotti fino ad oggi hanno dimostrato che questi preparati biologici hanno una potenza terapeutica superiore rispetto ai classici farmaci antireumatici ed un profilo di tollerabilità globalmente soddisfacente. E' importante sottolineare che non rappresentano un'alternativa ai classici farmaci sino ad ora utilizzati ma sono da prendere in considerazione nei pazienti affetti dalle forme più severe e refrattarie, con il rischio di sviluppare danni irreversibili agli organi colpiti. Il rapporto costi-benefici è una delle prime valutazioni da fare (Lattanzi B. et Ravelli A. 2010).

CAPITOLO 2: L'artrite reumatoide

L'artrite reumatoide (AR) è una malattia infiammatoria cronica autoimmune ad eziologia sconosciuta che colpisce principalmente le articolazioni diartrodiali, dotate cioè di sinovia e cartilagine articolare. L'artrite è caratterizzata da dolore, tumefazione e distruzione articolare, disabilità funzionale, coinvolgimento sistemico e compromissione della durata e della qualità della vita (Drossaers-Bakker, 1999). (Figura 4: Erosione delle articolazioni della mano).



E' una patologia di tipo autoimmune in quanto è presente un'attivazione anomala del sistema immunitario che è responsabile delle lesioni ai tessuti e della cronicizzazione della malattia. Le manifestazioni cliniche iniziali sono prevalentemente a carico delle articolazioni, in particolare quelle delle mani, dei piedi e dei polsi, sono caratterizzate dalla presenza di dolore, gonfiore, rossore, calore e limitazione di movimento e si distribuiscono in modo bilaterale e simmetrico. Il processo infiammatorio ha carattere erosivo e può

portare ad una completa distruzione delle strutture articolari fino alla deformità e all'anchilosi (Linee guida per la diagnosi e terapia AR, 2014).

L'incidenza dell'artrite reumatoide nella popolazione mondiale, secondo i dati dell'OMS, è 0,3-1%. Limitatamente all'area europea, l'AR sembra essere più frequente nelle popolazioni del nord Europa. Alcuni studi documentano negli ultimi decenni una progressiva diminuzione in nazioni quali Regno Unito e Stati Uniti. Per quanto riguarda il bacino del Mediterraneo, la malattia sembra essere meno grave, con manifestazioni extra articolari meno frequenti. In Italia vi sono solo due studi statistici che riportano nell'ultimo decennio percentuali che variano dallo 0,3% (Cimmino) allo 0,73% (ISTAT). Il numero di pazienti con AR in Italia è compreso, quindi, nell'ampio range che va da 140.000 a 410.000. Questo porta ad una stima di 2-3 pazienti affetti da AR ogni 1.000 assistiti. Con tale frequenza l'AR viene a rappresentare in Italia un importante problema di salute pubblica legato anche agli ingenti costi del trattamento e al fatto che in genere colpisce soggetti in età lavorativa tra i 30 e i 60 anni. Su tre soggetti affetti dalla malattia due sono di genere femminile. Il danno articolare si manifesta radiologicamente nel 70% dei casi nei primi 2 anni, ma con metodiche più sensibili come la risonanza magnetica già dopo 6 mesi sono evidenti alterazioni erosive nel 50% dei casi. La diagnosi è prevalentemente clinica.

2.1 Diagnosi dell' artrite reumatoide

Come la maggior parte delle malattie autoimmuni, non c'è la possibilità di individuare un unico sintomo o segno che sia in grado di diagnosticare con certezza l'artrite reumatoide.

La caratteristica più comune che risalta agli occhi è la tumefazione delle articolazioni metacarpofalangee di entrambe le mani e delle ginocchia, accompagnata dal dolore e rigidità mattutina superiore ad un'ora. Possono

evidenziarsi anche noduli reumatoidi nel sottocutaneo a livello dei gomiti o nei punti sottoposti a pressione, come tendine di achille, tendine delle mani o la nuca. Le articolazioni colpite dalla malattia sono calde e arrossate, la cute intorno si presenta arrossata e sottile (www.reumatologia.org).

La deviazione esterna dell'ulna con sublussazione dell'articolazione radio-ulnare è la deformità più frequente.



Figura 5: Deviazione ulnare.

Questa malformazione avviene insieme alla rotazione del carpo (polso) e lo spostamento dell'osso semiulnare che invece di rimanere a contatto con il radio, si trova davanti allo spazio vuoto tra le due ossa dell'avambraccio. Ne consegue anche la deviazione del pollice, come si può vedere dalla figura sottostante.

Questo nuovo allineamento delle ossa è detto deformità a zig-zag (www.reumatologia.org).



Figura 6: Deviazione del pollice.

2.2 Terapia con l'anticorpo monoclonale rituximab

La terapia dell'artrite reumatoide è migliorata enormemente negli ultimi 25 anni offrendo ai pazienti un soddisfacente controllo dei sintomi e la possibilità di conservare i normali ritmi della routine quotidiana (attività lavorativa, faccende domestiche, hobbies, etc...).

Dal momento che non esiste una cura definitiva, obiettivo dei trattamenti è quello di ridurre i sintomi del paziente e migliorare la disabilità attraverso una terapia medica appropriata e iniziata il più rapidamente possibile, prima che le articolazioni interessate dall'infiammazione vengano danneggiate in modo permanente.

Non esiste un singolo farmaco efficace per tutti i pazienti e spesso molti di essi devono ricorrere a diverse modifiche terapeutiche nel corso della loro malattia. Il trattamento ideale richiede una diagnosi precoce, quando la malattia è in fase iniziale (< 6 settimane o 6 mesi), ed un trattamento aggressivo. Per ridurre rapidamente l'infiammazione articolare e l'intensità dei sintomi la terapia di prima linea si avvale dei farmaci antinfiammatori non steroidei (cosiddetti FANS), come ibuprofene, naprossene, diclofenac, ketoprofene e i più recenti COX2-inibitori (celecoxib, etoricoxib). Inoltre, i corticosteroidi come il prednisone possono essere somministrati per bocca o per via intrarticolare.

Tuttavia, i pazienti con tumefazione articolare persistente non rispondono alla sola terapia con FANS e corticosteroidi, per cui solitamente iniziano il trattamento con i farmaci anti-reumatici modificanti il decorso della malattia (i cosiddetti DMARD, come metotrexate, ciclosporina, sulfasalazina..). Questi farmaci migliorano notevolmente i sintomi, la funzionalità articolare e la qualità di vita della maggior parte dei pazienti con artrite reumatoide.

Grazie agli studi sugli anticorpi monoclonali, anche questi farmaci hanno trovato un largo impiego nella terapia dell'artrite reumatoide, soprattutto in coloro che hanno mostrato un'inadeguata risposta o un'intolleranza ad altri farmaci antireumatici, come i DMARD.

Uno tra i più utilizzati per questa patologia è il rituximab, che ha mostrato di ridurre la percentuale di progressione del danno articolare e di migliorare le

funzioni fisiche se somministrato insieme a metotrexate (www.ema.europa.eu).

E' un anticorpo monoclonale chimerico murino/umano, ottenuto con tecniche di ingegneria genetica e costituito da una immunoglobulina glicosilata con le regioni costanti di origine umana e con le sequenze della regione variabile della catena leggera e della catena pesante di origine murina.



Figura 7: anticorpo monoclonale rituximab.

L'anticorpo viene prodotto utilizzando una coltura di cellule di mammifero in sospensione (ovariche di Hamster Cinese) e purificato con cromatografia affine e scambio ionico, incluse procedure specifiche di inattivazione e rimozione virale (www.ema.europa.eu).

Come si può vedere dalla figura sottostante, la componente murina è

evidenziata in rosso, mentre la componente umana in blu.

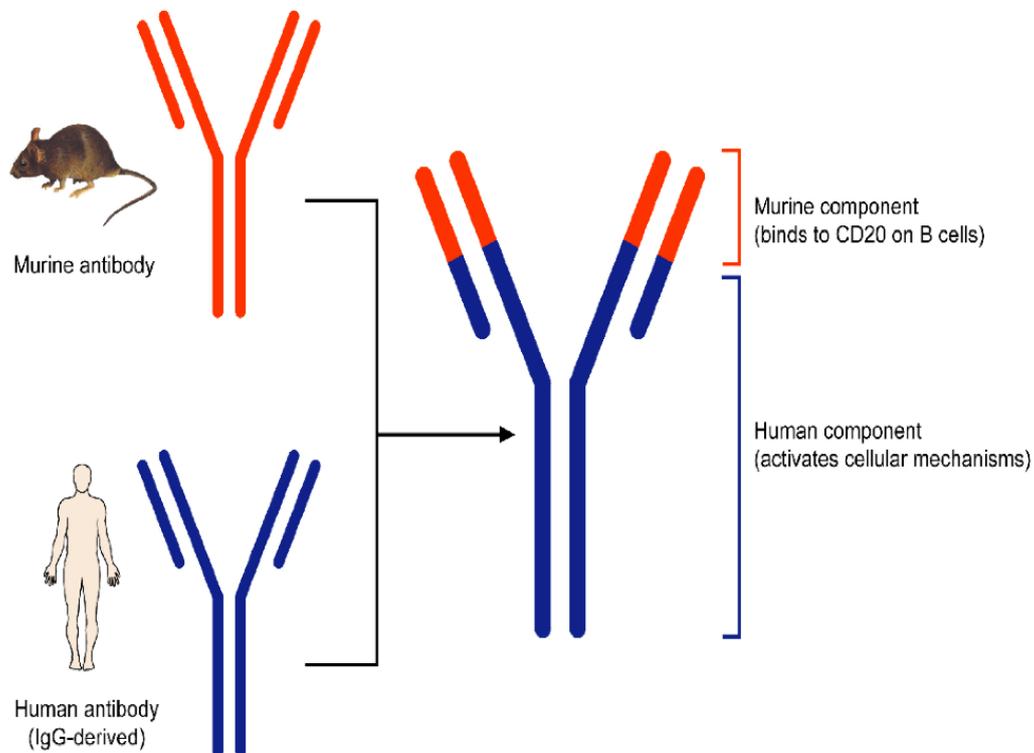


Figura 8: struttura del rituximab

La regione di derivazione murina si lega all'antigene CD20 presente sulla superficie delle cellule B, mentre la regione di derivazione umana attiva i meccanismi cellulari che avviano la deplezione dei linfociti B.

Questo meccanismo di deplezione, si verifica per via di tre meccanismi:

-citotossicità cellulo-mediata: il rituximab lega le cellule effettrici come macrofagi, cellule natural killer le quali rilasciano granuli contenenti altri mediatori il cui risultato finale è a lisi delle B cellule;

-citotossicità complemento mediata: interagisce con la C1q, una proteina del sistema del complemento, attivandolo. Il risultato è la lisi delle B cellule per formazione di pori sulla membrana;

-apoptosi: quando il rituximab si lega alla CD20, invia un segnale che trasmesso alla cellula B, ne induce morte per apoptosi (Varaldo R. et Gobbi M, 2003).

Tutti e tre i meccanismi sono riassunti in questa immagine:

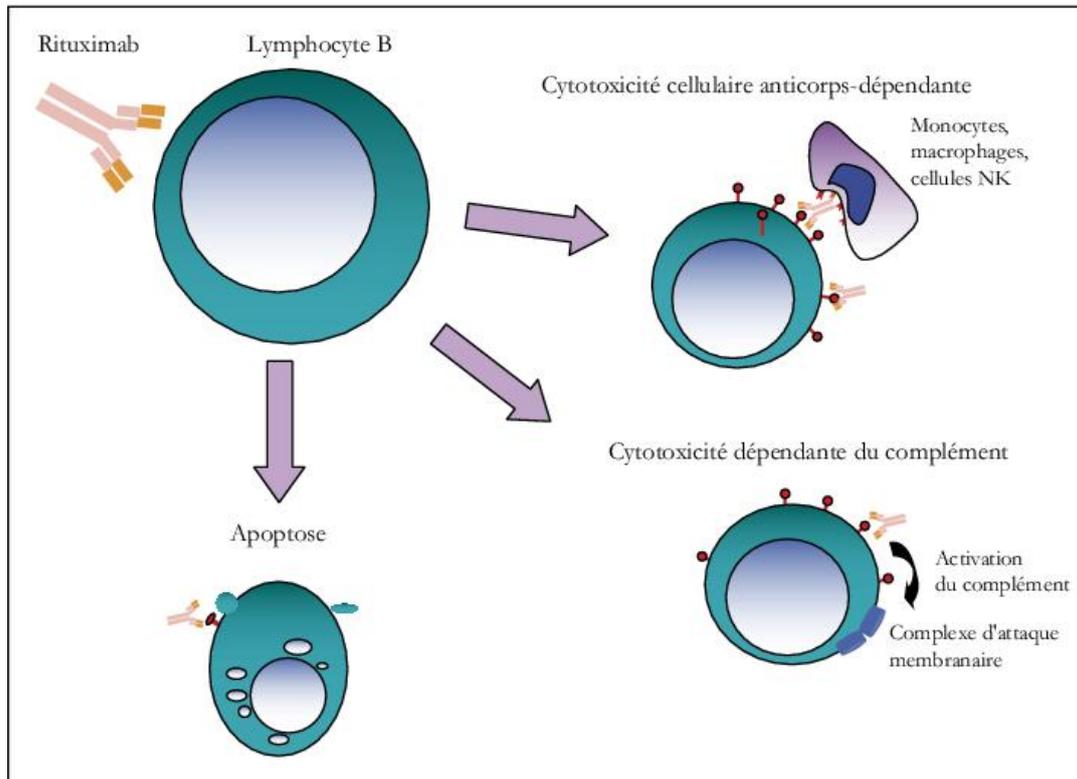


Figura 9: Meccanismi d'azione del rituximab

Al momento non è ancora stato evidenziato quale sia, in vivo, il meccanismo dominante; così come non si hanno ancora dati precisi sui meccanismi di resistenza all'azione dell'anticorpo monoclonale. Alcuni recenti studi hanno sottolineato l'importanza dei livelli di espressione del CD20, mentre altri hanno messo in luce il ruolo dei polimorfismi nei recettori Fc, quale possibile causa della variabilità della risposta ADCC in differenti pazienti. Infine alcuni esperimenti condotti su linee di LNH follicolare, hanno evidenziato il possibile ruolo di inibitori del complemento quali il CD55 ed il CD59,

espressi sulla superficie cellulare, nell'eventuale blocco della CDC (tossicità mediata dall'attivazione del complemento (Maloney DG. et al., 2002).

Inizialmente il rituximab è stato utilizzato in monoterapia nei linfomi non Hodgkin indolenti, con ricadute o refrattari con una buona riuscita, dal momento che le percentuali di risposta oscillavano dal 40% al 60% (Maloney DG. et al.,1997).

Tuttavia, la maggior parte dei pazienti ricade nella malattia, per cui nel tentativo di migliorare i dati già ottenuti, il rituximab è stato impiegato anche in associazione alla chemioterapia convenzionale.

Il primo di studio di associazione chemioterapia-rituximab risale al 1999 (Czuczman MS. et al., 1999); da quel momento in poi si sono susseguiti numerosi studi ed al momento le conclusioni possibili da trarre sono due:

- Il farmaco non aggiunge tossicità alla chemioterapia convenzionale;
- Le percentuali e la durata delle risposte sembrano maggiori di quelle garantite dall'utilizzo della chemioterapia da sola (Garcia-Conde J. et al., 2000).

Alle dosi terapeutiche, il farmaco causa una deplezione di linfociti B che porta a grave leucopenia nella maggior parte dei pazienti. Si risolve solitamente, entro 9-12 mesi dalla sospensione del trattamento, quando si ha un pieno recupero delle cellule linfocitarie. La farmacocinetica del rituximab è caratterizzata dall'accumulo di farmaco in seguito a somministrazioni ripetute, ovviamente è da valutare nel singolo caso ogni volta, poiché entra in gioco la variabilità individuale. Le concentrazioni ematiche di farmaco rimangono a livelli terapeutici fino per circa 6 mesi (Risto el al., 2006).

CAPITOLO 3: I vaccini

Per vaccino si intende un preparato biologico in grado di migliorare l'immunità nei confronti di una certa malattia. Contiene tipicamente un agente, responsabile della malattia, in forma inattivata o attenuata in grado di stimolare il sistema immunitario a riconoscerlo e a ricordarlo come estraneo e pertanto a distruggerlo. Grazie alla memoria, ogni qualvolta si ripresenti questo stesso agente, il nostro sistema immunitario è in grado di difendersi, in quanto ha già prodotto gli anticorpi contro di esso (WHO, 2005).

I vaccini contengono anche altre sostanze, dette eccipienti, che possono essere ad azione battericida e quindi sono i cosiddetti conservanti, in grado di mantenere asettico il prodotto, oppure possono essere ad azione adiuvante, ovvero che rendono più immediata la risposta immunitaria. Sono ad esempio i sali di mercurio, la formaldeide, l'idrossido ed il fosfato di alluminio, talvolta è presente anche il lattosio, albumina umana, gelatina e molto altro (WHO, 2005).

Sono numerosissime le vaccinazioni che sono state messe a punto nel corso degli anni, nello studio della mia tesi mi sono soffermata su quella antinfluenzale, una vaccinazione di massa a cui ogni anno si sottopongono milioni di individui.

3.1 La vaccinazione antinfluenzale

Il vaccino antinfluenzale, divenuto oramai di largo utilizzo, è uno dei mezzi economicamente più sostenibile di prevenzione all'influenza. E' molto efficace non solo nella prevenzione della malattia stessa, bensì anche nella prevenzione dei decessi in quei soggetti ad alto rischio .

I vaccini antinfluenzali che sono attualmente utilizzati sono di due tipi: vaccino a virus inattivato, dove l'antigene è rappresentato da germi che sono

stati sottoposti a trattamenti chimici o fisici in grado di ucciderli e vaccino a virus attenuato, dove i germi sono stati sottoposti a trattamenti che ne hanno ridotto la capacità patogena conservando però le proprietà vitali.

Il sistema immunitario dell'uomo risponde in due modi differenti alle sostanze estranee: l'immunità cellulare (tipo 1) e l'immunità umorale o anticorpale (tipo2). L'immunità cellulare è mediata dai linfociti T ed è quella in grado di difenderci dalle cellule tumorali, virus, batteri che arrivano all'interno delle nostre cellule.

L'immunità umorale è mediata invece dai linfociti B, i quali reagiscono nei confronti delle sostanze estranee di grandi dimensioni e delle sostanze tossiche, producendo immunoglobuline o anticorpi capaci di legarsi all'antigene. E' proprio la reazione antigene-anticorpo a giocare un ruolo fondamentale nel proteggerci dalle infezioni di microrganismi patogeni (www.who.int).

Gli attuali vaccini per l'influenza stagionale sono progettati per indurre alti livelli di anticorpi protettivi contro l'emoagglutinina (HA), una proteina presente sulla superficie del virus influenzale, che gli permette di penetrare in una cellula umana e avviare l'infezione. Livelli più elevati di anticorpi HA nell'organismo sono stati a lungo associati a una maggiore protezione contro l'influenza. Tuttavia le oscillazioni di efficacia del vaccino negli ultimi dieci anni, hanno sollevato interrogativi riguardo la loro capacità di protezione, quindi è stata valutata l'opportunità di considerare altri fattori, come gli anticorpi per la proteina neuraminidasi (NA) nella progettazione del vaccino antinfluenzale annuale per migliorarne le prestazioni (AIFA, 2016).

Un recentissimo studio, condotto nel mese di maggio 2016 da ricercatori del National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID) e pubblicato sulla rivista open access dell'American Society for Microbiology, ha evidenziato proprio che i migliori indicatori di protezione contro l'infezione influenzale sono gli anticorpi che neutralizzano l'azione della neuraminidasi,

un'altra diversa proteina di superficie del virus influenzale. Questa, che non è attualmente il principale antigene bersaglio nei vaccini influenzali tradizionali, consente ai virus influenzali di nuova formazione di uscire dalla cellula ospite e causare l'ulteriore replicazione virale nel corpo.

I ricercatori hanno sottoposto ad agenti patogeni che causano malattie, un gruppo di sessantacinque volontari di età compresa tra i 18 ed i 50 anni e hanno misurato loro i livelli degli anticorpi anti-HA e anti-NA che avevano nel sangue. Sulla base dei risultati, i volontari sono stati collocati in due gruppi: quelli con alti livelli di anticorpi anti-HA (25 partecipanti) e quelli con bassi livelli di anticorpi anti-HA (40 partecipanti). A ciascuno dei volontari è stata poi somministrata una dose intranasale (1 millilitro) di virus dell'influenza H1N1 2009. Trascorsi 9 giorni di degenza, sono stati dimessi dopo aver completato due giorni di test influenzali negativi. I ricercatori hanno scoperto che i partecipanti con alti livelli di anticorpi NA mostravano un effetto protettivo del vaccino più robusto rispetto a quelli del gruppo con livelli elevati di anticorpi HA. Questo significa che le persone con alti livelli di anticorpi NA hanno manifestato una malattia meno grave, una durata più breve della diffusione virale ed i sintomi meno gravi rispetto a quelli con livelli elevati di HA.

Da questo studio si evince che sarebbe meglio considerare insieme ai livelli di anticorpi HA anche quelli di anticorpi NA, in quanto sono un migliore indicatore dello sviluppo della malattia influenzale (AIFA, 2016).

CAPITOLO 4: Interazione tra rituximab e vaccinazione antinfluenzale in pazienti con artrite reumatoide

L'infezione è una delle principali cause di morbosità e mortalità in pazienti con artrite reumatoide, che sono doppiamente esposti al rischio rispetto ai pazienti sani (Doran MF. et al., 2002). Questo può essere correlato alla malattia stessa, sia per la condizione immunologica fortemente compromessa, sia per altri fattori quali l'immobilità, le lesioni cutanee ed altro (Doran MF. et al., 2002).

Questo aumento del rischio non è solo il risultato della malattia autoimmune, ma è attribuito anche alle terapie immunosoppressive comunemente utilizzate, per cui c'è un grande interesse nel cercare di trovare una soluzione inerente al problema infezioni.

La vaccinazione antinfluenzale è attualmente raccomandata nei pazienti con malattie croniche, inclusa appunto l'artrite reumatoide (Smith NM. et al., 2006). E' stato dimostrato che la vaccinazione contro l'influenza è sicura e determina una soddisfacente risposta umorale, sebbene sia più bassa rispetto ai pazienti sani; non sembra essere influenzata dall'impiego di cortisonici come prednisone, dai farmaci antireumatici che modificano la malattia (DMARD) o dai bloccanti il fattore di necrosi tumorale TNF α (Fomin I. et al., 2006; Chalmers A. et al., 1994). Studi recenti hanno dimostrato che la deplezione dei linfociti B ad opera del rituximab, utilizzato da solo o in combinazione con altri farmaci come metotrexate o ciclofosfamide, ha una buona riuscita nei pazienti con artrite reumatoide il cui trattamento con solo metotrexate non era stato sufficiente.

Nel dipartimento di reumatologia di Tel Aviv è stato condotto uno studio per valutare sia l'effetto del rituximab sull'immunogenicità della vaccinazione

antinfluenzale nei pazienti affetti da artrite reumatoide, sia la sicurezza del trattamento stesso.

Il gruppo di studio comprendeva pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con DMARD con o senza rituximab. Il vaccino inoculato consisteva in un virione inattivato contenente 15 μ g di emoagglutinina di SHAN (B/shanghai/361/02), NC (A/New Caledonian/20/99), H1N1, CAL (A/California/7/04). L'attività della malattia è stata valutata prendendo in considerazione parametri come il gonfiore delle articolazioni, la durata della rigidità mattutina, l'intensità del dolore il giorno della vaccinazione e 4 settimane successive; i livelli di cellule CD19⁺ sono stati saggiati in coloro che si sono sottoposti a trattamento con rituximab.

Il gruppo di lavoro comprendeva 43 pazienti malati di artrite reumatoide e 21 sani, facenti parte del personale ospedaliero, a costituire il gruppo di controllo. Esattamente 14 dei 43 malati, erano stati in cura con il rituximab nei 18 mesi precedenti (7 di loro nei 6 mesi passati) secondo il protocollo standard utilizzato, che prevede due infusioni endovena da 1 g ciascuno con 100mg di metilprednisolone ed anche metotrexate a cadenza settimanale. Le rimanenti 29 persone invece erano state in cura con DMARD escludendo i bloccanti del TNF α . La vaccinazione prevedeva 0,5 mL di vaccino inattivato contenenti 15 μ g di emoagglutinina (HA) somministrato per via intramuscolare. Ovviamente sono state escluse dal test le donne in gravidanza, coloro che avevano avuto una reazione allergica in precedenza alla vaccinazione e gli allergici alle proteine dell'uovo.

La immunogenicità del vaccino è stata saggiata mediante il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione. Il virus dell'influenza presenta sulla superficie cellulare due importanti glicoproteine, HA e la neuroamidasi ed è proprio su queste due glicoproteine che si basa la classificazione antigenica.

Il test di inibizione dell'emoagglutinazione è una prova sierologica utilizzata in campo medico per identificare alcuni virus in grado di provocare il fenomeno dell'agglutinazione del sangue. Questi virus hanno sulla superficie le cosiddette emoagglutinine, recettori in grado di legarsi alla superficie dei globuli rossi provocandone precipitazione. La prova si basa sull'uso di anticorpi in grado di legarsi alle emoagglutinine del virus e impedire al virus di legarsi ai globuli rossi.

Gli eritrociti agglutinati, cioè in assenza di anticorpi, sedimentano sul fondo della provetta in modo irregolare andando ad occupare tutto il pozzetto, mentre gli eritrociti non agglutinati, quindi in presenza di anticorpi, formano sul fondo un dischetto compatto, come si può vedere dalla figura sottostante.

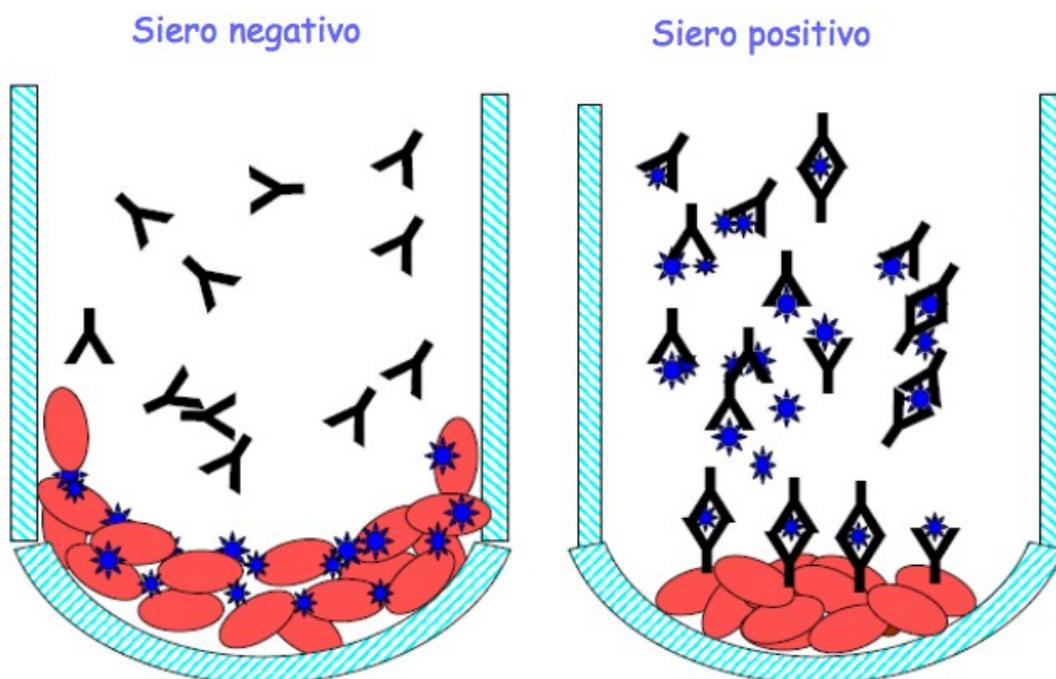


Figura 10: Test dell'emoagglutinazione

I 64 pazienti totali che hanno preso parte al test, sono stati suddivisi in 3 gruppi:

-14 soggetti malati, trattati precedentemente con DMARD e in cura con rituximab;

-29 soggetti malati in cura con DMARD escluso i bloccanti del TNF α ;

-21 soggetti sani a costituire il gruppo di controllo.

Le caratteristiche dei tre gruppi di persone che hanno preso parte allo studio erano piuttosto simili, sia per età che per sesso e la maggior parte dei partecipanti eran donne. Inoltre eran tutti affetti da artrite reumatoide da circa 15 anni e mezzo, il gruppo affetto dalla malattia in cura con rituximab da circa 16 anni e mezzo.

Characteristics	RA (n = 29)	RA + rituximab (n = 14)	Controls (n = 21)	p Value
Age (years), mean (SD)	64 (12)	53 (15)	58 (15)	NS
Sex (F:M), No (%)	22 (76):7 (24)	13 (93):1 (7)	14 (67):7 (33)	NS
RA duration (years), mean (SD)	15.5 (11)	16.5 (10)	–	NS

Tabella 1: Caratteristiche cliniche e demografiche dei pazienti che hanno preso parte al test.

Al momento della vaccinazione tutti i pazienti con artrite reumatoide sono stati in cura con DMARD ed una percentuale significativamente maggiore (il 50%) nel gruppo rituximab, è stato trattato con prednisone. Il 76% dei soggetti del gruppo non rituximab e l'86% del gruppo rituximab sono stati trattati anche con metotrexate in dosi di 12,7 e 14,6 mg a settimana. Al momento di ricevere la vaccinazione, i pazienti in cura con rituximab avevano livelli di cellule B piuttosto bassi.

La vaccinazione antinfluenzale non ha peggiorato gli indici clinici o di laboratorio in modo significativo riguardanti la malattia in entrambi i gruppi di pazienti affetti da artrite reumatoide. Solo qualche soggetto ha riportato

alcuni lievi effetti collaterali dopo la vaccinazione, esattamente 2 del gruppo in cura con rituximab ha manifestato problemi a livello delle vie respiratorie superiori entro le 4 settimane successive alla vaccinazione. Nessuno del gruppo di controllo ha riscontrato problemi di alcun genere.

I livelli di anticorpi HI prima della vaccinazione, che sono il risultato di una precedente infezione o vaccinazione, non differiscono tra i pazienti malati e quelli sani. Quattro settimane dopo la vaccinazione, tutti i partecipanti allo studio, hanno riscontrato un aumento degli anticorpi HI contro ciascuno degli antigeni testati, per cui significa che c'è stata una risposta umorale soddisfacente da parte di tutti. Solo il gruppo rituximab ha mostrato un aumento considerevole degli anticorpi HI contro gli antigeni NC E CAL, ma non per l'antigene SHAN.

Sebbene i pazienti con artrite reumatoide e anche quelli sani abbiano risposto alla maggior parte degli antigeni, il vaccino non sembra avere risultati uniformi in tutti i pazienti. Livelli $<1/40$ di anticorpi HI sono considerati non protettivi, cioè non sufficienti a dare una risposta anticorpale in grado di proteggere dalla malattia. Una risposta umorale si considera soddisfacente quando si ottiene un aumento di circa quattro volte degli anticorpi HI nelle quattro settimane successive alla vaccinazione, nei pazienti con un livello base di anticorpi HI $>1/40$ (CPMC, 2001).

Una volta definito questo margine, la percentuale di coloro che hanno risposto all'antigene CAL è risultata molto più bassa nel gruppo rituximab rispetto al gruppo non rituximab, esattamente il 21% contro il 67% rispettivamente, mentre è risultata simile in tutti e tre i gruppi la risposta agli antigeni SHAN E NC.

I risultati dello studio hanno dimostrato che la vaccinazione contro l'influenza ha generato una risposta umorale per due dei tre antigeni testati (NC E CAL, ma non SHAN) nei pazienti affetti da artrite reumatoide trattati con rituximab.

Prendendo in considerazione anche i dati ottenuti da altri studi sempre inerenti alla risposta umorale nei pazienti con malattie autoimmuni in cura con rituximab, risulta evidente che nonostante la deplezione delle cellule B, i livelli di immunoglobuline rimangono stabili, riflettendo quindi la presenza di plasmacellule longeve (Edwards et al., 2004).

Alla luce dei fatti, sebbene il numero di persone sottoposte al test sia marginale, risulta evidente una diminuita risposta umorale nei soggetti che fanno rituximab, rispetto a quelli che fanno terapie tradizionali con DMARD; questo potrebbe essere attribuito alla diminuzione delle cellule B come conseguenza della terapia con l'anticorpo monoclonale, oppure ad un aumento delle cellule T regolatorie. D'altra parte però, una parte consistente di soggetti ha risposto al vaccino antinfluenzale nonostante questa deplezione di cellule B e questo potrebbe essere spiegato dalla presenza delle plasmacellule che provengono da una zona marginale delle cellule B meno sensibili al trattamento e che continuano a produrre anticorpi per un lungo periodo di tempo (Slifka MK et al., 1998).

Un'altra possibile spiegazione potrebbe essere che la prima differenziazione delle cellule B con un basso livello di espressione del CD20 sopravviva e diventi la fonte di produzione di anticorpi.

Generalmente però, entro circa 6 mesi dalla terapia con rituximab, si assiste ad un pieno recupero del numero di linfociti B poiché l'antigene CD20 non è espresso sulle cellule staminali ematopoietiche e sui progenitori linfocitari B (www.oncofarma.it).

In conclusione, questo studio ha confermato che la vaccinazione contro l'influenza è innanzitutto sicura e che sebbene la risposta umorale nei pazienti in cura con rituximab, sia ridotta ed inferiore rispetto agli altri due gruppi presi in esame, è comunque presente ed apprezzabile.

Rimane quindi consigliata la vaccinazione contro l'influenza stagionale nei pazienti affetti da artrite reumatoide indipendentemente dal tipo di terapia a cui sono sottoposti (Oren S. et al., 2007)

4.1 Risposta immunitaria cellulare e umorale

Nel dipartimento di reumatologia di Tel Aviv, un gruppo di ricercatori ha cercato di valutare entrambe le risposte immunitarie, sia cellulari che umorali, nei pazienti con artrite reumatoide trattati con rituximab paragonandoli a quelli trattati con DMARD (Arad U. et al., 2011). E' noto che la risposta umorale alla vaccinazione antinfluenzale è gravemente compromessa dal trattamento con rituximab, ma sebbene questa sia associata alla protezione dal virus influenzale, è importante tener presente che la risposta immunitaria cellulare svolge anch'essa un ruolo importante nell'infezione. Questo è stato dimostrato in individui anziani che non solo hanno un maggior rischio di morbilità e mortalità rispetto ad un soggetto giovane, ma hanno anche una maggiore difficoltà a rispondere alla vaccinazione antinfluenzale.

Lo studio ha coinvolto 46 pazienti con artrite reumatoide e 16 soggetti sani e di questi 46 malati, 29 hanno ricevuto un trattamento con rituximab mentre 17 erano in cura con DMARD convenzionali, principalmente metotrexate. Tutti i pazienti sono stati esaminati due volte: all'inizio quando sono stati vaccinati, quindi nel mese di ottobre del 2009 e poi 4-6 settimane più tardi (Arad U. et al., 2011).

Dei 29 pazienti in cura con rituximab, 16 sono stati vaccinati entro 5 mesi dall'ultima somministrazione del farmaco e 13 invece dopo oltre 5 mesi.

E' stato somministrato loro il vaccino trivalente inattivato, AGRIPPAL S1, comprendente H1N1 A / Brisbane / 59/2007, H3N2 A / Uruguay / 716/2007 (A / Brisbane / 10 / 2007-like) e BB / Brisbane / 60/2008.

La risposta anticorpale è stata misurata con il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione come da protocollo (Oren S et al., 2008).

Prima della vaccinazione, i livelli di anticorpi HI non differivano tra i pazienti in cura con rituximab, con DMARD e i soggetti sani, sono poi aumentati dopo

la vaccinazione in tutti e tre i gruppi. Come si può vedere dalla figura sottostante, in particolar modo c'è stato un aumento significativo della risposta a tutti e tre gli antigeni per i soggetti sani ed in cura con DMARD, mentre per il gruppo in cura con rituximab solo al ceppo B (Arad U. et al., 2011).

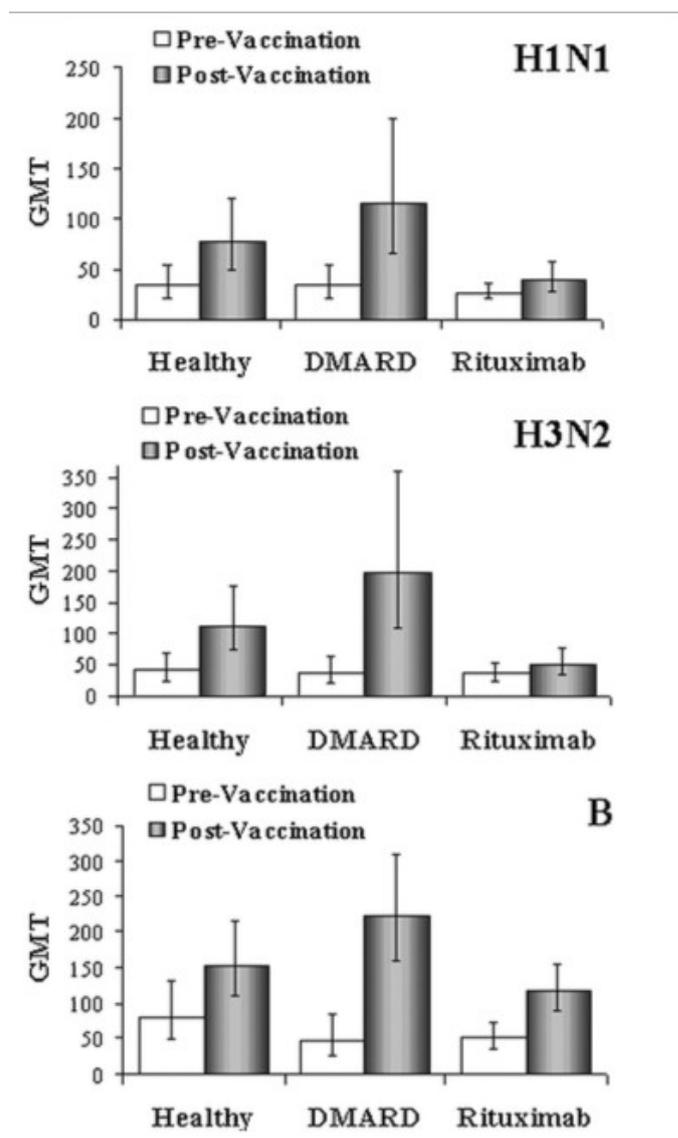


Figura 11: Livelli di anticorpi HI in tutti e tre i gruppi prima e dopo la vaccinazione.

Nel gruppo trattato con rituximab, i pazienti vaccinati dopo 5 mesi dall'ultimo trattamento hanno avuto un maggiore aumento di anticorpi rispetto a quelli vaccinati entro 5 mesi, ma rimane comunque la risposta più bassa, se paragonata agli altri due gruppi in cura con DMARD e ai soggetti sani. Esattamente il 26,4% contro il 68,4% dei trattati con DMARD e 41,7% dei soggetti sani.

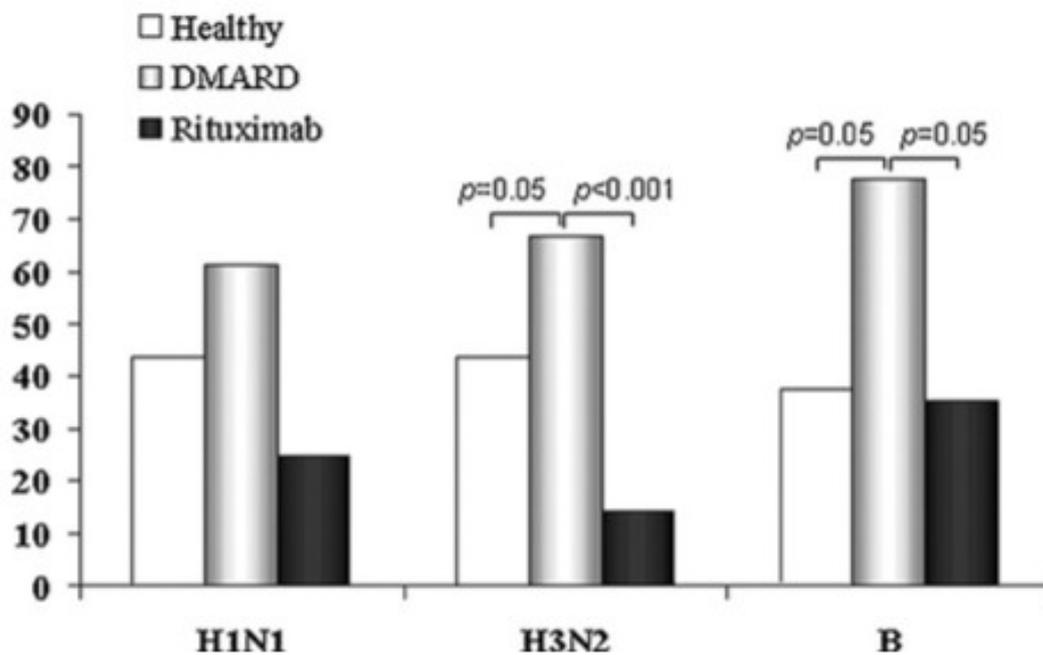


Figura 12: Percentuale di risposta alla vaccinazione nei tre gruppi analizzati

Dai campioni di sangue venoso eparinizzato prelevati ai pazienti, è stata fatta la conta cellulare mediante citometria a flusso. Le cellule specifiche coinvolte sono state definite come la percentuale di CD69+/IFN- γ prodotti dalla popolazione di linfociti T in risposta allo stimolo, quindi in risposta al vaccino. Dopo la vaccinazione antinfluenzale, la percentuale di cellule CD4+ specifiche dell'influenza è maggiore nei soggetti in cura con rituximab e DMARD mentre nel gruppo dei soggetti sani, la percentuale di cellule CD4+ è più bassa di circa la metà. Caso curioso, poichè il livello di queste cellule prima della vaccinazione nel gruppo di controllo sano, era maggiore. Questo

potrebbe essere in parte spiegato dal fatto che i soggetti sani sono stati vaccinati circa 2 mesi più tardi rispetto a quelli affetti da artrite reumatoide, i quali sono stati invece invitati a vaccinarsi molto prima a causa delle loro condizioni di salute. Un altro motivo potrebbe essere dovuto ad una eventuale precedente esposizione al virus.

I pazienti affetti da artrite reumatoide in cura con rituximab hanno avuto un aumento della risposta cellulare in seguito alla vaccinazione, paragonabile a quella dei soggetti in cura con DMARD.

Un nesso positivo è stato riscontrato tra il numero di cellule CD19 presenti al momento della vaccinazione e la risposta cellulare nei pazienti con artrite ed in cura con rituximab. Non è stato invece trovato tra la risposta cellulare e l'età dei pazienti, una eventuale precedente vaccinazione, il dosaggio di una probabile terapia con prednisone o metotrexate.

In conclusione questo studio dimostra che nonostante la risposta umorale sia significativamente bassa nei pazienti in cura con rituximab, a causa della loro deplezione di cellule B, è mantenuta la risposta cellulare alla vaccinazione, infatti la conta cellulare relativa alle cellule CD4+ è simile a quella dei pazienti in cura con DMARD. Quindi durante la terapia con rituximab, il vaccino antinfluenzale garantisce ugualmente una protezione dall'influenza. (Arad U. et al., 2011).

CAPITOLO 5: Vaccinazione anti H1N1 in pazienti con artrite reumatoide

Durante la pandemia di influenza 2009, è stata eseguita una vaccinazione di massa in tutta Europa. In Svezia, è stato offerto in modo gratuito a tutti i residenti il vaccino contro H1N1 (pH1N1). Secondo uno studio dell'OMS pubblicato dall'istituto svedese per il controllo delle malattie trasmissibili, la copertura della vaccinazione ha interessato il 60% del paese (WHO, 2009). Per l'occasione, è stato utilizzato un vaccino monovalente inattivato contenente 3,75 µg di emoagglutinina (HA) e come adiuvante un'emulsione olio-acqua di squalene (AS03) (Roman F. et al., 2010). Il vaccino è stato altamente immunogenico con un risultato dal 77% al 94% negli adulti vaccinati, dopo la somministrazione di una singola dose (Roman F. et al., 2010; Jackson LA et al., 2012). L'utilizzo dell'adiuvante squalene ha migliorato la risposta anticorpale del vaccino inattivato, sebbene sia stato associato ad una serie di effetti avversi locali, non evidenziati nel vaccino senza l'adiuvante; la risposta immunitaria si è mantenuta fino a 6 mesi, in adulti sani di età superiore o uguale a 65 anni, dopo la somministrazione di una singola dose di vaccino (Ferguson M. et al., 2012; Ikematsu H. et al., 2012).

In Svezia, tutti i soggetti che sono in terapia con farmaci immunosoppressori comprese le terapie biologiche con anticorpi monoclonali, sono considerati ad alto rischio di complicanze nel caso contraessero l'influenza, pertanto è stato raccomandato dal Consiglio Nazionale Svedese di Salute e benessere, che effettuassero due dosi di vaccino a distanza di 21 giorni l'una dall'altra (Swedish National Board of Health and Welfare, 2011).

Nel dipartimento di Scienze Cliniche, sezione di Reumatologia , presso la Skåne University Hospital di Lund in Svezia, è stato condotto uno studio (Kapetanovic MC. et al., 2014) il cui scopo è stato quello indagare la risposta immunitaria al vaccino adiuvato pH1N1 in relazione alla tempistica, cioè da 1 a 22 mesi dopo la vaccinazione ed il dosaggio utilizzato, se 1 o 2 dosi singole in pazienti con disturbi artrici in cura con terapie biologiche. Inoltre, è stata anche valutata la tollerabilità del vaccino stesso in pazienti con artrite reumatoide (Kapetanovic et al., 2014).

Tutti i pazienti che hanno preso parte allo studio, sono stati immunizzati con una singola dose o due dosi di vaccino monovalente adiuvato (Pandemrix®) contenente come specificato prima 3,75 µg di emoagglutinina (HA) e squalene (AS03) (Roman F. et al.,2010).

La vaccinazione è stata effettuata durante la stagione invernale 2009/2010.

La risposta anticorpale è stata determinata utilizzando il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione su campioni di sangue conservati nel laboratorio prima del 2009 e poi dopo 5 mesi dalla vaccinazione (De Jong JC. et al., 2003).

Il gruppo di studio comprendeva 291 pazienti con artrite reumatoide o spondilite anchilosante, in cura con farmaci biologici come anti TNF α , abatacept, rituximab o tocilizumab.

Ogni soggetto ha mantenuto la propria cura come precedentemente stabilito, inoltre ognuno aveva fatto almeno due cicli di terapia prima di fare la vaccinazione.

In base al tipo di trattamento a cui sono sottoposti, sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- 1) 50 soggetti con artrite reumatoide in cura con metotrexate;
- 2) 38 soggetti con artrite reumatoide in cura con anti TNF α ;
- 3) 53 soggetti con artrite reumatoide in cura con metotrexate e anti TNF α ;

- 4) 10 soggetti con artrite reumatoide in cura con rituximab e altri 7 con altri farmaci biologici;
- 5) 41 soggetti con spondilite anchilosante in cura con anti TNF α ;
- 6) 51 soggetti con spondilite anchilosante in cura con metotrexate e anti TNF α ;
- 7) 41 soggetti con spondilite in cura con FANS.

	All patients (number = 291)	RA on MTX (number = 50)	RA on anti-TNF monotherapy (number = 38)	RA on anti- TNF + MTX (number = 53)	RA on abatacept (number = 5)	RA on rituximab (number = 10)	RA on tocilizumab (number = 2)	SpA on anti-TNF monotherapy (number = 41)	SpA on anti- TNF + MTX (number = 51)	SpA on NSAIDs/ analgesics controls (number = 41)
Age (years) mean (range)	57 (23 to 87)	62.3 (26 to 87)	62.4 (32 to 86)	61.1 (41 to 83)	55.2 (43 to 66)	62.3 (43 to 79)	63.5 (55 to 72)	49.0 (2 to 69)	52.6 (26 to 71)	52.2 (23 to 72)
Gender (% female)	64	78	84	80	86	80	100	37	51	51
Disease duration (years) mean (range)	16.0 (1 to 55)	12.5 (1 to 41)	21.1 (3 to 46)	18.2 (2 to 48)	12.4 (6 to 24)	22.3 (5 to 55)	21.5 (15 to 28)	16.6 (1 to 36)	13.1 (1 to 42)	14.3 (1 to 37)
RF positive (%)	43	76	87	76	100	80	100	—	—	—
Anti-CCP positive (%)	43	82	74	83	80	80	50	—	—	—
HLA-B27 positive (%)	22.3	—	—	—	—	—	—	56	28	68

MTX, methotrexate; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs; RA, rheumatoid arthritis; SpA, spondylarthropathy.

Tabella 2: Caratteristiche dei soggetti che hanno preso parte al test.

I campioni di sangue sono stati elaborati prima e dopo la vaccinazione, in un range di tempo compreso fra 1 e 22 mesi. Come si può vedere dalla figura sottostante, i livelli anticorpali sono leggermente più bassi nel range da 3 a 6 mesi dopo aver ricevuto la vaccinazione e nessuna ulteriore diminuzione si

riscontra dopo i 6 mesi.

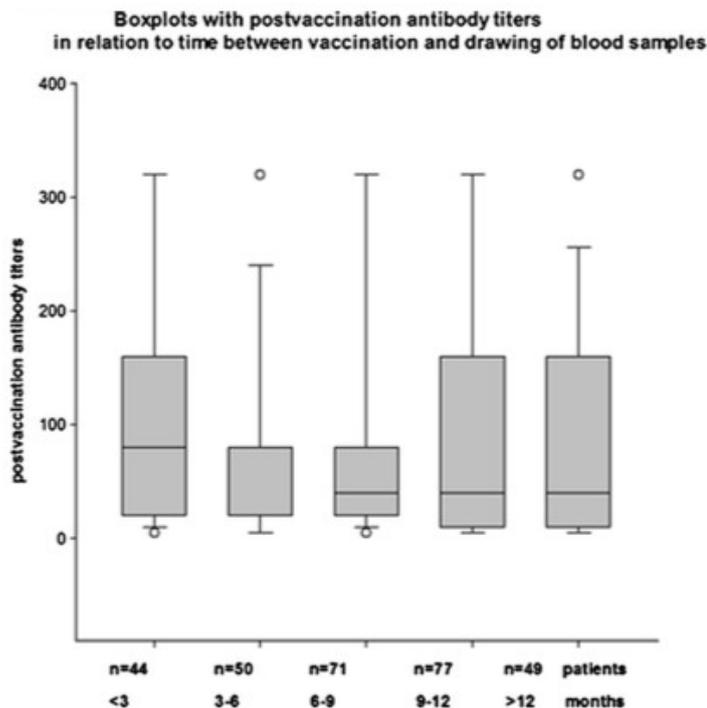


Figura 13:
Andamento temporale dei livelli di anticorpi dopo vaccinazione antinfluenzale.

Dei 291 pazienti presi in esame, 123 (42%) hanno ricevuto una singola dose di vaccino; coloro che sono in terapia con rituximab hanno avuto una notevole diminuzione del livello di anticorpi dopo la vaccinazione e solo un paziente ha dato una risposta immunitaria positiva (sieroconversione).

La vaccinazione con una singola dose non ha soddisfatto tutti i criteri del CHMP per la protezione contro le infezioni nei pazienti trattati con rituximab, mentre al contrario, la percentuale di pazienti con una risposta immunitaria positiva dopo aver ricevuto una singola dose di vaccino è stata simile in tutti gli altri gruppi osservati.

Dei 291 pazienti, 168 (58%) ha invece ricevuto due dosi di vaccino e rispetto ad una singola dose, l'immunizzazione ha dato una risposta positiva in tutti i gruppi di trattamento affetti da artrite reumatoide eccetto il gruppo in monoterapia con rituximab e monoterapia con metotrexate.

Nessuno dei 6 pazienti affetti da artrite reumatoide in cura con rituximab che ha ricevuto due dosi di vaccino ha avuto una risposta umorale positiva.

Un altro fattore che è stato tenuto in considerazione è l'età dei soggetti sottoposti alla vaccinazione.

Sono stati suddivisi in due gruppi principali, pazienti con età compresa tra 18 e 60 anni e pazienti di età superiore a 60 anni, tutti quanti sempre mantenendo il proprio gruppo di appartenenza sulla base delle terapie in corso.

E' emerso che per quanto riguarda il gruppo in cura con rituximab, non sono stati raggiunti i livelli sufficienti di risposta anticorpale in nessuno dei due gruppi, mentre tutti gli altri hanno raggiunto livelli positivi di sieroconversione, eccetto per il gruppo affetto da spondilite anchilosante in cura con metotrexate e farmaci anti TNF α .

Quindi la scarsa risposta è indipendente dall'età del paziente. La figura sottostante riassume questi risultati.

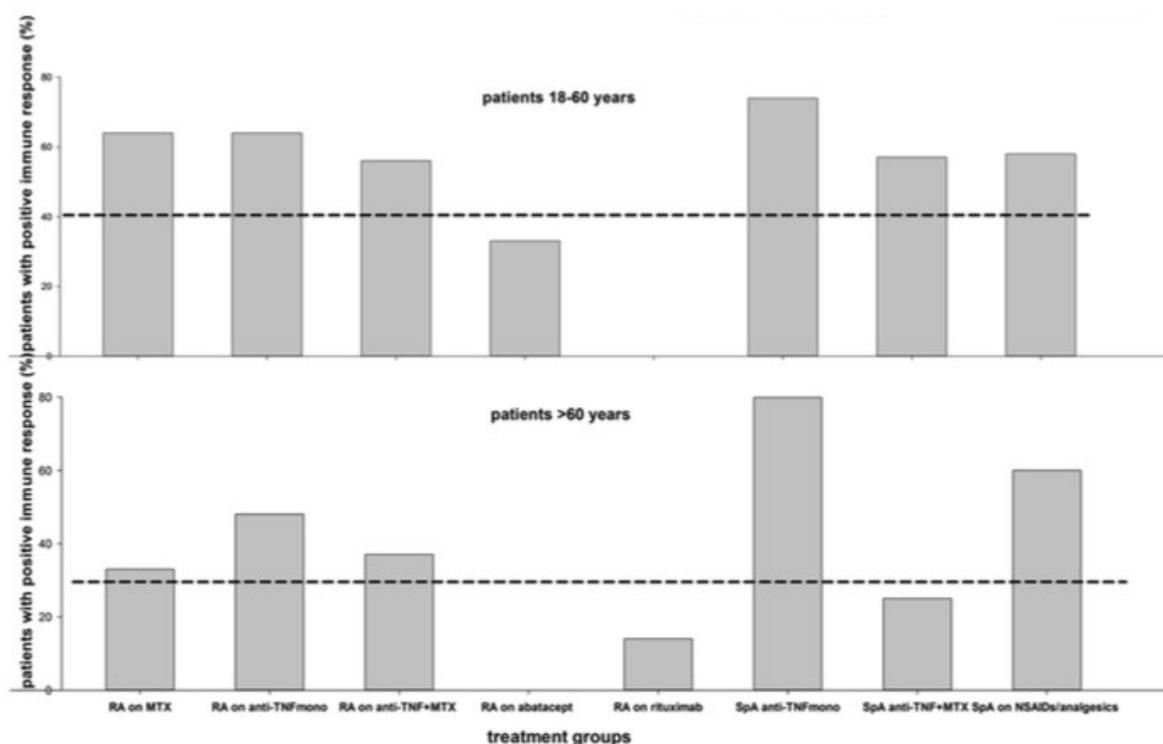


Figura 14: percentuale di pazienti con risposta immunitaria positiva dopo la vaccinazione contro il virus influenzale H1N1 suddivisi per età.

Analizzando i dati ottenuti, è emerso che l'età avanzata, l'artrite reumatoide conclamata ed il fumo di sigaretta sono fattori che incidono sulla ridotta risposta anticorpale, mentre il tempo che intercorre tra la vaccinazione ed il prelievo di sangue non ha alcun impatto significativo sulla risposta umorale nei pazienti con un livello di anticorpi negativo prima della vaccinazione.

Valutando la sicurezza del vaccino inoculato, è emerso che è stato ben tollerato, provocando solo lievi effetti collaterali. Di tutti i pazienti presi in esame, 53 hanno riferito dolore locale intorno alla zona di iniezione, 41 hanno avuto qualche linea di febbre per un paio di giorni e 10 hanno avuto sintomi influenzali accompagnati da dolore muscolare, mal di testa ed affaticamento. Alcuni hanno manifestato capogiri e lievi infezioni alle alte vie respiratorie,

solo un paziente ha sviluppato polmonite da richiedere il trattamento con antibiotici ma senza ricovero in ospedale.

Altro segno negativo è che la maggior parte dei pazienti ha notato un peggioramento dei sintomi della malattia reumatica, inteso come maggior dolore alle articolazioni e maggior irrigidimento mattutino, accompagnato da una eccessiva stanchezza generalizzata.

In conclusione il quadro è piuttosto chiaro: i pazienti in cura con rituximab sono coloro che hanno avuto una risposta immunitaria più bassa di tutti gli altri, con un'elevata deplezione di cellule CD20, indipendentemente dall'età del paziente. Anche quelli in cura con metotrexate a cui sono state somministrate due dosi di vaccino, non hanno dato segni di miglioramento rispetto a coloro che hanno ricevuto una dose soltanto. In quest'ultimo gruppo, si nota solo un leggero margine di miglioramento in quei pazienti con età inferiore a 60 anni; molto probabilmente questa differenza è collegata all'immunosenescenza (Weiskopf D. et al., 2009).

L'immunosenescenza è l'invecchiamento del sistema immunitario, che si manifesta con una ridotta capacità di risposta agli agenti patogeni, ad una diminuita risposta alla vaccinazione e ad un aumento dell'incidenza di patologie autoimmuni, tutte condizioni che non fanno altro che peggiorare lo stato di salute dei pazienti (Aw D et al., 2007).

E' chiaro che il rituximab provoca una carenza di cellule B mature e una diminuzione di plasmacellule differenziate, questo può infatti spiegare la diminuita risposta anticorpale alla vaccinazione.

CAPITOLO 6: Raccomandazioni in reumatologia

Dal momento che i rischi di contrarre infezioni di ogni genere sono molto elevati nei pazienti immunocompromessi, vi è un grande interesse a sviluppare soluzioni preventive. Un certo numero di vaccini sono a disposizione del reumatologo e alcuni di essi hanno una grande importanza per i pazienti affetti da artrite reumatoide; è importante però conoscere ed essere consapevoli delle eventuali controindicazioni che possono esserci nel somministrare un vaccino ad un soggetto immunocompromesso (Perry LM. et al., 2014).

Sia l'American College of Rheumatology (ACR) sia l'European Union League Against Rheumatism (EULAR) hanno emesso alcune raccomandazioni riguardo all'uso appropriato di vaccini per i pazienti con artrite reumatoide; le ultime risalgono al 2012 ed affermano che il momento ottimale per somministrare vaccini, ad esempio per l'influenza, lo pneumococco, HPV.. è prima di iniziare la terapia con farmaci, siano essi biologici o non. In generale questo aiuta ad ottimizzare le risposte vaccinali più ostiche e nel caso di vaccini utilizzati vivi, come quello per l'Herpes zoster, limita il presunto rischio di contrarre infezioni sia locali che sistemiche (Perry LM. et al., 2014).

6.1 Principali vaccinazioni e considerazioni specifiche

-Influenza-

I costituenti del vaccino per l'influenza stagionale, possono cambiare di anno in anno, secondo il tipo di ceppo virale che è in circolazione. A partire dal 2009, il ceppo del virus influenzale H1N1 è stato incorporato nei costituenti di base del vaccino trivalente stagionale, costituito dal due antigeni dell'influenza A insieme ad un componente dell'influenza B. Negli Stati

Uniti, a partire dal 2013, un vaccino quadrivalente ed un trivalente sono resi disponibili nella forma inattivata e si prevede che ben presto il quadrivalente vada a sostituire il trivalente. Questo perché il vaccino attenuato, è approvato solamente per gli individui sani di età compresa tra 2 e 49 anni, mentre è controindicato per coloro che sono affetti da malattie reumatiche (Immunization Schedules, 2013).

Come già è stato evidenziato nello studio condotto nel dipartimento di reumatologia di Tel Aviv (Oren S et al., 2007), ovvero che i pazienti in cura con l'anticorpo monoclonale rituximab ai quali è stata effettuata la vaccinazione antinfluenzale, hanno avuto una risposta umorale più bassa rispetto agli individui sani, la risposta è comunque presente. Il rituximab riduce notevolmente la capacità di risposta alla vaccinazione antinfluenzale, ma questo non sorprende più di tanto, visto il bersaglio molecolare del farmaco (Arad U. et al., 2011; Oren S. et al., 2008). E' stato però visto che la riduzione nella risposta, dipende dal periodo di tempo in cui viene effettuata in relazione alla somministrazione del rituximab, infatti i pazienti vaccinati prima della somministrazione dell'anticorpo monoclonale, hanno avuto una grande risposta umorale rispetto a coloro che invece sono stati vaccinati dopo aver ricevuto il farmaco (Rehnberg M. et al., 2010). Un altro studio invece ha dimostrato che i pazienti vaccinati 6-10 mesi dopo aver ricevuto il rituximab hanno avuto una migliore risposta rispetto a quelli vaccinati 4-8 settimane dopo (Van Assen S. et al., 2010).

In sintesi, i tempi della somministrazione del vaccino contro l'influenza tra i pazienti in trattamento con farmaci immunomodulatori condizionano l'efficacia del trattamento. Sarebbe opportuno che la vaccinazione venisse fatta ogni anno prima dell'avvento della stagione autunnale, indipendentemente dalle loro terapie, prestando una maggiore attenzione ai

soggetti in cura con rituximab. Per questi, un'ampia finestra di tempo porterebbe solo benefici (Perry LM. et al., 2014).

-Pneumococco-

Il vaccino pneumococcico è disponibile in diverse formulazioni, come polisaccaride o come coniugato. La vaccinazione polisaccaridica (PPSV-23) viene utilizzata negli adulti per fornire loro una protezione nei confronti di 23 sierotipi di polmonite, mentre nei bambini si utilizza la forma coniugata (PCV-13). Quest'ultima, teoricamente, garantisce una risposta immunitaria più robusta rispetto al vaccino polisaccaridico. Di conseguenza, l'utilizzo di PCV-13 è stato raccomandato dal Center for disease Control (CDC) nei soggetti immunodepressi, proprio grazie a questa sua capacità (Perry et al., 2014). Mancano però dati a riguardo, non è chiaro se la forma coniugata sia realmente migliore nelle condizioni in cui si trovano i soggetti immunocompromessi. Sono infatti scoperte molto recenti che si basano su un numero troppo limitato di casi.

Gli ultimi studi a riguardo risalgono al 2010, dove è stata valutata la risposta anticorpale di PPSV-23 in pazienti con artrite reumatoide in cura con rituximab. E' stato riscontrato come per la vaccinazione antinfluenzale, che coloro che sono stati vaccinati prima di ricevere il farmaco, hanno avuto una risposta maggiore di quelli trattati dopo la somministrazione di rituximab (Bingham CO. et al., 2010; Rehnberg M. et al., 2010).

In conclusione, il vaccino pneumococcico PPSV-13 è consigliato nei pazienti immunodepressi, con le opportune precauzioni, e deve essere ripetuto 5 anni dopo la prima vaccinazione (Clutterbuck EA. et al., 2012).

-Herpes zoster-

Al fine di prevenire l'herpes zoster, è stato messo a punto un vaccino attenuato (Zostavax) ed approvato per l'utilizzo nei confronti di pazienti di età superiore a 50 anni (Morrison VA. et al.,2013). Da un'indagine statistica è emerso che tra 19.326 pazienti affetti da artrite reumatoide di età superiore a 50 anni, solo 206 hanno effettuato la vaccinazione anti erpetica. Questo sta a significare che c'è una certa preoccupazione e diffidenza da parte dei medici nell'effettuare questo tipo di vaccinazione. Inoltre, circa 60 pazienti vaccinati hanno iniziato una terapia con farmaci anti TNF α senza che fosse trascorso neanche un mese dalla vaccinazione e nessun caso di Herpes zoster è stato segnalato. Lo stesso vale per uno studio condotto negli USA, dove 663 soggetti in cura farmaci biologici, hanno ricevuto la vaccinazione erpetica e nessun paziente ha sviluppato zoster nelle 6 settimane successive alla vaccinazione. All'interno di questo gruppo di studio, solo il 3,3% dei pazienti con artrite reumatoide di età superiore a 60 anni, ha ricevuto la vaccinazione (Oxman MN. et al., 2005).

Gli studi effettuati suggeriscono una efficacia clinica evidente ed una riduzione del rischio assoluto, pertanto da estendere senza eccessive remore anche ai malati artritici.

Dall'analisi degli studi condotti, sia l'ACR che l' EULAR sottolineano l'importanza e la necessità della vaccinazione per i pazienti con artrite reumatoide, anche se ci sono alcune lacune, specialmente per quanto riguarda le tipologie di vaccinazione sopra elencate. In particolare, la sicurezza del vaccino Herpes zoster deve essere ancora dimostrata, così come la necessità di una seconda vaccinazione e gli intervalli di tempo giusti da adottare; ad esempio, gli studi condotti su pazienti sani anziani, confermano che l'immunità dura fino 5 anni, ma non è noto se questo risultato può essere

generalizzato a pazienti affetti da artrite reumatoide (Schmader KE et al., 2012).

In conclusione, la vaccinazione rimane l'unico mezzo per ridurre il rischio di contrarre l'infezione. I soggetti affetti da artrite reumatoide, devono ricevere il vaccino antinfluenzale una volta l'anno, lo stesso vale per quello pneumococcico in accordo alle linee guida pubblicate dal CDC. Fa differenza la vaccinazione erpetica poichè contiene un virus vivo attenuato, controindicato nei pazienti in cura con farmaci biologici. I tassi di zoster tra i pazienti artritici sono però elevati e questo solleva l'importanza della ricerca di una strategia giusta, in modo da garantire la giusta protezione senza arrecare ulteriori danni. Come per le altre vaccinazioni, la tempistica giusta sembrerebbe prima dell'inizio della terapia con farmaci biologici (Perry LM et al., 2014).

CAPITOLO 7: La vaccinazione antinfluenzale nei pazienti oncologici sottoposti a terapia sistemica

I malati di cancro spesso vanno incontro ad infezioni prevenibili, tra cui l'influenza A e B. Queste infezioni possono essere causa di malattia e mortalità significative. L'aumento del rischio di infezione può essere a causa del tumore stesso o della immunosoppressione indotta dal trattamento (Borella e Webster, 1971).

L'infezione spesso causa ritardi nella terapia antitumorale peggiorando il quadro oncologico. Ogni anno le complicazioni dell'influenza determinano in generale più di 36.000 morti e 226.000 ospedalizzazioni (Centers for Disease Control and Prevention Y. Update, 2010). La mortalità correlata al virus influenzale può raggiungere il 9% dei pazienti oncologici sottoposti a terapia (Loulergue et al., 2008).

E' stato dimostrato che la vaccinazione antinfluenzale riduce il rischio di infezione in pazienti con sistema immunitario intatto (Centers for Disease Control and Prevention X., 2011). Nei soggetti affetti da tumore l'immunizzazione attiva può conferire protezione nei confronti di diverse infezioni nella stessa misura degli individui sani, che si traduce in una ridotta durata e gravità dell'infezione e potenziale miglioramento della morbosità e mortalità (Anderson et al., 1999).

Comunque non è ancora ben chiaro se i pazienti sottoposti a chemioterapia sistemica possono manifestare risposte sierologiche ottimali ai vaccini. Le conoscenze relative all'efficacia, la sicurezza e la tempistica ideale di questa popolazione di pazienti sono ancora limitate.

Sebbene i Centri per il Controllo e la Prevenzione delle Malattie (CDC) raccomandino la vaccinazione antinfluenzale annuale per le persone ad alto rischio, compresi gli operatori sanitari, gli anziani e i pazienti immunodepressi o che hanno malattie croniche e maligne, soltanto un numero

inferiore al 50% dei soggetti sottoposti a chemioterapia ricevono regolarmente la vaccinazione contro l'influenza (Loulergue et al., 2008; Anderson et al., 1999; Sommer et al., 2006).

7.1 Virulenza dell'influenza.

Negli Stati Uniti l'epidemia annuale di influenza si verifica durante il tardo autunno e l'inizio della primavera. I virus dell'influenza possono causare la malattia in persone di qualunque età, ma più spesso si manifesta nei bambini (Monto e Kioumeh, 1975; Glezen e Couch, 1978; Glezen et al., 2000). Infezioni gravi ed effetti letali sono più frequenti in soggetti di età superiore ai 65 anni e nei bambini al di sotto dei 2 anni oppure in persone di ogni età in condizioni di salute che aumentano il rischio di complicazioni (Monto e Kioumeh, 1975; Barker WH, 1986). L'influenza può essere anche secondaria a polmoniti batteriche, sinusiti, infezioni auricolari o al peggioramento di patologie respiratorie croniche (Thompson et al., 2003; Pollyea et al., 2010). Esistono due tipi principali di virus influenzali, tipo A e tipo B, responsabili della maggior parte dei casi di malattia grave nell'uomo. L'influenza di tipo A è ulteriormente classificata in base alla presenza di due antigeni di superficie, emagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), e l'influenza B è differenziata in due linee genetiche, Yamagata e Victoria (Centers for Disease Control and Prevention Y. Update, 2010; Pollyea et al., 2010). Ogni variazione nella sequenza aminoacidica di HA e/o NA determina le epidemie stagionali. Nell'aprile del 2009 un nuovo virus influenzale A (H1N1), spesso chiamato pdm 2009 A/H1N1, simile ma geneticamente e antigenicamente diverso dai virus A (H1N1) precedentemente identificati nel suino, è stato identificato come causa di malattie respiratorie riscontrate nel Nord America e diffuse dal maggio 2009 in molte altre zone del mondo (Dawood et al., 2009). L'influenza causata dal pdm 2009 A/H1N1 si è protratta per tutta la primavera e l'estate del 2009 e fu la causa della prima pandemia del 1968. Il

pdm 2009 A/H1N1 ha sostituito il virus H1N1 precedentemente responsabile dell'influenza nell'uomo (Centers for Disease Control and Prevention Y. Update, 2010).

7.2 Il cancro e l'immunizzazione.

Il cancro aumenta il rischio di complicazioni da influenza, compresa l'ospedalizzazione e il decesso (Cooksley et al., 2005). Nei pazienti oncologici è stata riscontrata una alterata immunità umorale e cellulare (Steinherz et al., 1980; Brydak et al., 2001). Inoltre molti pazienti oncologici vengono trattati con farmaci citostatici e immunosoppressivi e la chemioterapia stessa è spesso associata a vari disturbi (Brydak et al., 2001). Per questi motivi i malati di cancro possono essere considerati soggetti ad alto rischio, in particolare per quanto riguarda le complicazioni post-influenza e dovrebbero essere vaccinati prima di ogni stagione in cui si prevede l'insorgenza dell'epidemia.

In uno studio su pazienti affetti da tumore solido, come quello polmonare e mammario, non sottoposti a chemioterapia sistemica, il titolo anticorpale rilevato dopo la vaccinazione antinfluenzale raggiungeva livelli simili a quelli dei controlli sani (Brydak et al., 2001). Gli anticorpi formati in seguito alla vaccinazione in questo gruppo di soggetti erano significativi rispetto a quelli sottoposti a chemioterapia e non sono state osservate complicazioni più gravi dovute alla vaccinazione (Ganz et al., 1978). I soggetti con tumore polmonare, in particolare, svilupparono una risposta anticorpale protettiva al vaccino antinfluenzale che non risultava influenzata dal trattamento sistemico con farmaci steroidei, dalla recente chemioterapia o dalla biopsia del tumore (Anderson et al., 1999). La copertura anticorpale è in genere bassa nei pazienti che ricevono un trattamento sistemico: soltanto il 18% nei soggetti di età compresa tra i 18 e i 49 anni e il 32% in quelli tra i 50 e i 64 anni (Fiore et al., 2007).

Il CDC raccomanda che vengano vaccinati anche i familiari e le persone vicine ai pazienti oncologici anche se ad alto rischio per problemi correlati al vaccino (Centers for Disease Control and Prevention Y. Update, 2010).

Un recente studio condotto negli USA nel dipartimento di medicina interna di Cincinnati (Shehata & Karim, 2014), prende in considerazione alcuni articoli pubblicati dal 1964 al 2013, usando come termini di ricerca le parole “tumore”, “adulto”, “vaccinazione antinfluenzale” e “chemioterapia”.

Sono stati esaminati studi basati su campionamenti sistematici con criteri clinici definiti prescindendo dalle condizioni di vaccinazione dei pazienti oncologici, studi che valutano gli esiti clinici e la risposta immunologica dopo la vaccinazione in pazienti affetti da tumore, studi che dimostrano l'efficacia della vaccinazione in diversi tipi di cancro, studi su pazienti oncologici nei quali viene utilizzato il vaccino antinfluenzale inattivato e il vaccino vivo attenuato e studi che stabiliscono i potenziali benefici e le complicazioni della vaccinazione in questi soggetti.

In base alle parole chiave sono stati identificati 251 lavori, dei quali 52 scelti per lo stesso argomento di interesse. Tra questi soltanto 16 rispondevano ai criteri imposti dagli Autori che li hanno ulteriormente distinti sulla base della diversa malattia tumorale, se a massa solida o ematologica. E' stato inoltre tenuto conto del tempo di vaccinazione nei pazienti sottoposti a chemioterapia rispetto a quelli non trattati.

Dei 16 studi presi in considerazione (per un totale di 1076 pazienti) nessuno riporta gli esiti clinici, mentre tutti riferiscono l'immunità all'influenza e le reazioni avverse alla vaccinazione;

6 riguardano tumori a massa solida e 10 tumori ematologici. In 12 lavori è stata confrontata la risposta sierologica al vaccino antinfluenzale di soggetti sotto chemioterapia (n = 425) con quella di soggetti non trattati (n = 376). In tre studi le risposte sierologiche al vaccino antinfluenzale di soggetti trattati con chemioterapia sono state paragonate a quelle di individui sani. Per la loro

valutazione è stato misurato l'aumento di quattro volte del titolo anticorpale con il test della inibizione della emoagglutinazione. Nei pazienti in trattamento chemioterapico la risposta immunologica era considerevolmente più debole (17-52%) rispetto a quelli che avevano terminato la chemioterapia (50-83%) e a quelli sani (67-100%). Per quanto riguarda gli effetti avversi i pazienti oncologici che avevano ricevuto il vaccino manifestavano lievi reazioni locali e una leggera febbre.

In conclusione, i soggetti con tumori solidi ed alcuni con tumori ematologici sono stati in grado di evocare una risposta immunitaria al vaccino antinfluenzale, ma non è ancora chiaro come tale condizione li protegga dall'influenza o dalle sue complicazioni; comunque il vaccino risulta sicuro. In attesa di risultati che forniscano maggiori dettagli circa gli effetti benefici della vaccinazione antinfluenzale, i medici dovrebbero tenere in considerazione gli attuali vantaggi dimostrati nei pazienti oncologici sotto chemioterapia quali la riduzione della durata e della gravità della malattia e la significativa diminuzione della morbosità e mortalità legate all'influenza in questi pazienti ad alto rischio.

CAPITOLO 8: Il linfoma non-Hodgkin

Il linfoma non-Hodgkin è un tumore che si sviluppa nelle cellule del sistema immunitario, in particolar modo a carico dei linfociti. Il tessuto linfatico si trova in diverse parti dell'organismo, quindi il linfoma si può sviluppare praticamente ovunque; spesso ha origine da un linfonodo a livello diaframmatico. Il sistema linfatico comprende una rete di vasi linfatici, adibiti al trasporto di liquidi fuoriusciti dal sistema cardiovascolare e organi linfatici distribuiti in tutto l'organismo.

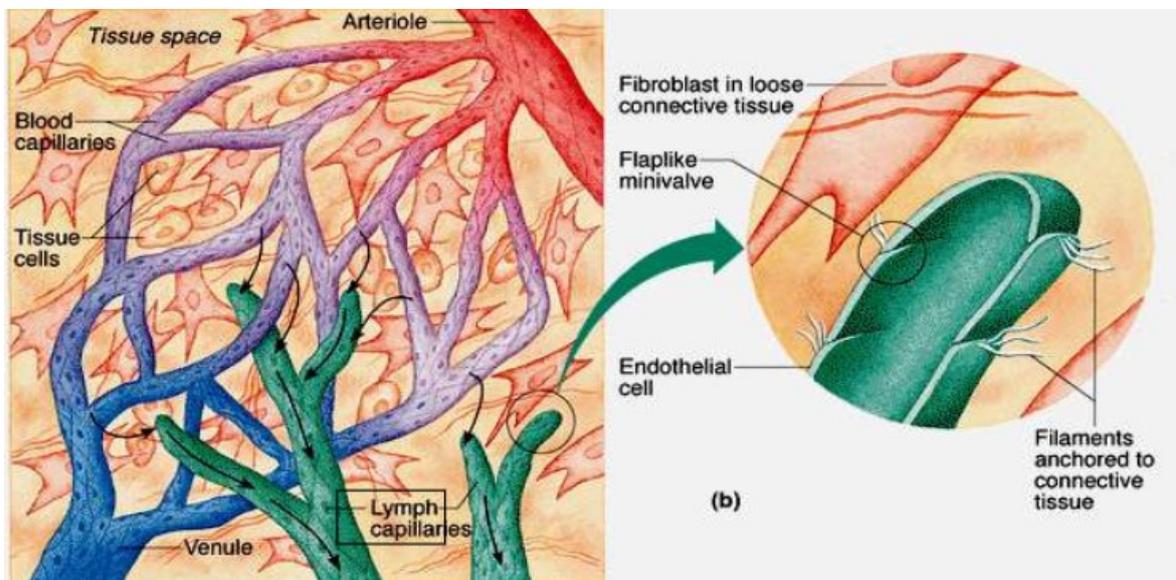
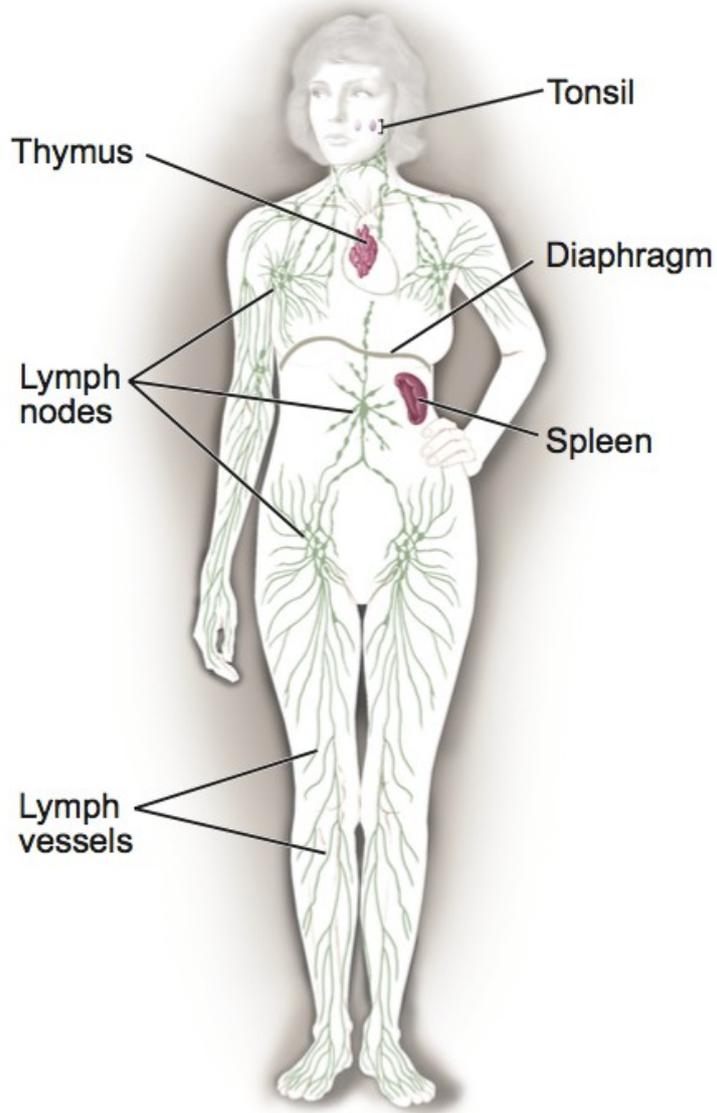


Figura 15: Sistema linfatico e focus sui capillari linfatici

Fanno parte del sistema linfatico anche i linfonodi, piccoli ammassi di tessuto linfatico lungo il decorso dei vasi, con funzione di filtraggio della linfa prima che ritorni nel sangue e anche alcuni organi come tonsille, milza, timo. Nella figura sottostante (Figura 16) si può avere un quadro generale della distribuzione del sistema linfatico.



I linfomi non Hodgkin comprendono più di 60 entità clinico-patologiche, che vengono suddivise in forme mature e immature; queste due forme vengono ulteriormente frazionate sulla base dell'appartenenza alla cellula linfocitaria di origine: linfociti B, linfociti T, cellule NK (= natural killer), a differenti stadi di maturazione (Sodroski, 1984).

Il linfoma si sviluppa quando si manifesta un'anomalia in un linfocita

e questo, replicandosi produce sempre più cellule anomale non in grado di proteggere l'organismo dalle infezioni come farebbero quelle sane. Quello che si forma è una massa di cellule neoplastiche detta appunto tumore.

I linfomi non Hodgkin sono un gruppo eterogeneo di tumori che rappresentano il 3% di tutte le neoplasie e anche se può teoricamente colpire a tutte le età, oltre la metà dei soggetti ha un'età superiore a 65 anni (WHO, 2008).

I fattori di rischio sono noti solo in parte. Sicuramente alla base c'è un indebolimento del sistema immunitario, sia per fattori genetici ereditari che

dovuti all'esposizione di alcuni farmaci, ma anche alcune infezioni possono predisporre l'organismo a contrarre la malattia. Tra queste troviamo il virus dell'HIV, il virus EBV (Epstein-Barr), Helicobacter pylori e anche il virus dell'epatite C (Sodroski, 1984).

Il linfoma non Hodgkin può causare diversi sintomi, riassumibili in:

- gonfiore, non doloroso ai linfonodi del collo, delle ascelle e dell'inguine;
- eccessivo dimagrimento;
- febbre, tosse ed intensa sudorazione notturna;
- debolezza e stanchezza che non scompaiono.

La stadiazione del tumore è il processo che permette di definire quanto la malattia è diffusa nell'organismo ed è fondamentale per scegliere i trattamenti migliori. Per il LNH si utilizza in genere il sistema di classificazione di Ann-Arbor. Questa classificazione definisce l'estensione dei linfomi in 4 stadi secondo le sedi coinvolte (nodali o extranodali) e la localizzazione (su uno o entrambi lati del diaframma).

Distingue quattro stadi di malattia indicati con i numeri romani I, II, III e IV. Per assegnare lo stadio è necessario valutare diversi parametri come il numero di linfonodi coinvolti, le sedi di malattia e la presenza o assenza di segni generali come la febbre, la perdita di peso e le sudorazioni notturne. Inoltre, per rendere più precisa la stadiazione, oltre ai numeri vengono utilizzate anche le lettere A, B, E, S e X che corrispondono a:

A=nessun sintomo;

B=presenza di sintomi specifici;

E=malattia che coinvolge un organo esterno al sistema linfatico;

S=malattia che coinvolge la milza;

X=massa tumorale molto grande)

Gli esami clinici cui si ricorre per effettuare una corretta stadiazione sono numerosi ed il primo in assoluto è un'accurata osservazione delle stazioni linfonodali superficiali, dell'anello del Waldeyer, delle dimensioni di fegato e milza; a seguire gli esami del sangue e per finire biopsia, TAC e PET.

La maggior parte dei pazienti con linfoma non Hodgkin può ottenere miglioramenti con la terapia; per molti si ha una guarigione completa della malattia, mentre per altri si può ottenere un miglioramento delle condizioni di salute e un allungamento dell'aspettativa di vita (National Cancer Institute, 2002).

Per quanto riguarda la terapia, i linfomi rappresentano una categoria molto eterogenea dal punto di vista biologico e clinico prognostico; sono generalmente chemio e radiosensibili, per questo chemioterapia e radioterapia sono le principali armi a disposizione. La chirurgia ha un ruolo sempre più limitato alla sola fase diagnostica.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi farmaci cosiddetti "biologici" il cui impiego ha consentito di aumentare significativamente il tasso di risposta e prolungare la sopravvivenza globale. Il farmaco più innovativo di recente approvazione per il trattamento dei linfomi a cellule B che esprimono la molecola CD20 è il rituximab.

CAPITOLO 9: utilizzo del rituximab nel linfoma non – Hodgkin

Il rituximab, come è già stato spiegato precedentemente, è un anticorpo monoclonale anti CD20, utilizzato nei protocolli di numerose malattie, comprese anche le forme più aggressive di linfoma non Hodgkin (NHL).

L'utilizzo ottimale del farmaco in molti contesti clinici è ancora da chiarire, due studi hanno evidenziato la valida efficacia del farmaco in pazienti con recidiva al NHL e come trattamento di prima linea in combinazione a ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone (CHOP) in soggetti anziani con linfoma diffuso a grandi cellule B, ovvero la forma più aggressiva di NHL (Plosker GL et Figgitt DP, 2003).

Il trattamento con rituximab è generalmente ben tollerato, soprattutto in termini di effetti avversi ematologici o infezioni relative alla chemioterapia standard. La maggior parte degli individui manifesta lievi sintomi simil influenzali che vanno piano piano a scomparire con le infusioni successive e soltanto nel 10% dei casi sono comparse reazioni più gravi come broncospasmo ed ipotensione. Sono comunque reazioni generalmente reversibili nel giro di breve tempo, rari sono i casi di decesso in relazione al trattamento con rituximab.

Ultimamente questo anticorpo monoclonale in associazione alla chemioterapia CHOP ha ottenuto grandi risultati in terapia, infatti è emerso come nuovo protocollo standard nel linfoma diffuso a grandi cellule B nei pazienti non precedentemente trattati, soprattutto anziani. Rispetto alla chemioterapia convenzionale, rituximab ha evidenziato minori effetti avversi ematologici intesi come neutropenia grave ed infezioni ad essa stessa correlate. E' quindi consigliato il suo utilizzo, soprattutto in combinazione

agli altri farmaci citotossici sopra elencati.

Durante il trattamento con rituximab, si ha una notevole linfopenia nella maggior parte dei pazienti, di solito della durata di circa 6 mesi con un pieno recupero di linfociti B entro 9-12 mesi dal termine della terapia, poiché le cellule CD20 non sono espresse sulle cellule staminali ematopoietiche (Plosker GL et Figgitt DP, 2003).

Le cellule CD20 sono tuttavia espresse in più del 90% delle cellule tumorali di NHL e anche di leucemia linfocitica cronica; inoltre i dati in vitro indicano che il rituximab sensibilizza le cellule tumorali agli effetti dei farmaci chemioterapici tradizionali.

E' stato visto che le concentrazioni sieriche di farmaco aumentano in proporzione alla dose utilizzata sia nel regime di una singola dose che in dosi multiple nei pazienti affetti da NHL; infatti somministrando una dose di 375 mg una volta alla settimana per 4 settimane in soggetti con recidive di NHL, è stato visto che le concentrazioni sieriche sono raddoppiate dalla prima alla quarta infusione (239,1 mg/L contro 460,7mg/L) mentre il tempo di eliminazione ($t/2$) è aumentato da 76,3 a 205,8 ore , quindi da 3,2 a 8,6 giorni). Il concomitante aumento delle concentrazioni sieriche di rituximab ad ogni infusione può essere dovuto, almeno in parte, all'eliminazione delle cellule B CD20 positive e ad una riduzione o saturazione dei siti di legame CD20 dopo le prime infusioni di farmaco.

Le proprietà farmacocinetiche del farmaco sono caratterizzate da un'ampia variabilità individuale ed è importante sottolineare che un'elevata concentrazione sierica di rituximab non è correlata alla risposta clinica.

Osservando i risultati di uno studio su 40 pazienti affetti da NHL con un basso livello di cellule B follicolari e trattati con rituximab e CHOP come

terapia di prima linea, è emerso che le risposte sono state positive e di lunga durata, perlomeno superiori a 5 anni; si ha un chiaro vantaggio proprio in termini di sopravvivenza (Plosker GL et Figgitt DP, 2003).

CAPITOLO 10: efficacia della vaccinazione anti H1N1 in pazienti in cura con rituximab affetti da linfoma non Hodgkin

I malati di cancro vengono spesso incoraggiati a ricevere la vaccinazione contro l'influenza stagionale. L'anticorpo monoclonale rituximab viene ampiamente utilizzato nella terapia del cancro, incluso nel trattamento del linfoma non-Hodgkin. Provoca un serio impoverimento delle cellule B e questo potrebbe compromettere le eventuali risposte umorali.

Lo scopo di uno studio condotto nel dipartimento di oncologia di Oslo, in Norvegia, è stato quello di verificare se i pazienti con linfoma in trattamento con rituximab o al massimo che lo hanno ricevuto negli ultimi 6 mesi, sono in grado di avere una risposta anticorpale protettiva nei confronti del vaccino Pandemrix dell'influenza A (H1N1) del 2009, conosciuta come "influenza suina" (Yri OE. et al., 2011).

Contrariamente al gruppo di controllo, in cui l'82% risponde in modo adeguato al vaccino, nessuno dei 67 soggetti presi in esame ha raggiunto livelli anticorpali sufficienti in grado di proteggere dall'influenza, deducendo che i pazienti in cura con rituximab, potrebbero non trarre beneficio da questo vaccino. I medici sono pertanto invitati a prestare attenzione quando si trovano di fronte individui in cura con rituximab, poiché potrebbero non rispondere non solo alla vaccinazione contro l'H1N1, ma anche ad altre vaccinazioni comuni (Blood. 2011).

I pazienti inclusi in questo studio sono stati sottoposti al trattamento con rituximab in monoterapia o in combinazione con la chemioterapia, oppure avevano ricevuto queste terapie negli ultimi 6 mesi prima della vaccinazione.

Il gruppo di controllo era costituito da volontari sani ai quali è stato effettuato il vaccino e dei quali sono pervenuti campioni di sangue sia prima che dopo la vaccinazione; lo stesso vale per 30 individui affetti da malattia, mentre di altri 37 si sono avuti solo campioni di sangue dopo la vaccinazione.

Il vaccino inoculato è stato il “Pandemrix”, un monovalente adiuvato contro l’infezione H1N1 ed i titoli anticorpali sono stati valutati eseguendo il test dell’emoagglutinazione, utilizzando globuli rossi di tacchino come indicatori cellulari. Soltanto valori anticorpali >40 sono stati considerati protettivi nei confronti dell’influenza; inoltre, ai pazienti sono stati misurati i livelli di CD3+, CD4+, CD8+ e CD19+ ed i livelli di immunoglobuline prima della vaccinazione.

Inizialmente il numero di soggetti presi in esame era di 71 affetti da linfoma e 85 soggetti sani che costituivano il gruppo di controllo, poi è stato visto che 4 pazienti malati e 34 controlli avevano un livello anticorpale >40 già prima di effettuare la vaccinazione come segno di una precedente esposizione al virus antinfluenzale. Sono quindi stati esclusi dal test, lasciando per l’analisi finale

soltanto 67 individui affetti da linfoma e 57 controlli sani, costituiti da 38 femmine e 13 maschi come si può vedere dalla tabella a fianco.

Characteristic	Value
Median age, y (range)	63 (24-82)
Sex, male/female	40/27
Lymphoma subcategory	
Follicular	21
Diffuse large	17
NHL, nonspecified	22
Other NHL	3
Hodgkin	4
Therapy before vaccination	
R mono	7
R-C(H)OP	45
R-ABVD	3
R-other*	12
Time, last R-dose to vaccination, d, median (range)	21 (0-171)
Treatment (primary/salvage)	41/26
No. of therapy cycles in latest treatment line before vaccination, median (range)	6 (1-12)

NHL indicates non-Hodgkin lymphoma.

*Other therapies included the following: VIM (3), IKE (1), IME (2), FC (1), GMALL-2002 (2), EPOCH (1), EPOCH-fludarabine (1), and bendamustine (1).

Tabella 3: caratteristiche dei pazienti analizzati

L’età media dei

pazienti era di 63 anni (range compreso fra 24 e 82 anni) mentre per il gruppo di controllo di 47 anni (range compreso fra 24 e 68 anni).

La maggior parte dei pazienti avevano ricevuto rituximab in combinazione ad altre terapie, soltanto 7 avevano ricevuto l'anticorpo monoclonale da solo.

Tra i soggetti affetti da linfoma, solo 5 avevano un livello anticorpale misurabile ma non protettivo nei confronti del virus dopo la vaccinazione; tra i restanti 62 pazienti non tutti avevano un titolo misurabile.

Al contrario, 42 dei 51 controlli, quindi l'82%, avevano un titolo anticorpale post vaccinazione >40, 8 soggetti un titolo di circa 20 e soltanto 1 non ha dato risposta.

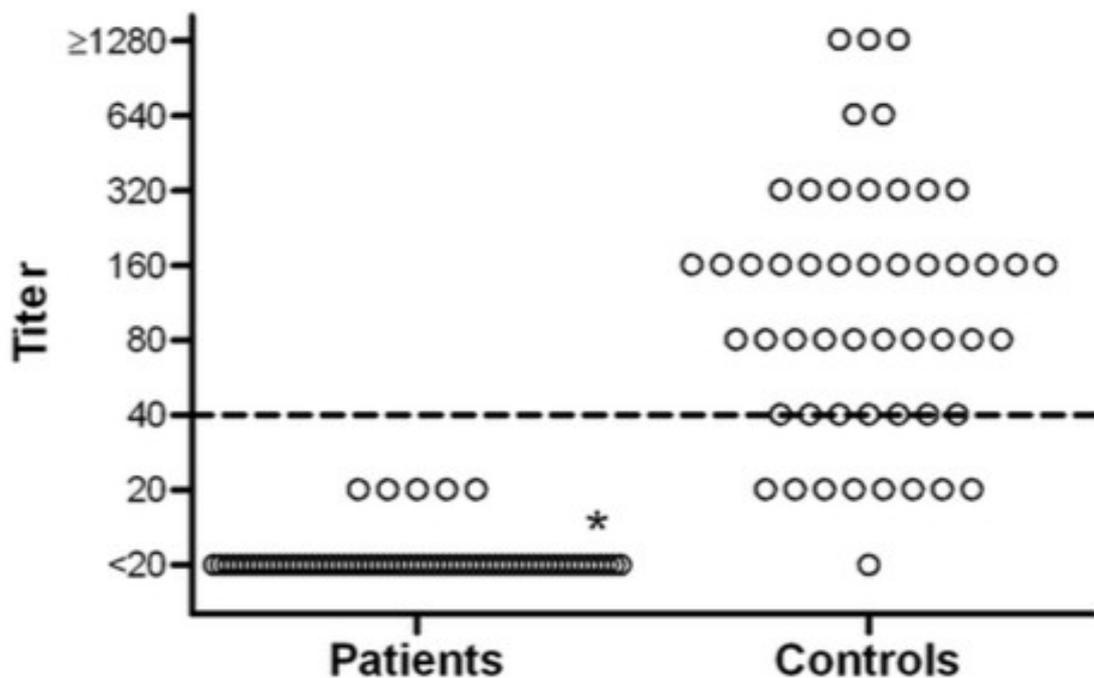


Figura 17: Livelli di anticorpi post vaccinazione nei pazienti e nei controlli.

Il valore medio delle immunoglobuline CD3+, CD4+ e CD8+ era all'interno dei valori normali per tutti i pazienti, solo le CD19+ non sono state rilevabili nella maggior parte dei pazienti.

Questo studio ha dimostrato che i pazienti con linfoma trattati con rituximab in monoterapia o in combinazione con la chemioterapia non riescono ad avere una risposta anticorpale protettiva nei confronti dell'influenza A H1N1 dopo la vaccinazione.

In parallelo, un altro studio condotto dagli stessi ricercatori ha mostrato che il 72% dei malati di cancro sottoposti a chemioterapia senza l'utilizzo di rituximab ottiene l'immunità protettiva dopo la vaccinazione, rispetto all'87% del gruppo di controllo. Ciò è in linea con i risultati di una serie di studi i quali dimostrano che i pazienti con linfoma trattati con chemioterapia senza rituximab sono in grado di rispondere alla vaccinazione antinfluenzale sebbene in misura minore rispetto agli individui sani (Centkowski P. et al., 2007; Rousseau B. et al., 2011; Brydak LB. Et al., 2006).

Questi risultati ed il fatto che nessuno dei pazienti che ha ricevuto rituximab come agente singolo ha raggiunto una siero protezione sufficiente, suggeriscono fortemente che ciò è dovuto alla deplezione delle cellule B da parte del rituximab.

Ovviamente non è possibile escludere che anche lo stato di malattia sia un fattore che contribuisce alla poca risposta alla vaccinazione.

Tuttavia, uno studio precedente ha mostrato che la maggior parte dei pazienti affetti da linfoma che non ha subito alcun tipo di trattamento, risponde alla vaccinazione (Centkowski P. et al., 2007). Un altro fattore di confusione potrebbe essere stato il fatto che l'età media dei pazienti era superiore rispetto a quella dei controlli sani (63 anni contro 47).

In conclusione questo rappresenta uno dei primi studi controllati volti ad indagare le risposte umorali alla vaccinazione antinfluenzale nei pazienti con linfoma trattati con rituximab in monoterapia o associazione. E' quindi

importante sapere che gli individui trattati con rituximab non ottengono una siero protezione come le persone sane, perciò è opportuno adottare altre misure preventive al fine di evitare un possibile contagio, come l'igiene domestica, il lavaggio frequente delle mani, l'astenersi da luoghi chiusi ed affollati per lungo tempo (Salles G. et al., 2011; Van Oers MH. et al., 2010).

10.1 Vaccinazione contro il virus dell'influenza A H1N1 in pazienti in completa remissione dal linfoma non Hodgkin precedentemente trattati con rituximab.

Studi precedenti hanno confermato che i pazienti affetti da linfoma non Hodgkin (NHL) che hanno ricevuto rituximab negli ultimi sei mesi, non sono in grado di rispondere alla vaccinazione contro l'influenza A H1N1 del 2009 (Yri OE. et al., 2011).

Nonostante gli autori concludano che la vaccinazione antinfluenzale non sia attiva in questo contesto, i risultati ottenuti analizzando l'immunogenicità dell'antigene A / California / 7/2009 (H1N1) dimostrano che non sia completamente da generalizzare nel contesto della vaccinazione antinfluenzale stagionale, che comprende antigeni di richiamo. Infatti, anche durante l'esaurimento delle cellule CD20+ a causa dell'uso di rituximab, si mantiene una certa immunità umorale probabilmente grazie alla persistenza di plasmacellule di lunga durata e di alcune sottopopolazione di cellule B, ad esempio le CD27 della milza (Takata T. et al., 2009).

In uno studio tutto italiano, condotto dai ricercatori del dipartimento di medicina clinica di Napoli, è stata valutata la risposta umorale al vaccino MF-59 adiuvato, contenente l'antigene A/California/7/2009(H1N1)pdm09 di nome "Focetria" prodotto dalla Novartis somministrato in due dosi, seguito da una singola dose del vaccino "Fluad", un trivalente MF-59 contro l'influenza

stagionale, in 14 pazienti di età media 65 anni in completa remissione dal linfoma non Hodgkin.

I dati ottenuti, sono stati confrontati con un gruppo di controllo, di 14 volontari sani, di età media 65 anni ai quali è stato somministrato lo stesso vaccino antinfluenzale.

Tutti i partecipanti sono stati vaccinati nel corso della stagione autunnale 2009/2010 ed il tempo intercorso tra le due vaccinazioni è stato di 28 giorni. Il titolo anticorpale è stato misurato con il test dell'inibizione dell'emoagglutinazione prima della vaccinazione e 28 giorni dopo ciascuna vaccinazione. Il tasso di siero protezione è stato considerato positivo se il titolo anticorpale era >40 , cioè se si è ottenuto un aumento di almeno 4 volte il titolo anticorpale dopo la vaccinazione.

Sono stati valutati anche i livelli di immunoglobuline ed è stata effettuata la conta delle cellule B prima della somministrazione del vaccino confrontata poi con quella di 21 volontari sani (Bedognetti D. et al., 2011).

Il tempo trascorso dall'ultima somministrazione di rituximab è stato circa di 33 mesi, con un intervallo da 14 a 78 mesi e concentrazioni di immunoglobuline inferiori al limite del normale sono state evidenziate soltanto in 6 pazienti (43%). I livelli di CD19+ erano più o meno sovrapponibili in tutti i pazienti, ma i livelli delle cellule di memoria CD27+ erano estremamente bassi tra i pazienti rispetto ai volontari sani.

La risposta alla vaccinazione antinfluenzale è stata bassa in tutti i pazienti ed i tassi di sieroprotezione nei pazienti sono stati $>60\%$ per $\frac{3}{4}$ ceppi.

La risposta dei pazienti all'antigene pdm09 del virus H1N1 è stata potenziata dalla seconda dose, mentre i 3 soggetti che non hanno risposto alla prima dose, non hanno risposto neanche alla seconda.

Nella tabella sottostante sono riassunti i livelli di anticorpi ottenuti:

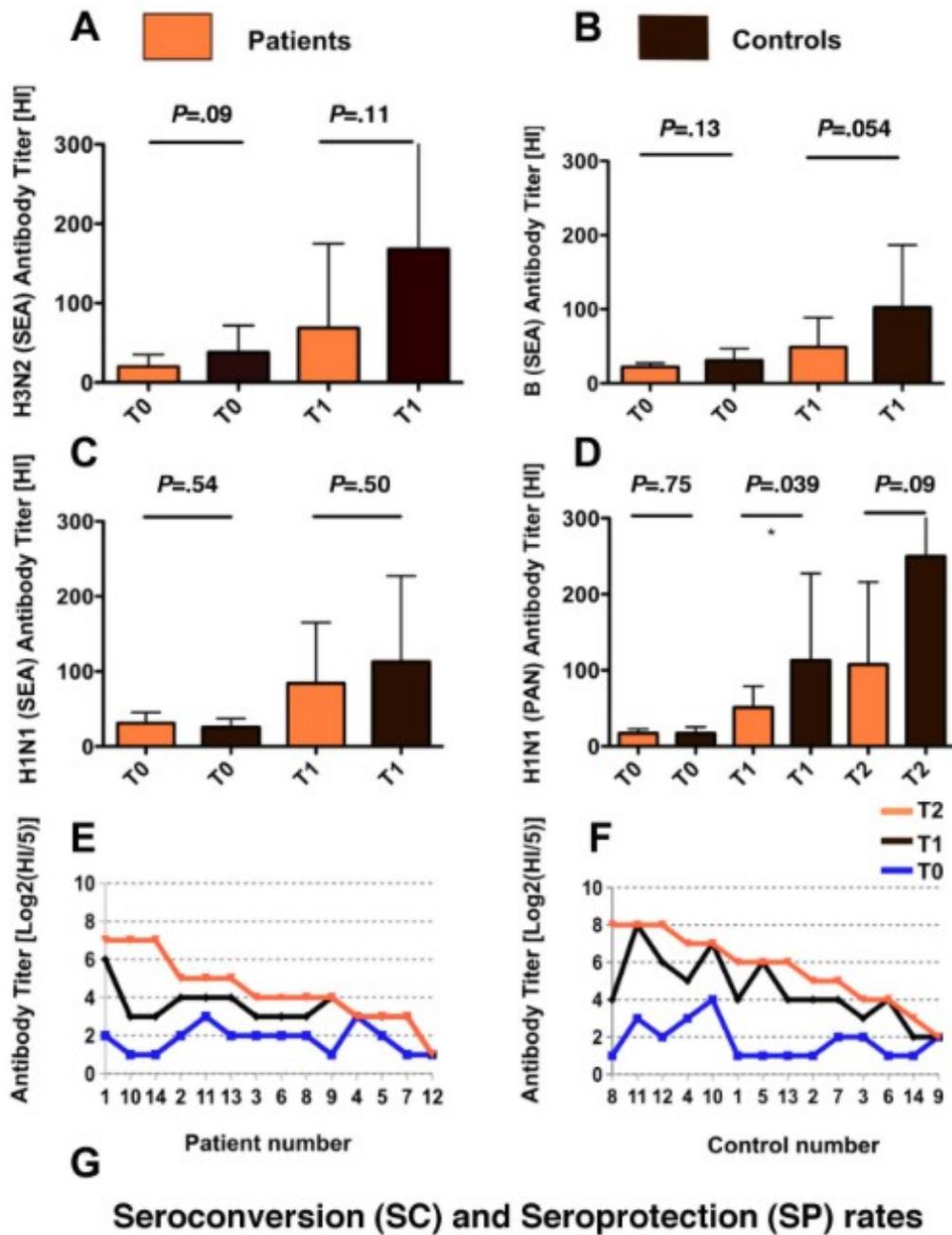


Tabella 4: Livelli di anticorpi ottenuti dopo la vaccinazione

	H3N2 (SEA) T1		H1N1 (SEA) T1		B (SEA) T1		H1N1-09 (PAN) T1		H1N1-09 (PAN) T2	
	SC [N (%)]	SP [N (%)]	SC [N (%)]	SP [N (%)]	SC [N (%)]	SP [N (%)]	SC [N (%)]	SP [N (%)]	SC [N (%)]	SP [N (%)]
Patients (N=14)	6(43)	8(57)	4(29)	11(79)	4(29)	9(64)	5(36)	13(93)	9(64)	13(93)
Controls (N=14)	11(79)	14(100)	7(50)	13(93)	6(43)	12(86)	10(71)	12(86)	11(79)	13(93)
P values	.12	<u>.016</u>	.44	.60	.69	.39	.13	1.00	.67	1.00

Figure 1. Postvaccination antibody titers against seasonal and pandemic influenza antigens are lower in patients compared with controls. (A-D) Bar charts showing geometric mean antibody titers (GMT) against seasonal A/Brisbane/10/2007 (H3N2 SEA) antigen, panel A; B/Brisbane/60/2008 (B SEA) antigen, panel B; A/Brisbane/59/2007 (H1N1 SEA) antigen, panel C; and pandemic A/California/7/2009(H1N1)pdm09 (H1N1 PAN) antigen, panel D. Antibody titers in non-Hodgkin lymphoma (NHL) patients (N = 14 for each bar chart) and controls (N = 14 for each bar chart) were assessed before (T0) after 1 dose (T1) of Fludac (seasonal vaccine; panels A-C) and after 1 and 2 doses (T1 and T2, respectively) of Focetria (pandemic vaccine, panel D). Antibody titers were assessed by hemagglutinin inhibition assay. The obtained antibody titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution of serum inhibiting hemagglutination. Tests were performed in duplicate. Baseline titers were similar between patients and controls. Postvaccination titers were lower in patients compared with controls. Error bars represent the upper 95% confidence intervals of the geometric means (truncated in the last histograms of the panels A and D; exact values: 399 and 534, respectively). P values are from 2-sided Mann-Whitney tests. (E-F) Single-subject dot charts showing antibody titers against A/California/7/2009(H1N1)pdm09 strain at baseline and after 1 and 2 doses of Focetria in patients (N = 14) and controls (N = 14). Data are represented in Log₂ scale. In panel E T1 and T2 curves overlapped from patients no. 9 to patients no. 12. The 3 subjects who did not respond at all to the first administration (patients no. 4 and 12, panel E; and control no. 9, panel F) failed the second administration as well. (G) Seroconversion rate and seroprotection rate after seasonal (SEA) and pandemic vaccine in patients compared with controls (P values are from 2-sided Fisher exact test). Six patients (43%) had been diagnosed with aggressive NHL. Twelve patients (86%) received 1 line of chemotherapy and the same proportion had been treated with CHOP or CHOP-like regimens. Three patients (21%) received fludarabine containing regimens. SC indicates seroconversion; and SP, seroprotection.

Tabella 5: Caratteristiche degli individui che hanno preso parte allo studio

In conclusione, trascorsi dai 14 ai 78 mesi dopo l'ultima somministrazione di rituximab, si nota nei pazienti in remissione dalla malattia una attenuata risposta alla vaccinazione e non completamente soppressa, infatti si sono raggiunti livelli di siero protezione accettabili. I medici, consapevoli di questi dati ottenuti e del fatto che due dosi possono migliorare la risposta anticorpale, dovrebbero consigliare la vaccinazione antinfluenzale a questa tipologia di pazienti, rimanendo comunque informati che quelli completamente refrattari non beneficiano di questa strategia (Bedognetti D. et al., 2011).

CAPITOLO 11: Conclusioni

Una domanda che sorge spontanea nella collettività è se sia opportuno vaccinare i soggetti immunocompromessi. Sappiamo tutti che sono individui maggiormente esposti al rischio di contrarre numerose infezioni, avendo un deficit a livello del sistema immunitario sia come conseguenza della malattia cui sono affetti, sia come conseguenza delle terapie necessarie a cui sono sottoposti. L'elevato rischio non risiede tanto nel fatto che rischiano più delle altre di ammalarsi, quanto che rischiano più complicanze una volta ammalati.

Nel sito del Ministero della Salute è riportato che “La condizione di immunodepressione non costituisce una controindicazione alla somministrazione della vaccinazione antinfluenzale” e l’AIFA riporta che “la vaccinazione antinfluenzale è sicura” ma nonostante queste affermazioni, essendomi soffermata sull’utilizzo dell’anticorpo monoclonale rituximab, mi è sorto un dubbio.

Il rituximab è un anticorpo monoclonale chimerico umano-murino utilizzato in numerose malattie tra cui l’artrite reumatoide ed il linfoma non Hodgkin ed ha come bersaglio molecolare la proteina CD20 presente sulle cellule B.

Per quanto riguarda l’artrite reumatoide, essendo una malattia autoimmune caratterizzata dall’erronea produzione di anticorpi contro i tessuti delle articolazioni, somministrando il rituximab, non si crea un “conflitto di interessi”? Ovvero, da una parte si cerca di immunosopprimere per evitare la formazione di autoanticorpi controllando la malattia, da un’altra parte si vuole stimolare la produzione di anticorpi contro i vaccini influenzali.

Dall’analisi degli studi sopra elencati è emerso un risultato comune a tutti, ovvero che la risposta alla vaccinazione contro l’influenza stagionale è molto più bassa nei soggetti in cura con rituximab, ma comunque presente. L’effetto

protettivo c'è lo stesso, il vaccino è in grado comunque di difendere almeno in parte i malati ma ad una condizione: devono trascorrere almeno 5-6 mesi tra somministrazione di farmaco e vaccinazione, altrimenti non si trae alcun beneficio. Sia l'American College of Rheumatology sia l'European Union League Against Rheumatism affermano che il momento ottimale per somministrare il vaccino è prima di iniziare la terapia con farmaci biologici, per ottimizzare anche le risposte vaccinali più ostiche.

Per quanto riguarda invece gli individui affetti da linfoma non Hodgkin, gli studi hanno evidenziato la mancata risposta alla vaccinazione antinfluenzale contro il virus H1N1 nei soggetti in cura con rituximab rispetto a coloro che seguono altre terapie. Questi risultati suggeriscono che la motivazione risiede nella deplezione delle cellule B ad opera del farmaco, pertanto è auspicabile incentrarsi su altre misure preventive, come l'igiene domestica, il lavaggio delle mani ecc..

Differente è la situazione per coloro che sono in remissione completa dalla malattia, infatti trascorsi almeno 14 mesi dall'ultima somministrazione del farmaco, si nota una risposta anticorpale alla vaccinazione, seppur in misura minore rispetto ai soggetti sani.

La risposta dei pazienti al vaccino è stata potenziata dall'iniezione della seconda dose solo in coloro che avevano dato una risposta positiva già alla prima dose, infatti i soggetti che non hanno risposto alla prima, non lo hanno fatto neanche alla seconda.

La vaccinazione antinfluenzale è quindi a discrezione del medico curante, sulla base della storia clinica di ogni singolo paziente e dopo la valutazione del rapporto costi/benefici.

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK, Lichtman AH and Sozzani S. - *Immunologia Cellulare e Molecolare*. Masson Elsevier, Milano, 2006; pp 585
- Anderson H, Petrie K, Berrisford C, Charlett A, Thatcher N, Zambon M. - Seroconversion after influenza vaccination in patients with lung cancer. *Br J Cancer*. 1999; **80**:219–20
- Arad U, Tzadok S, Amir S, Mandelboim M, Mendelson E, Wigler I, Sarbagil-Maman H, Paran D, Caspi D, Elkayam O. - The cellular immune response to influenza vaccination is preserved in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab. *Vaccine* 2011; **29**:1643-8
- Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*. 2007 Apr;120(4):435-46. Epub 2007 Feb 15.
- Bach J, Lesavre P and Picari M. - *Immunologia*. Marrapese, Roma, 1981; pp 266
- Barker WH. - Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970–78. *Am J Public Health*. 1986; **76**:761–5.
- Barker WH and Mullooly JP - A study of excess mortality during influenza epidemics in the United States, 1968-1976. *Am.J.Epidemiol.* 1985; **115**:479-480

- Bedognetti D, Zoppoli G, Massucco C, et al. - Impaired response to influenza vaccine associated with persistent memory B-cell depletion in non-Hodgkin's lymphoma patients treated with rituximab-containing regimens. *J Immunol* 2011; **186**(10):6044-6055
- Berger RE, Ainfelder HL, Hodes HD Zepp and Hevizi MM - Demonstration of IgA polioantibody in saliva, duodenal fluid and urine. *Nature* 1967; **214**:420-422
- Bingham CO 3rd, Looney RJ, Deodhar A, Halsey N, Greenwald M, Coddling C, et al. - Immunization responses in rheumatoid arthritis patients treated with rituximab: results from a controlled clinical trial. *Arthritis and rheumatism* 2010; **62**:64–74
- Borella L, Webster R. - The immunosuppressive effects of long-term combination chemotherapy in children with acute leukemia in remission. *Cancer Res* 1971; **31**:420–6
- Brydak LB, Guzy J, Starzyk J, Machala M, Gozdz SS. - Humoral immune response after vaccination against influenza in patients with breast cancer. *Support Care Cancer*. 2001; **9**:65–8
- Brydak LB, Machala M, Centkowski P, Warzocha K, Bilinski P. - Humoral response to hemagglutinin components of influenza vaccine in patients with non-Hodgkin malignant lymphoma. *Vaccine* 2006; **24**:6620-6623
- Centers for Disease Control and Prevention X. Updated recommendations for use of meningococcal conjugate vaccines – Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2011; **60**:72–6

Centers for Disease Control and Prevention Y. Update: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) regarding use of CSL seasonal influenza vaccine (Afluria) in the United States during 2010–11. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2010; **59**:989–92

Centkowski P, Brydak L, Machala M, et al. - Immunogenicity of influenza vaccination in patients with non-Hodgkin lymphoma. *J Clin Immunol.* 2007; **27**:339-346

Chalmers A, Scheifele D, Patterson C, Williams D, Weber J, Shuckett R, et al. - Immunization of patients with rheumatoid arthritis against influenza: a study of vaccine safety and immunogenicity. *J Rheumatol* 1994; **21**:1203–6

Chalmers A, Scheifele D, Patterson C, Williams D, Weber J, Shuckett R, Teufel A. - Immunization of patients with rheumatoid arthritis against influenza: a study of vaccine safety and immunogenicity. *J Rheumatol.* 1994; **21**:1203-6

Clutterbuck EA, Lazarus R, Yu LM, Bowman J, Bateman EA, Diggle L, et al. - Pneumococcal conjugate and plain polysaccharide vaccines have divergent effects on antigen-specific B cells. *J. Infect. Dis.* 2012 **205**:1408–16

Committee for Proprietary Medicinal Products (CPMC). - Note for guidance on harmonization of requirements for influenza vaccines. CPMB/BWP/214/96, 1996, Circular No 96-0666;1–22

- Cooksley CD, Avritscher EB, Bekele BN, Rolston KV, Geraci JM, Elting LS.
- Epidemiology and outcomes of serious influenza-related infections in the cancer population. *Cancer* 2005; **104**:618–28
- Czuczman MS, Grillo-Lopez AJ, White CA et al. Treatment of patients with low-grade B cell lymphoma with the combination of chimeric anti CD20 monoclonal antibody and CHOP chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999; **17**:268-76
- De Jong JC, Palache AM, Beyer WE, Rimmelzwaan GF, Boon AC, Osterhaus AD - Haemagglutination-inhibiting antibody to influenza virus. *Dev Biol* 2003; **115**:63–73
- Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O’Fallon WM, Gabriel SE. - Frequency of infection in patients with rheumatoid arthritis compared with controls. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:2287–93
- Doran MF, Crowson CS, Pond GR, O’Fallon WM, Gabriel SE. - Predictors of infection in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2002; **46**:2294–30
- Drossaers-Bakker KW, de Buck M, van Zeben D, Zwinderman AH, Breedveld FC, Hazes JM.- Long-term course and outcome of functional capacity in rheumatoid arthritis: the effect of disease activity and radiologic damage over time. *Arthritis Rheum.* 1999; **42**:1854-60
- Edelman, GM, Benacerraf B, Ovary Z, and Poulik MD - Structural differences among antibodies of different specificities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1961; **47**:1751- 1758

Edelman GM - Antibody structure and molecular immunology. *Science* 1973; **180**:830- 840

Edelman GM, Cunningham BA, Gall WE, Gottlieb PD, Rutishauser U and Waxdal MJ - The covalent structure of an entire gamma-immunoglobulin molecule. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1969; **63**:78-85

Edelman GM, Gall WE, Waxdal MJ and Konigsberg WH - The covalent structure of a human gamma-immunoglobulin. I. Isolation and characterization of the whole molecule, the polypeptide chains, and the tryptic fragments. *Biochemistry.* 1968; **7**:1950-1958

Edwards JC, Szczepanski L, Szechinski J, Filipowicz-Sosnowska A, Emery P, Close DR, et al. - Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; **350**:2572–81

Ferguson M, Risi G, Davis M, Sheldon E, Baron M, Li P, Madariaga M, Fries L, Godeaux O, Vaughn D: Safety and long-term humoral immune response in adults after vaccination with an H1N1 2009 pandemic influenza vaccine with or without AS03 adjuvant. *J Infect Dis* 2012, **205**:733–744

Fiore AE, Shay DK, Haber P, et al. - Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2007. *MMWR Recomm Rep.* 2007; **56**:1–54

Fomin I, Caspi D, Levy V, Varsano N, Shalev Y, Paran D, et al. - Vaccination against influenza in rheumatoid arthritis: the effect of disease modifying drugs, including TNF alpha blockers. *Ann Rheum Dis* 2006; **65**:191–4

- Fomin I, Caspi D, Levy V, Varsano N, Shalev Y, Paran D, Levartovsky D, Litinsky I, Kaufman I, Wigler I, Mendelson E, Elkayam O. - Vaccination against influenza in rheumatoid arthritis: the effect of disease modifying drugs, including TNF alpha blockers. *Ann Rheum Dis.* 2006; **65**:191-4
- Ganz PA, Shanley JD, Cherry JD. Responses of patients with neoplastic diseases to influenza virus vaccine. *Cancer* 1978; **42**:2244–7
- Garcia-Conde J, Conde E, Sierra J et al. - Rituximab (IDEC-C2B8) and CVP chemotherapy in follicular or low-grade B-cell lymphoma after relapse: results after 6 months of follow-up. In *Proceedings of the 36th Annual Meeting of American Society of clinical oncology.* New Orleans, LA, 2000; pp19-26
- Glezen WP, Couch RB. - Interpandemic influenza in the Houston area, 1974–76. *N Engl J Med.* 1978; **298**:587–92
- Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL, Piedra PA, Couch RB. - Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. *JAMA.* 2000; **283**:499–505
- Goldsby RA.- Immunology 3, 5th ed. Freeman, 2003
- Gould, HJ, . Sutton BJ, Bevil AJ, Bevil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D and Smurthwaite L. - The biology of IGE and the basis of allergic disease. *Ann Rev Immunol* 2003; **21**:579-628

Ikematsu H, Nagai H, Kawashima M, Kawakami Y, Tenjinbaru K, Li P, Walravens K, Gillard P, Roman F - Characterization and long-term persistence of immune response following two doses of an AS03A-adjuvanted H1N1 influenza vaccine in healthy Japanese adults. *Hum Vaccin Immunother* 2012, **8**:260–266

Immunization Schedules: Recommended Vaccinations Indicated for Adults Based on Medical and Other Indications. 2013

Jackson LA, Chen WH, Stapleton JT, Dekker CL, Wald A, Brady RC, Edupuganti S, Winokur P, Mulligan MJ, Keyserling HL, Kotloff KL, Roupheal N, Noah DL, Hill H, Wolff MC - Immunogenicity and safety of varying dosages of a monovalent 2009 H1N1 influenza vaccine given with and without AS03 adjuvant system in healthy adults and older persons. *J Infect Dis* 2012; **206**:811–820

Katzung, Masters, Trevor - Farmacologia generale e clinica, 9^a edizione, Piccin 2014

Koshland, ME - The coming of age of the immunoglobulin J chain. *Annu Rev Immunol* 1985; **3**:425-453

Lattanzi B et Ravelli A - Rivista di Immunologia e Allergologia Pediatrica 2010; pp 20-26

Linee guida per la diagnosi e terapia AR, 2014

Loulergue P, Mir O, Alexandre J, Ropert S, Goldwasser F, Launay O - Low influenza vaccination rate among patients receiving chemotherapy for cancer. *Ann Oncol* 2008; **19**:1658

- Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA. IDEC-C2B8 (rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997; **90**:2188-95
- Maloney DG, Smith B, Rose A - Rituximab: mechanism of action and resistance. *Semin Oncol* 2002; **29** (Suppl 2): 2-
- Meliha C Kapetanovic, Lars-Erik Kristensen, Tore Saxne, Teodora Aktas, Andreas Mörner and Pierre Geborek - *Arthritis Res & Ther* 2014, **16**: R2
- Monto AS, Kioumeh F. - The Tecumseh Study of Respiratory Illness. IX. Occurrence of influenza in the community, 1966–1971. *Am J Epidemiol.* 1975; **102**:553–63
- Morrison VA, Oxman MN, Levin MJ, Schmader KE, Guatelli JC, Betts RF, et al. - Safety of zoster vaccine in elderly adults following documented herpes zoster. *J Infect Dis.* 2013; **208**(4):559–63
- Oren S, Mandelboim M, Braun-Moscovici Y, Paran D, Ablin J, Litinsky I, et al. - Vaccination against influenza in patients with rheumatoid arthritis: the effect of rituximab on the humoral response. *Ann Rheum Dis.* 2008; **67**(7):937–41
- Oxman MN, Levin MJ, Johnson GR, Schmader KE, Straus SE, Gelb LD, et al. - A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *New Engl J Med.* 2005; **352**:2271–84
- Perry Lisa M, Winthrop Kevin L, Curtis Jeffrey R - Vaccination for rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep.* 2014; **16**(8):431

- Plosker GL et Figgitt DP - Rituximab: a review of its use in non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukaemia. *Drugs* 2003; **63**(8):803-43
- Pollyea DA, Brown JM, Horning SJ. Utility of influenza vaccination for oncology patients. *J Clin Oncol.* 2010; **28**:2481–90
- Rehnberg M, Brisslert M, Amu S, Zendjanchi K, Hawi G, Bokarewa MI. Vaccination response to protein and carbohydrate antigens in patients with rheumatoid arthritis after rituximab treatment. *Arthr Res & Ther.* 2010; **12**(3):R111
- Riesbeck, K and Nordstrom T - Structure and immunological action of the human pathogen *Moraxella catarrhalis* IgD-binding protein. *Crit.Rev.Immunol.* 2006; **26**:353-376
- Risto S. et al. Rituximab. A Review of its Use in Non-Hodgkin's Lymphoma and Chronic Lymphocytic Leukaemia. *Drugs.* 2006;66:791-820.
- Roman F, Vaman T, Kafeja F, Hanon E, Van Damme P - AS03(A)-Adjuvanted influenza A (H1N1) 2009 vaccine for adults up to 85 years of age. *Clin Infect Dis* 2010, **51**:668–677
- Rousseau B, Loulergue P, Mir O, et al. - Immunogenicity and safety of the influenza A H1N1v 2009 vaccine in cancer patients treated with cytotoxic chemotherapy and/or targeted therapy: the VACANCE study *Ann Oncol.* 2012; **23**(2):450-7

- Salles G, Seymour JF, Offner F, et al. - Rituximab maintenance for 2 years in patients with high tumour burden follicular lymphoma responding to rituximab plus chemotherapy (PRIMA): a phase 3, randomised controlled trial. *Lancet*. 2011; **377**(9759):42-51
- Schamel WW and Reth M - Monomeric and oligomeric complexes of the B cell antigen receptor. *Immunity*. 2000; **13**:5-14
- Schmader KE, Oxman MN, Levin MJ, Johnson G, Betts R, et al. - Persistence of the efficacy of zoster vaccine in the shingles prevention study and the short-term persistence substudy. *Clin Infect Dis* 2012; **55**(10):1320–8
- Shehata MA, Karim NA - Influenza vaccination in cancer patients undergoing systemic therapy. *Clin Med Insights Oncol*. 2014; **8**:57-64
- Slifka MK, Antia R, Whitmire JK, Ahmed R. - Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity* 1998; **8**:363–72
- Smith NM, Bresee JS, Shay DK, Uyeki TM, Cox NJ, Strikas RA. - Prevention and control of influenza: Recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *National Center for Immunization and Respiratory Diseases (proposed)*. *MMWR Recomm Rep* 2006; **55**(RR-10):1–42
- Spandrio L, *Biochimica Clinica: Principi e Applicazioni*, Padova, Piccin Editore, 1978.

Sommer AL, Wachel BK, Smith JA. - Evaluation of vaccine dosing in patients with solid tumors receiving myelosuppressive chemotherapy. *J Oncol Pharm Pract*. 2006; **12**:143–54

Steinherz PG, Brown AE, Gross PA, et al. Influenza immunization of children with neoplastic diseases. *Cancer*. 1980; **45**:750–6

Swedish National Board of Health and Welfare (Socialstyrelsen): Recommendation for vaccination against novel pandemic influenza A (H1N1) 2009. Available at: <http://www.socialstyrelsen.se/Lists/Artikelkatalog/Attachments/18398/2011-8-4.pdf>.

Takata T, Suzumiya J, Ishikawa T, Takamatsu Y, Ikematsu H, Tamura K. Attenuated antibody reaction for the primary antigen but not for the recall antigen of influenza vaccination in patients with non-Hodgkin B-cell lymphoma after the administration of rituximab-CHOP. *J Clin Exp Hematop* 2009; **49**(1):9-13

The Influenza A(H1N1) 2009 Pandemic in Sweden, 2009–2010. A Report from the *Swedish WHO National Influenza Centre*. Available at: <http://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/12852/the-influenza-a-h1n1-2009-pandemic-in-sweden-2009-2010.pdf>.

Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, et al. - Mortality associated within fluenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA*. 2003; **289**:179–86

- van Assen S, Holvast A, Benne CA, Posthumus MD, van Leeuwen MA, Voskuyl AE, et al. - Humoral responses after influenza vaccination are severely reduced in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Arthritis and rheumatism*. 2010; **62**(1):75–81
- van Oers MH, Van GM, Giurgea L, et al. - Rituximab maintenance treatment of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin's lymphoma: long-term outcome of the EORTC 20981 phase III randomized intergroup study. *J Clin Oncol*. 2010; **28**(17): 2853-2858
- Varaldo R, et Gobbi M. - Caratteristiche farmacologiche e attività clinica dell'anticorpo monoclonale anti-CD20 umanizzato rituximab. *Ann Ital Med Int* 2003; **18**: 182-187
- Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B - The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009; **22**:1041–1050
- Yri OE, Torfoss D, Hungnes O, et al. Rituximab blocks protective serologic response to influenza A (H1N1) 2009 vaccination in lymphoma patients during or within 6 months after treatment. *Blood* 2011; **118**(26):6769-6771
- Zhang, M, Srivastava G, and Lu L - . The pre-B cell receptor and its function during B cell development. *Cell Mol Immunol*. 2004; 1:89-94

SITOGRAFIA:

<http://www.bloodjournal.org/content/118/26/6769.full.html>

<http://www.agenziafarmaco.gov.it/>

<http://www.cancer.org/>

www.reumatologia.org

www.ema.europa.eu

RINGRAZIAMENTI

Tante parole non sempre rendono interessanti i discorsi, a volte ne basta una
ma di significato: GRAZIE !
Grazie al Prof. Stefano Fogli per la gentilezza, disponibilità e professionalità,
qualità sempre più rare da trovare in un professore. Semplice ma conciso, in
grado di insegnare ad essere.

Un enorme grazie anche a coloro che hanno contribuito in tutte le forme
possibili a far si che sia arrivata a questo mio secondo traguardo.

Con affetto,

Sara