

Dobór skutecznej szczepionki – rola alergenów głównych

Prof. dr hab. n. med.
Rafał Pawliczak

Zakład Immunopatologii Katedra
Immunologii
Wydział Kształcenia
Poddyplomowego i Nauk
Biomedycznych UM w Łodzi

VII OGÓLNOPOLSKIE SYMPOZJUM „IMMUNOTERAPIA
ALERGENOWA”

S U M M A R Y

Numerous allergen and allergoid preparations are used in specific allergen immunotherapy. In real life it may be difficult to assess differences between various allergy vaccines based on drug labels and data supplied by manufacturers. Vaccine standardization is another issue, because every manufacturer utilizes in-house units. Many allergists make their choices based on subjective experience. This review might be helpful in understanding meanders of standardization and points out major issues important in vaccine selection.

Alergołodzy mają dziś dostęp do bardzo wielu szczepionek i wyciągów alergenowych. Lekarzom praktykom, korzystającym zwykle z informacji pochodzących z przemysłu farmaceutycznego często jest trudno ocenić różnice pomiędzy poszczególnymi preparatami stosowanymi w immunoterapii swoistej. Podobnie większość lekarzy ma zasadnicze kłopoty z porównaniem jednostek standaryzacji szczepionek oraz ilości alergenu głównego, który się w nich znajduje.

Część informacji na ten temat otrzymujemy od producentów, część pochodzi z literatury, a bardzo często w wyborze szczepionki kierujemy się subiektywnym doświadczeniem. Niniejszy artykuł jest próbą wskazania elementów, które mogą być ważne podczas doboru preparatu do immunoterapii swoistej.

Pawliczak R.: Dobór skutecznej szczepionki – rola alergenów głównych. *Alergia*, 2008, 1: 10-13

Wstęp

Skuteczność immunoterapii swoistej w astmie i alergicznym nieżycie nosa jest dobrze udokumentowana zarówno dzięki kontrolowanym badaniom klinicznym jak i danym uzyskanym z dużych meta-analiz (1). Podobnie mechanizm immunoterapii swoistej związany z hamowaniem aktywności limfocytów Th2 i zwiększeniem aktywności limfocytów Th1 nie budzi dziś wątpliwości (2-4). Jedną z komórek, które spełniają zasadniczą rolę w tym procesie są epitopowo-swoiste limfocyty T regulatorowe (TRegs), które wytwarzają szereg cytokin (m.in. IL-10 i TGF- β) odpowiedzialnych za wywoływanie zjawiska obwodowej tolerancji limfocytów (4). W procesie tym zaangażowanych jest także szereg cząsteczek znajdujących się na powierzchni limfocytów takich jak CTLA-4, PD-1,

czy receptor histaminowy H₂(2) . Pomimo długoletniej historii immunoterapii swoistej do dziś nie ma dobrze udokumentowanych badań porównujących skuteczność mieszanek wyciągów alergenowych z preparatami zawierającymi jeden alergen. Pojawiło się ostatnio kilka badań in vitro porównujących wyciągi alergenowe i szczepionki zawierające modyfikowane chemicznie alergeny (alergoidy).

Każdy z producentów szczepionek stosuje własne jednostki, w których wyraża siłę wyciągu alergenowego. Standaryzacja szczepionek stosowanych w immunoterapii, mimo oczywistej potrzeby jest ciągle przedmiotem dyskusji.

Większość alergologów, na co dzień stosujących immunoterapię swoistą wydaje się być zagubiona w gąszczu pojęć i jednostek. Niniejszy artykuł jest próbą przedstawienia możliwości przed którymi staje dziś lekarz alergolog wypisujący receptę na szczepionkę a także przedstawia zasadnicze elementy związane ze standaryzacją szczepionek.

Historia wyciągów alergenowych

Immunoterapia alergenowa ma długą historię. Pierwszy raz została zastosowana w 1911 roku przez Noona, który także też po raz pierwszy wprowadził próby jej standaryzacji.

Noon arbitralnie ustalił, że 1 g pyłku to milion jednostek Noona. Tak więc 1 g pyłku poddany ekstrakcji w 10 ml płynu ekstrakcyjnego zawiera 100 000 jednostek Noona/ml.

Odkrycie IgE w 1967 spowodowało wprowadzenie metod analitycznych do standaryzacji wyciągów alergenowych. W połowie lat siedemdziesiątych powstał duński program standaryzacji alergenów, którego skutkiem było opracowanie Nordic Guidelines, które były pierwszym dokumentem ustalającym zasady standaryzacji. W latach dziewięćdziesiątych podobne zasady zostały przyjęte przez Światową Organizację Zdrowia (5).

W Stanach Zjednoczonych funkcjonuje inny model standaryzacji, gdzie agencja regulatorowa (FDA) jest źródłem standardów alergenowych dla wszystkich producentów, którzy tworzą wewnętrzne standardy w oparciu o porównanie testów skórnych ze standardami FDA (6).

Dlaczego szczepionki wymagają standaryzacji?

Szczepionki stosowane w immunoterapii swoistej powstają z naturalnych surowców. Naturalne pyłki charakteryzują się różną zawartością alergenu głównego.

I tak gram pyłku ambrozji zawierał w 1980 roku od 586 do 788 mikrograma Amb a1, a w roku 1992 zawierał zaledwie 254-365 µg Amb a 1, a więc tylko połowę.

Zawartość alergenów (w tym alergenu głównego) w materiale pochodzącym z jednego źródła może się istotnie różnić w zależności od sezonu. Materiał biologiczny z którego otrzymujemy szczepionki i wyciągi do testów skórnych jest mieszaniną rozmaitych alergenów. Ilość alergenu głównego (przeciwko któremu przeciwciała wykryto testem skórnym lub metodami diagnostyki in vitro) może różnić się także pomiędzy seriami surowców. Zależy to od źródła surowców, czasu produkcji, metody pozyskania itp. Warto pamiętać, że alergeny są białkami, które przechowywane w temperaturze pokojowej są szybko rozkładane przez enzymy proteolityczne. W procesie produkcji uzyskuje się szczepionkę, w której zawartość alergenu głównego lub biologiczna skuteczność powinna być możliwie zbliżona pomiędzy różnymi opakowaniami tej samej szczepionki.

Ponadto większość szczepionek i wyciągów alergenowych charakteryzuje się koniecznością stosowania kilku rozcieńczeń tej samej szczepionki, które są podawane kolejno podczas dochodzenia do dawki podtrzymującej. Pewność, że stosujemy

określone ilości alergenu głównego lub roztwór wywołujący przewidywalny skutek biologiczny może tylko zostać uzyskana w wyniku standaryzacji szczepionek. Najczęstsze działania niepożądane immunoterapii swoistej powstają podczas zmiany stężenia stosowanego preparatu lub podczas podania dawki z nowego opakowania szczepionki (7). Istnieją dowody pochodzące z niewielkich badań obserwacyjnych wskazujące na istotne znaczenie pochodzenia szczepionki oraz standaryzacji i kontroli jakości preparatu we wpływie na liczbę działań niepożądanych występujących podczas immunoterapii swoistej (8, 9). Różnice te wskazują wyraźnie na konieczność zwrócenia uwagi na standaryzację szczepionek.

Skuteczność swoistej immunoterapii w dużym stopniu zależy od kumulacyjnej dawki alergenu, który otrzymuje pacjent w czasie odczulania. Standaryzacja szczepionki zapewnia więc nie tylko bezpieczeństwo ale także skuteczność odczulania.

Od początku lat osiemdziesiątych Międzynarodowa Unia Towarzystw Immunologicznych (IUIS – International Union of Immunological Societies) wspólnie ze Światową Organizacją Zdrowia stworzyły standardy alergenowe dla brzozy, tymotki, ambrozji, roztocza i psa. Ostatnio IUIS wraz z WHO oraz Unią Europejską stworzyły projekt mający na celu otrzymanie standaryzowanych materiałów, które mogą zostać użyte do porównania i standaryzacji szczepionek alergenowych. Standardy te nigdy nie weszły w życie i w praktyce niewielu producentów szczepionek w Europie oficjalnie informuje o ich stosowaniu.

Obecnie pod egidą Unii Europejskiej wspólnie z instytutami naukowymi i przemysłem farmaceutycznym prowadzony jest projekt CREATE, jego celem jest rozwój certyfikowanych, referencyjnych materiałów składających się z naturalnych oczyszczonych lub rekombinowanych alergenów głównych oraz walidacja istniejących metod stosowanych do pomiarów alergenów głównych (10).

Standaryzacja szczepionek alergenowych jest wykonywana przez każdego producenta indywidualnie dzięki zastosowaniu wewnętrznych standardów (IHRP – in house reference preparation).

Standaryzacja ta odbywa się na dwóch drogach:

- in vivo np. przez porównanie reakcji na serię szczepionki do reakcji na standard wewnętrzny przy użyciu testów skórnych u wybranej odpowiednio licznej grupie pacjentów lub ochotników
- ocenę stężenia alergenu głównego w szczepionce w masowych jednostkach absolutnych (np. mikrogramach / ml), in vitro.

Zasady standaryzacji szczepionek między seriami:

- identyczny skład alergenowy
- stałe stężenia poszczególnych alergenów głównych
- stała siła alergenowa szczepionek

Stężenie alergenu głównego

Spełnienie wszystkich trzech warunków jest niezbędne, nie tylko ze względu na konieczność zapewnienia bezpieczeństwa i skuteczności immunoterapii swoistej. Szeroko akceptowanym jest fakt, że dawka podtrzymująca alergenu głównego powinna wynosić od 5 do 20 mikrogramów, bez względu na to jaki rodzaj alergenu jest stosowany w szczepionce (6, 11).

Istnieje szereg dobrze udokumentowanych badań sugerujących ten zakres dawki podtrzymującej dla chwastów, traw, roztoczy, i alergenu kota. Stosowanie takiej dawki skutecznie zmniejsza skalę objawów klinicznych. Jak widać zakres dawki podtrzymującej jest bardzo szeroki. Badania ankietowe w środowisku praktykujących alergologów USA wykazały, że dawki podtrzymujące stosowane w praktyce i zalecane przez lekarzy wahają się od kilkudziesięciu BAU do kilku tysięcy BAU. Najniższe dawki amerykańscy alergolodzy stosują w czasie odczulania szczepionkami zwierającymi alergen kota, a najwyższe w przypadku tymotki. Dlatego też, stężenie alergenu głównego jest ważną informacją i powinno być mierzone w każdej serii szczepionek. Czy stężenie alergenu głównego jest najważniejszym elementem decydującym o skuteczności szczepionki lub wyciągu alergenowego? Wydaje się, że w dużym stopniu tak, warto jednak pamiętać, że pewną rolę w immunoterapii spełniają również pozostałe alergeny mniejsze wchodzące w skład wysięgu alergenowego.

Samo stężenie alergenu głównego nie może być porównywane pomiędzy preparatami pochodzącymi od różnych producentów ponieważ stosują oni różne przeciwciała (a często także różne systemy wskaźnikowe).

Wydaje się, że najbliższej rzeczywistości znajdują się porównania wykorzystujące jednostki biologiczne. Standardy Europejskiej Akademii Astmy, Alergii i Immunologii Klinicznej wyraźnie wskazują na celowe podawanie stężenia alergenu głównego w jednostkach masy - $\mu\text{g/ml}$, wskazują jednak na fakt, że porównanie oznakowania różnych producentów może być niemożliwe z powodu różnic w testach i technikach pomiaru stężenia alergenów głównych (11).

Siła alergenowa szczepionki (ang. allergen vaccine potency)

Parametr ten oznacza siłę oddziaływań pomiędzy wszystkimi epitopami alergenów zawartych w szczepionce a przeciwciałami klasy IgE. Pomiar odbywa się testem zahamowania RAST, testami immunoenzymatycznymi lub testem uwalniania histaminy z bazofilów. Ten ostatni test, ze względu na konieczność dostępu do świeżej krwi pochodzącej od pacjentów atopowych oraz trudności standaryzacyjne jest rzadko stosowany.

- Główną metodą oceniającą siłę alergenową szczepionki in vivo jest wykonanie testów skórnych w wybranej grupie ochotników, co po porównaniu średnich średnic bąbla pomiędzy testowanymi preparatami lub porównaniu ich od bąbla uzyskanego po podaniu histaminy pozwala na ocenę siły alergenowej szczepionki.
- Metoda standaryzacji ID50EAL, polega na ocenie kolejnych stężeń wyciągu alergenowego i ustaleniu stężenia, które powoduje bąbel o sumie średnic wynoszącej 50 mm po podaniu śródskórnym (12). Badanie przeprowadza się metodą trzykrotnych rozcieńczeń roztworu alergenowego podając śródskórną objętość 0,05 ml 15-20 uczulonym pacjentom. Średnie stężenie powodujące rumień o sumie średnic 50 mm arbitralnie otrzymuje stężenie 100 000 BAU/ml (bioequivalent allergy unit).
- Inną metodą (Nordic Metod) jest jednostka HEP (Histamine equivalent by prick testing) – roztwór alergenowy powodujący bąbel o identycznej średnicy jak bąbel wywołany przez reakcję na siarczan histaminy w stężeniu 10 mg/ml, ma 1000 BAU (biological unit; jednostek biologicznych).
- Amerykańska agencja leków i żywności (FDA) zaleca stosowanie jednostek BAU. Metody biologiczne oceny siły alergenowej roztworów szczepionek są trudne, nie mniej jednak są prawdopodobnie najlepszą metodą standaryzacji szczepionek. Metody in vitro mogą zaledwie być uzupełnieniem metod biologicznych. Spośród nich

immunoblotting, elektroforeza dwuwymiarowa oraz RAST i ELISA znajdują zastosowanie w kontroli jakości szczepionek i wyciągów alergenowych.

Modyfikacje szczepionek

Zasadniczym problemem spotykanym podczas stosowania immunoterapii w praktyce klinicznej są objawy niepożądane miejscowe i ogólne.

Warto przypomnieć, że średnia częstość występowania objawów niepożądanych wynosi jedno zdarzenie na 14 iniekcji szczepionki a zgon w przebiegu immunoterapii swoistej występuje z częstością 1 na 2 540 000 podanych dawek .

Większość działań niepożądanych pojawia się w ciągu pierwszych trzydziestu minut po otrzymaniu zastrzyku, zwykle są to objawy miejscowe w postaci jest to rumienia, obrzęku, świądu skóry. Skuteczna immunoterapia swoista jest związana ze zmniejszeniem wytwarzania sIgE, zwiększeniem powstawania IgG (prawdopodobnie IgG4) oraz poprawą kliniczną, która jest najważniejszym miernikiem skuteczności immunoterapii swoistej. Większość miejscowych i lokalnych działań niepożądanych immunoterapii jest zależnych od działania przeciwciał IgE. Jak tego uniknąć? Producenci szczepionek powszechnie stosują kilka sposobów. Jednym z nich jest niezwykle rygorystyczna standaryzacja (zwykle dzięki zastosowaniu jednostek biologicznych) oraz stosowanie powolnego wzrostu stosowanych stężeń i końcowej dawki alergenu głównego. Innym jest stosowanie modyfikacji chemicznej alergenu. Wreszcie jeszcze inną strategią postępowania jest stosowanie odczulania klasterowego lub technik typu rush lub ultra-rush. Ostatnio, techniki biologii molekularnej pozwoliły na uzyskanie alergenów rekombinowanych, których budowa chemiczna może być modyfikowana odpowiednim doбором składu aminokwasowego.

Modyfikacja struktury trzeciorzędowej alergenu dokonywana przez zastosowanie formaldehydu została wprowadzona do alergologii na początku lat siedemdziesiątych przez Marsha i współpracowników (13, 14). Tak otrzymane substancje noszą nazwę alergoidów. Mają wysoką masę cząsteczkową. Obecnie zamiast formaldehydu stosuje się zwykle aldehyd glutarowy. Taka modyfikacja powinna odsłaniać determinanty łączących się z receptorami limfocytów a zmniejszać dostępność epitopów oddziałujących z IgE. W związku z powyższym alergoid miałby potencjalnie w większym stopniu właściwości wpływające na modyfikowanie funkcji limfocytów T, a w mniejszym stopniu w porównaniu z wyciągami alergenowymi reagowałby z IgE. Powinno to zwiększać bezpieczeństwo immunoterapii alergoidami. Nie ma dużych badań klinicznych porównujących bezpieczeństwo i skuteczność alergoidów i wyciągów alergenowych. Analiza bazy danych PubMed wskazuje jednak na fakt, że większość opublikowanych randomizowanych i zaślepionych badań klinicznych dotyczących immunoterapii swoistej dotyczy alergenów, a nie alergoidów (relacja 10:1).

Dane pochodzące z niemieckiego Paul-Ehrlich Institute wskazują jednoznacznie na podobną liczbę działań niepożądanych w przypadku alergoidów i wyciągów alergenowych na przestrzeni lat obserwacji 1991-2000.

Tak więc dostępne w chwili obecnej badania wskazują, że stosowanie alergoidów może nie być bardziej bezpieczne niż wyciągów alergenowych. Wydaje się także, że modyfikacja chemiczna alergenów może niekiedy prowadzić nie tylko do pożądanego zmniejszenia alergenowości ale także do skutkującego zmniejszeniem skuteczności działania spadku immunogenności (15). Zmiana organizacji przestrzennej alergenu podczas modyfikacji chemicznej może także utrudniać lub uniemożliwiać określenie stężenia alergenu głównego w preparacie stosowanym w immunoterapii, co utrudnia

ocenę dawki kumulacyjnej alergenu. Dane, że zjawisko to ma znaczenie kliniczne pochodzą z badań kontrolowanych (16, 17). Ważną rzeczą jest podkreślenie, że większość współcześnie stosowanych technik służących do standaryzacji alergenów nie może zostać bezpośrednio zastosowana do szczepionek zawierających alergoidy. Dla szczepionek takich zaleca się oceny pośrednie oraz analizę składu alergenowego na poszczególnych etapach produkcji. Wskazane byłoby wykonanie dużych badań klinicznych, które bezpośrednio (head-to-head) porównywałyby skuteczność i bezpieczeństwo stosowania alergenów i alergoidów.

Alergeny rekombinowane w immunoterapii

Z praktyki klinicznej wynika, że większość pacjentów wytwarza przeciwciała klasy IgE skierowane tylko przeciwko ograniczonej liczbie alergenów, zwanych alergenami głównymi (ang. major allergens) wyniknęła koncepcja otrzymania alergenów głównych metodami biologii molekularnej i zastosowania ich w diagnostyce i terapii.

Pierwszym rekombinowanym alergenem był Der p1 otrzymany przez Thomasa i wsp. w komórkach bakteryjnych (18). Obecnie istnieje cały szereg szczepionek alergenowych opartych na alergenach rekombinowanych ocenianych w badaniach klinicznych (19). W większości przypadków struktura alergenów rekombinowanych stosowanych w tych szczepionkach nie różni się istotnie od występujących alergenów naturze. Potencjalnie istnienie alergenów rekombinowanych umożliwia diagnostykę epitopową pacjentów oraz dobór szczepionki zawierającej wyłącznie te epitopy, przeciwko którym pacjent wytwarza swoiste IgE (20). Szczepionki te znajdują się w fazie badań klinicznych i brak jest dotychczas nawet wstępnych badań oceniających ich przewagę nad wyciągami alergenowymi czy alergoidami. Możliwości otrzymywania alergenów rekombinowanych pozwalają na praktycznie dowolne modyfikacje składu aminokwasowego tych cząsteczek. Tak więc stanowią prostą drogę do otrzymywania alergenów zawierających wyłącznie epitopy wiążące się z receptorami limfocytów T i nie wchodzące w interakcje z IgE. Potencjalnie więc pozwala to na uzyskanie szczepionek alergenowych charakteryzujących się dużym bezpieczeństwem i skutecznością porównywalną do wyciągów alergenowych czy alergoidów. W chwili obecnej zasadniczym elementem ograniczającym zastosowanie rekombinowanych alergenów w praktyce jest ich wysoka cena, która zapewne zmniejszy się wraz z rozpowszechnieniem ich zastosowań.

Podsumowanie

Alergolog ma dziś przed sobą szeroki wybór preparatów do immunoterapii swoistej. Wydaje się, że najważniejszym elementem, który powinien decydować o wyborze szczepionki jest jej jakość. Standaryzacja szczepionek a szczególnie pewność tego samego składu alergenowego i takiej samej aktywności biologicznej powinna być zasadniczym elementem decydującym o wyborze preparatu. Od standaryzacji szczepionki zależy jej bezpieczeństwo i skuteczność.

Piśmiennictwo:

1. Calderon MA, Alves B, Jacobson M, Hurwitz B, Sheikh A, Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. Cochrane Database Syst Rev 2007;CD001936.
2. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Mechanisms of allergen specific immunotherapy--T-cell tolerance and more. Allergy 2006; 61:796-807.
3. Akdis CA, Blaser K, Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. Chem Immunol Allergy 2006; 91:195-203.
4. Jutel M, Akdis M, Blaser K, Akdis CA. Are regulatory T cells the target of venom immunotherapy? Curr Opin Allergy Clin Immunol 2005; 5:365-9.
5. Bousquet J, Lockey R, Malling HJ. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. J Allergy Clin Immunol 1998; 102:558-62.
6. Allergen immunotherapy: a practice parameter second update. J Allergy Clin Immunol 2007; 120:S25-85.
7. Rezvani M, Bernstein DI. Anaphylactic reactions during immunotherapy. Immunol Allergy Clin North Am 2007; 27:295-307.
8. Nettis E, Giordano D, Pannofino A, Ferrannini A, Tursi A. Safety of inhalant allergen immunotherapy with mass units-standardized extracts. Clin Exp Allergy 2002; 32:1745-9.
9. Greineder DK. Risk management in allergen immunotherapy. J Allergy Clin Immunol 1996; 98:S330-4.
10. van Ree R. The CREATE project: a new beginning of allergen standardization based on mass units of major allergens. Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M 2003;70-3; discussion 4-5.
11. Alvarez-Cuesta E, Bousquet J, Canonica GW, Durham SR, Malling HJ, Valovirta E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. Allergy 2006; 61 Suppl 82:1-20.
12. Turkeltaub PC. Biological standardization of allergenic extracts. Allergol Immunopathol (Madr) 1989; 17:53-65.
13. Wheeler AW, Jenkins PM, Moran DM. Chemical modification of crude timothy grass pollen extract. II. Class and specificity of antibodies induced by chemically modified timothy grass pollen extract. Int Arch Allergy Appl Immunol 1976; 50:709-28.
14. Moran DM, Wheeler AW. Chemical modification of crude timothy grass pollen extract. I. Antigenicity and immunogenicity changes following amino group modification. Int Arch Allergy Appl Immunol 1976; 50:693-708.
15. Lund

L, Henmar H, Wurtzen PA, Lund G, Hjortskov N, Larsen JN. Comparison of allergenicity and immunogenicity of an intact allergen vaccine and commercially available allergoid products for birch pollen immunotherapy. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:564-71. 16. Passalacqua G, Albano M, Fregonese L, Riccio A, Pronzato C, Mela GS, et al. Randomised controlled trial of local allergoid immunotherapy on allergic inflammation in mite-induced rhinoconjunctivitis. *Lancet* 1998; 351:629-32. 17. Pastorello EA, Pravettoni V, Incorvaia C, Mambretti M, Franck E, Wahl R, et al. Clinical and immunological effects of immunotherapy with alum-absorbed grass allergoid in grass-pollen-induced hay fever. *Allergy* 1992; 47:281-90. 18. Thomas WR, Smith W, Hales BJ, Carter MD, Bennett BJ, Shen HD, et al. Recombinant house dust mite allergens. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M* 1997:87-94; discussion -6. 19. Jutel M, Jaeger L, Suck R, Meyer H, Fiebig H, Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:608-13. 20. Thomas WR, Hales BJ, Smith WA. Genetically engineered vaccines. *Curr Allergy Asthma Rep* 2005; 5:197-203.

[Zamknij](#)[Drukuj](#)