

Rekombinantní alergeny

Vojtěch Thon

Ústav klinické imunologie a alergologie
LF MU a FN u sv. Anny v Brně

Univerzitní centrum pro alergologii a klinickou imunologii

Pylové alergený - nové horizonty:
Rekombinantní alergený
v diagnostice a terapii alergických onemocnění

- Uvedení do problému a vývoj poznání rekombinantních alergenů
- Imunologické principy využití rekombinantních proteinů
- Vývojové hledisko - homologie - zkřížená reaktivita alergenů
- Diagnostické a terapeutické možnosti využití rekombinantních alergenů; specifická imunoterapie; regulace
- Epidemiologie, shrnutí problematiky

Přirozené a rekombinantní alergen

- Alergeny získané z přirozených zdrojů využíváme v medicíně k diagnostice i terapii od konce 19. století.
- V r. 1880 britský alergolog Charles Blackley (sám alergik) podává zprávu o využití alergenových extraktů k expozičním testům.

Blackley Ch. Hay Fever: Its Causes, Treatment and Effective Prevention. London, Bailliere, 1880.

ALERGIE

„hypererge Frühreaktion“
„allos“ + „ergein“ = Allergie

von Pirquet C, Schick B:

*Überempfindlichkeit und beschleunigte
Reaktion*

(Münch med Wschr 1906; 2)

Clemens von Pirquet vlastní experiment, 27. 7. 1905

1907

*“Klinische Studien
über Vakzination
und vakzinale
Allergie”*



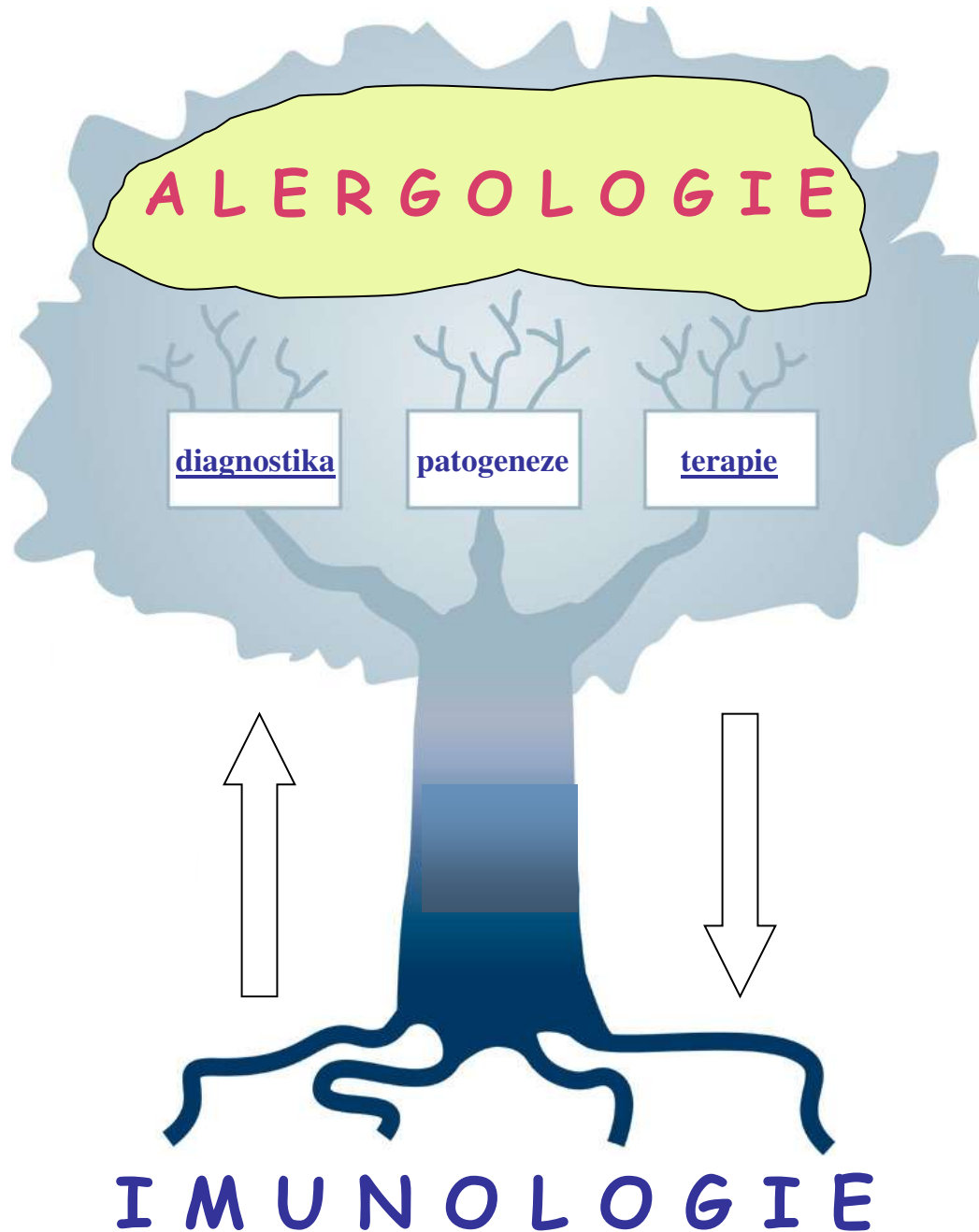
ALERGOLOGIE

diagnostika

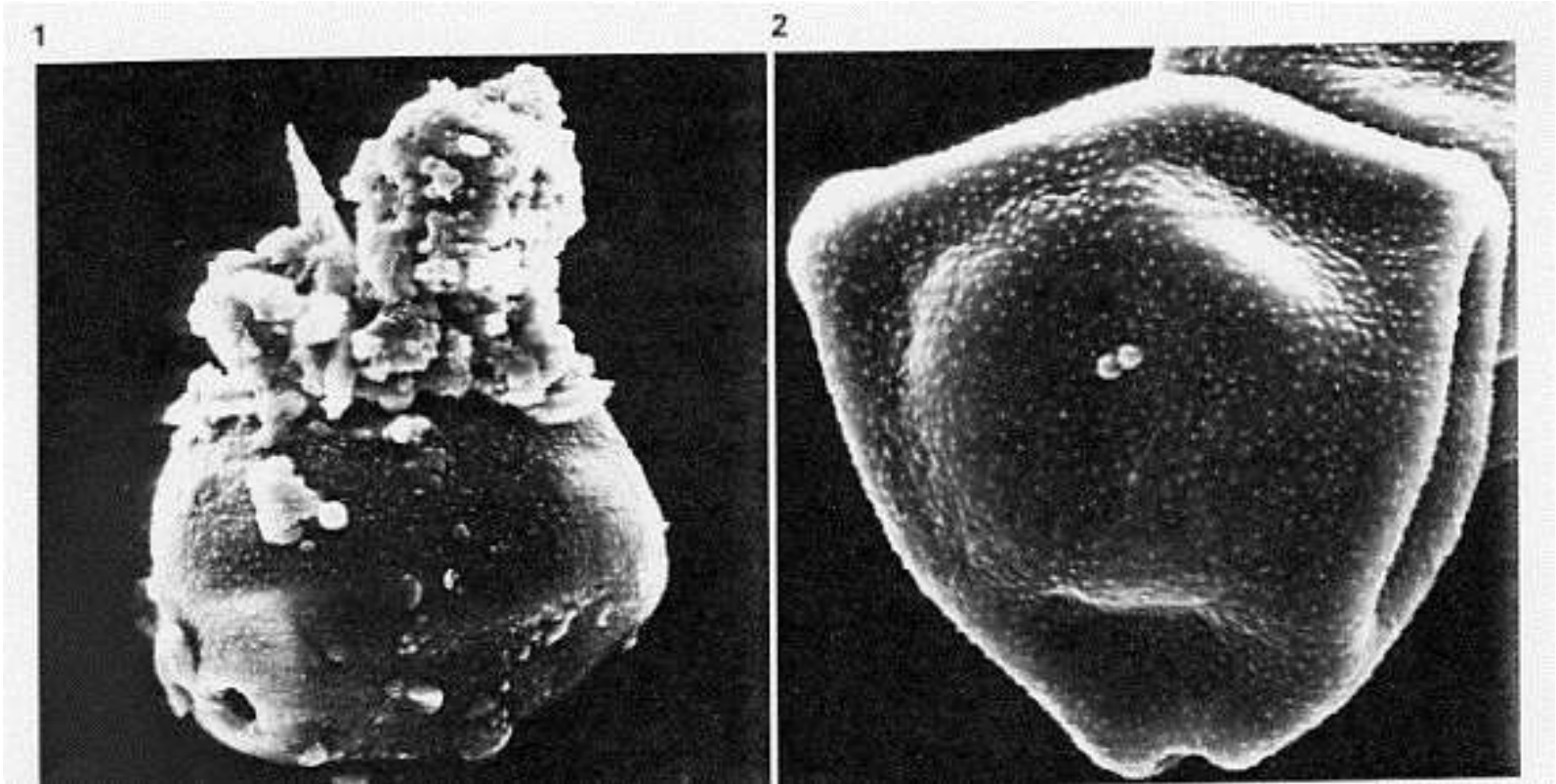
patogeneze

terapie

IMUNOLOGIE



Pylová zrna (líška)



autostráda

příroda

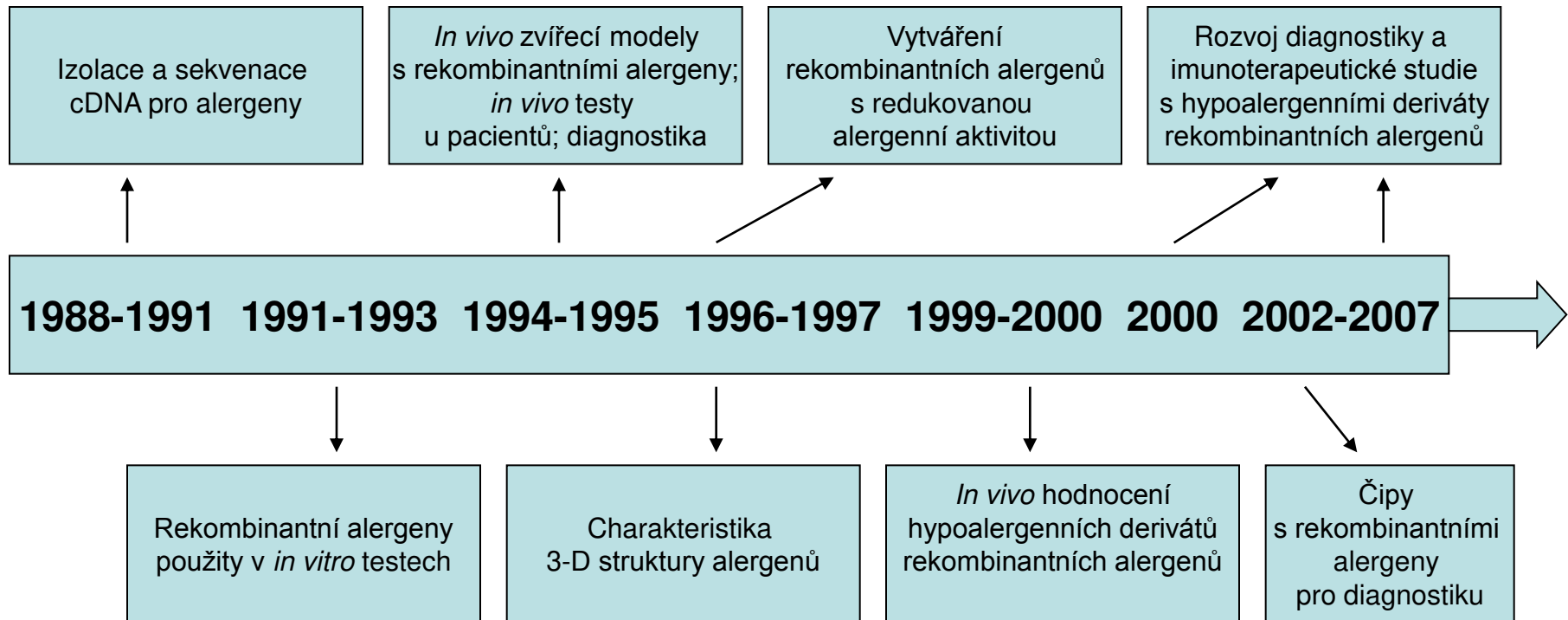
... Medicína se století za stoletím až do dávných tisíciletí všeobecných počátků ubírala cestou pustého uhadování a nejsyrovějšího empirismu ...

Lewis Thomas: Medúza a plž, 1979

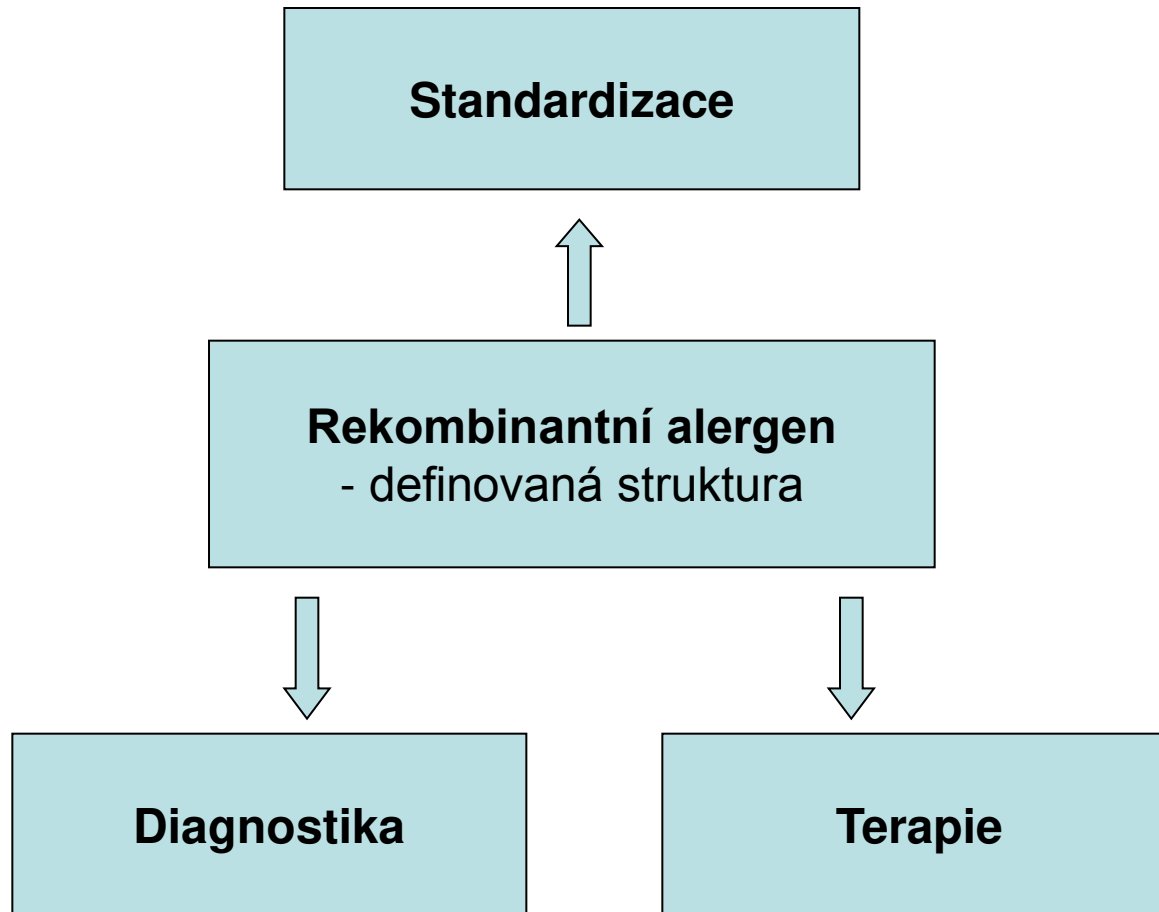
Přirozené a rekombinantní alergeny

- Na konci 80. let a zejména počátku 90. let minulého století se stává reálným začít připravovat alergeny na úrovni rekombinantních proteinů
- Je umožněno exaktně definovat 3-D strukturu alergenů a studovat jejich funkci
- Je možné porovnání s přirozeným alergenem (např. Bet v 1, Der p 1, Der p 2, Bla g 2, Bos d 2, Equ c 1, Ara h 1, ...)

Rekombinantní alergeny - časová osa vývoje poznání



Rekombinantní alergeny



Imunologie - Alergologie

Situace je obdobná, jako u rozvoje rekombinantních vakcín (např. hepatitida B, TSST-1, ...)

Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

S rozvojem molekulární biologie se jednoznačně otevírá cesta k produkci přesně definovaných a funkčních molekul jednotlivých alergenů.

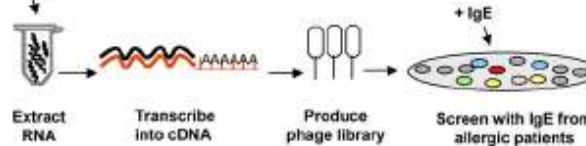
Rekombinantní alergy

charakteristika,
izolace alergenu
produkce

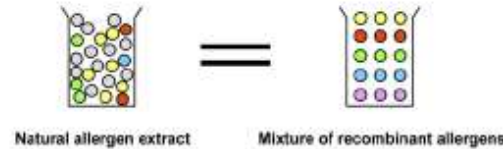
A. Selection of relevant allergen sources



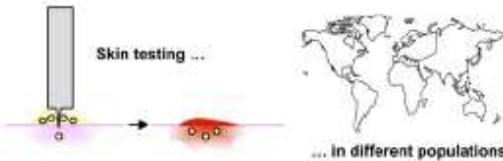
B. Isolation of cDNAs coding for the relevant allergens in an allergen source



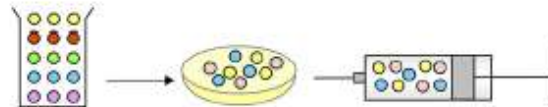
C. Production of recombinant allergens equaling the natural allergens



D. Evaluation of the clinical relevance of the individual allergens

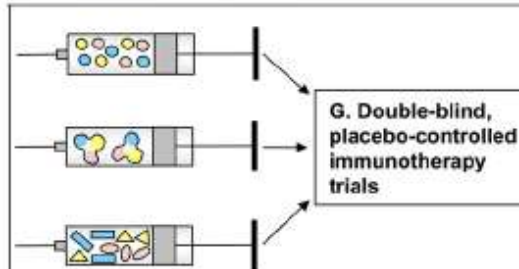


E. Selection of the recombinant allergens for vaccine formulation



F. In vitro and in vivo preclinical evaluation of vaccines based on ...

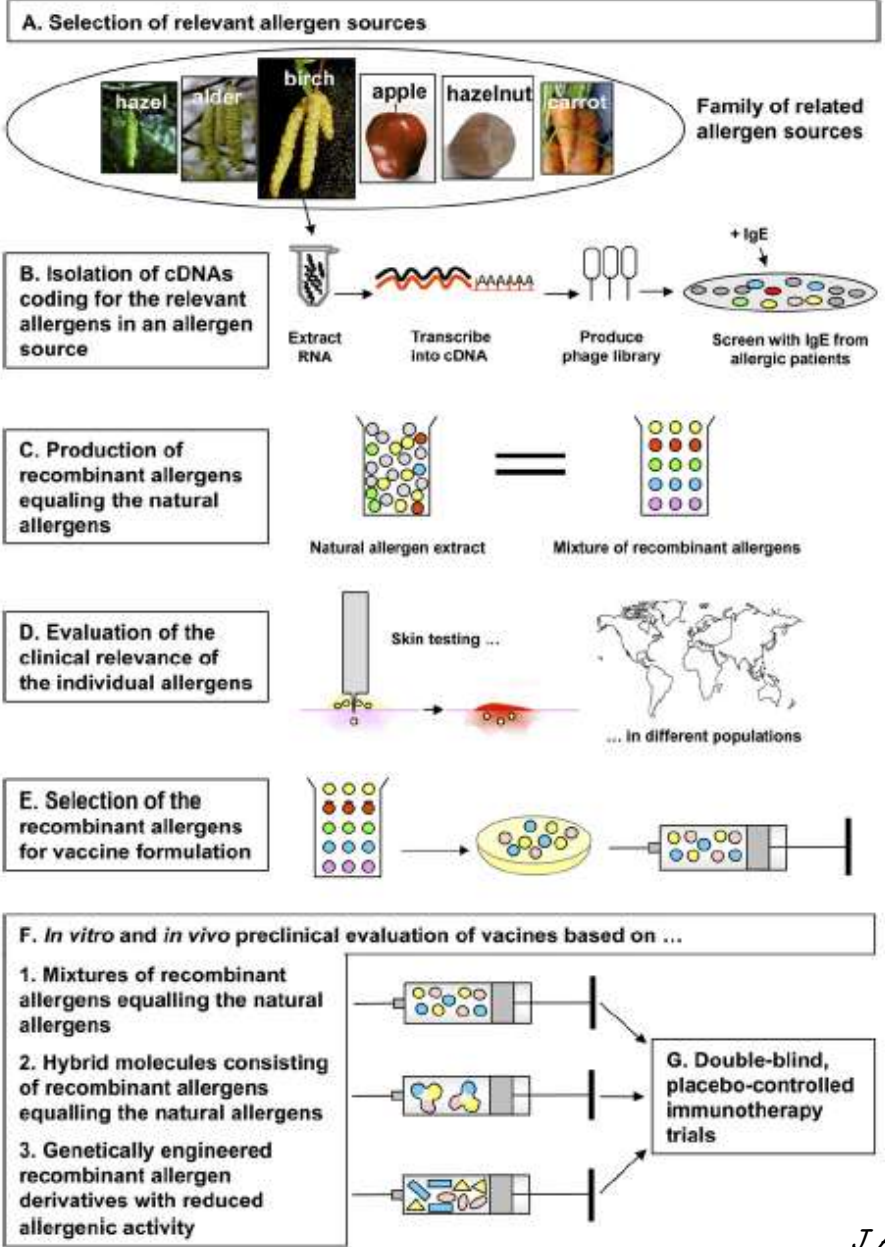
1. Mixtures of recombinant allergens equaling the natural allergens
2. Hybrid molecules consisting of recombinant allergens equaling the natural allergens
3. Genetically engineered recombinant allergen derivatives with reduced allergenic activity



Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

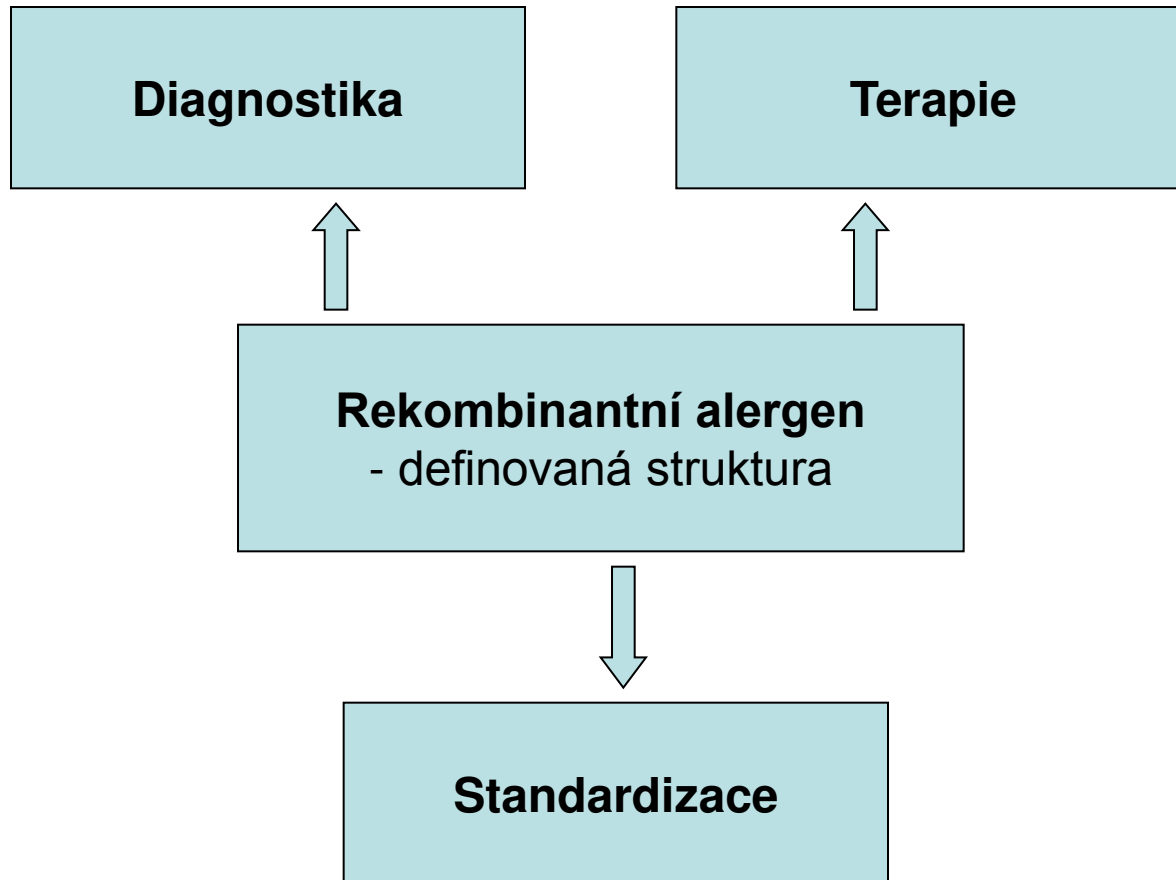
- Takto se nám zcela novým způsobem do praxe nabízí definovaný diagnostický přístup k vyšetření reaktivního profilu pacienta a identifikace alergenu, který u něj onemocnění vyvolává.
- Jedná se o přímé diagnostické využití jak *in vivo* (především prick testy, provokační testy), tak *in vitro* (např. stanovení specifických IgE a IgG4 protilátek, aktivace bazofilů, test uvolňování histaminu).

Rekombinantní alergy



klinická relevance
testování a
selekcce pro vakcíny

Rekombinantní alergeny - využití v alergologii



Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

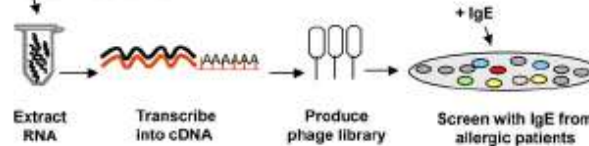
- Uvážíme-li skutečně do důsledku komplexní možnosti *in vivo* a *in vitro* diagnostiky v souvislosti s rekombinantními alergeny, včetně budoucího rozšíření existujících proteinových čipů, je zřejmé, že se již nyní v alergologické praxi nacházíme v jádru diagnostické i terapeutické revoluce.
- **Současně s diagnostikou se rozvíjí praktické uplatnění rekombinantních alergenů a jejich derivátů v rámci definované specifické alergenové imunoterapie.**

Rekombinantní alergy

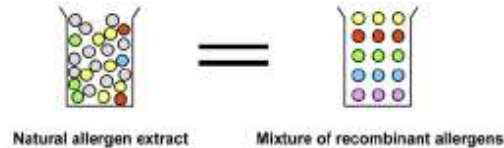
A. Selection of relevant allergen sources



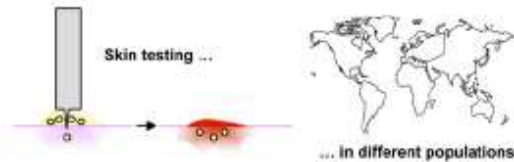
B. Isolation of cDNAs coding for the relevant allergens in an allergen source



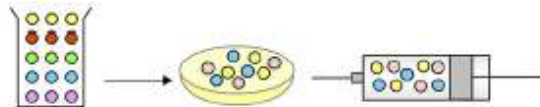
C. Production of recombinant allergens equalling the natural allergens



D. Evaluation of the clinical relevance of the individual allergens

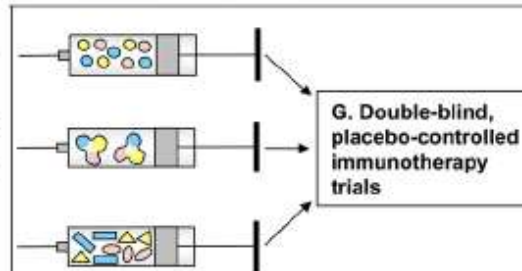


E. Selection of the recombinant allergens for vaccine formulation



F. *In vitro* and *in vivo* preclinical evaluation of vaccines based on ...

1. Mixtures of recombinant allergens equalling the natural allergens
2. Hybrid molecules consisting of recombinant allergens equalling the natural allergens
3. Genetically engineered recombinant allergen derivatives with reduced allergenic activity

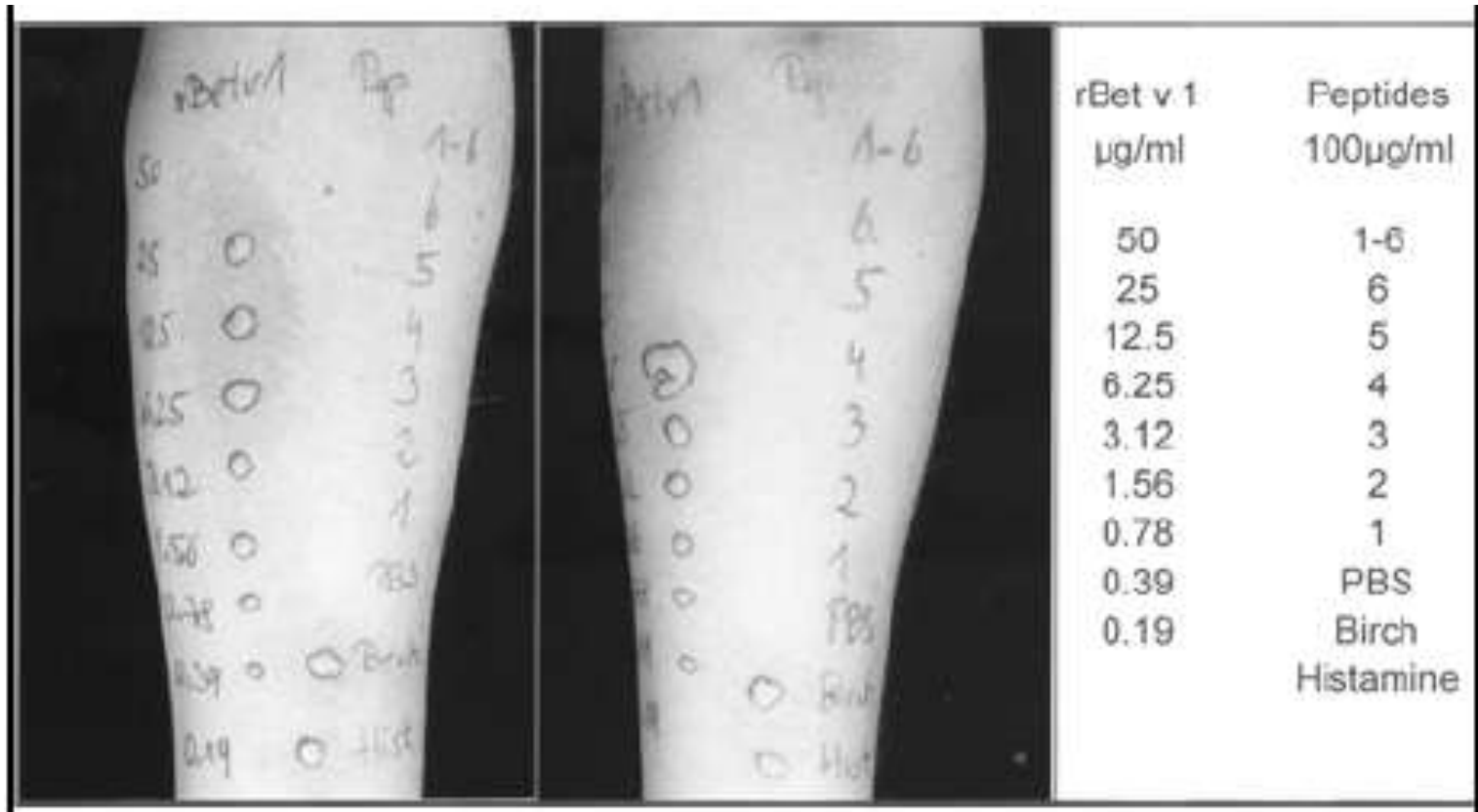


rekombinantní alergy

hybridní molekuly

hypoalergenní deriváty

Ztráta alergenní aktivity Bet v 1 peptidů



Rekombinantní Bet v 1 trimery: redukovaná alergenní aktivita



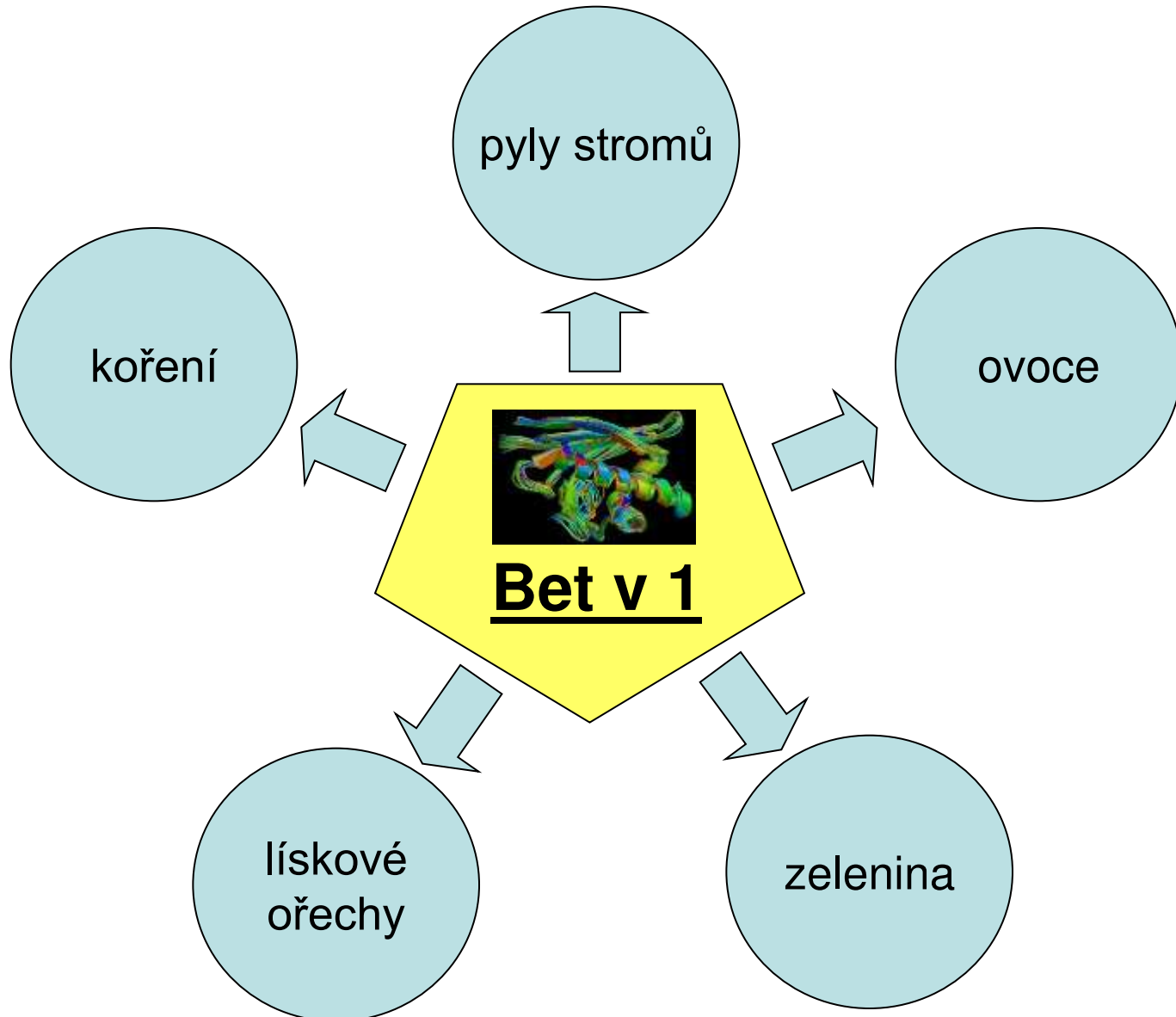
Relativní restrikce pylových alergenů

Pylové alergeny byly klasifikovány a roztríděny do 29 z charakterizovaných 7 868 strukturálních proteinových skupin; k největším z nich řadíme:

- Bet v 1 PR-10 (plant steroid hormone transporter)
- expansiny
- profiliny (aktin vážící proteiny)
- polcalciny (kalcium vážící proteiny)

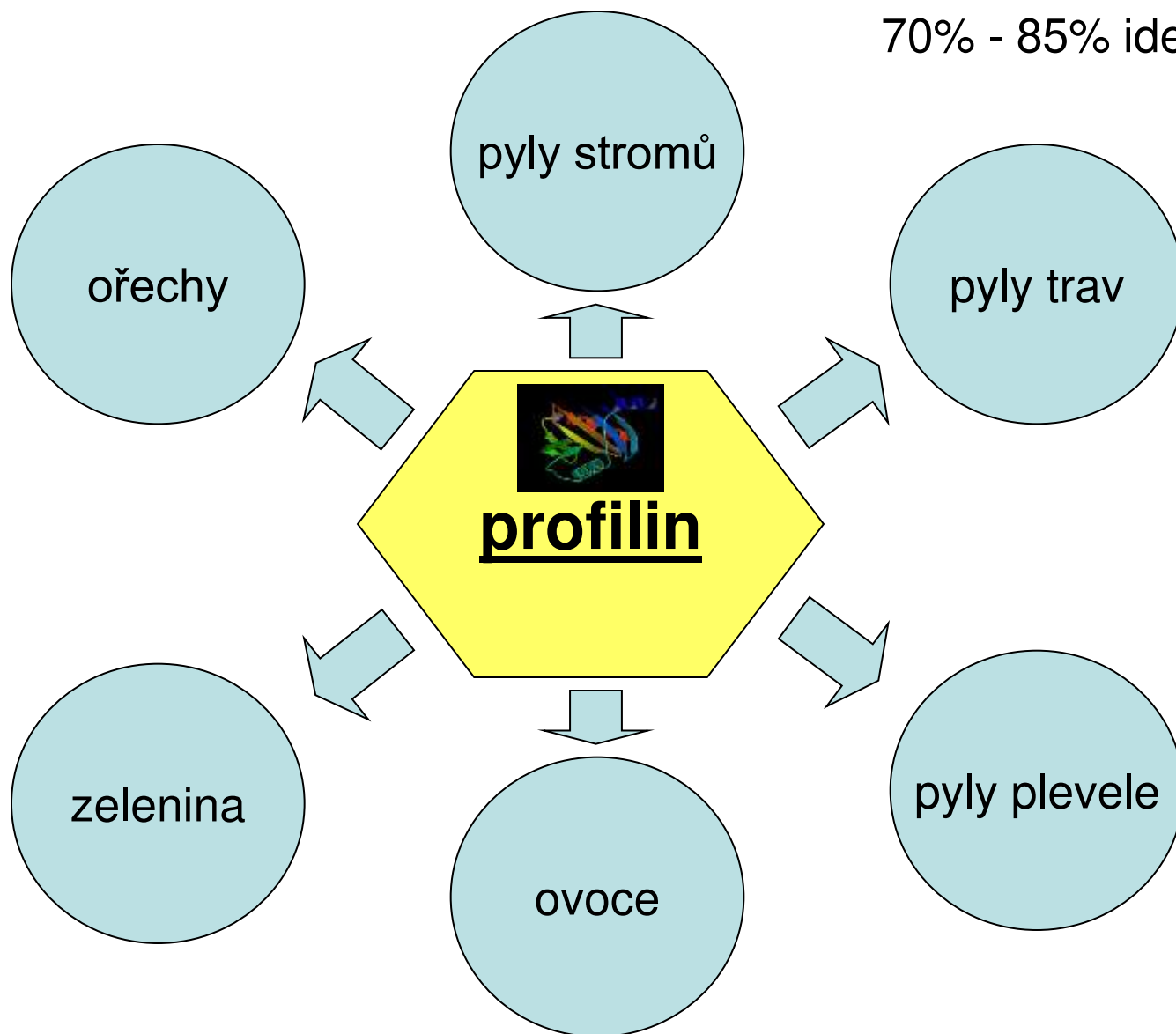
Definovaná imunoterapie

Zkřížená reaktivita – hlavní alergen břízy (Bet v 1)



Zkřížená reaktivita – panalergen profilin

70% - 85% identita



Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

- Z imunologického pohledu je naprosto zásadní, že zkřížená reaktivita mezi jednotlivými alergeny redukuje počet epitopů skutečně potřebných pro diagnostiku a terapii.
- Za alergenicitu jsou u reakce prvního typu přecitlivělosti odpovědné epitopy, na něž se váže specifické IgE.
- Naproti tomu pro specifickou alergenovou imunoterapii jsou významné epitopy pro aktivaci T lymfocytů.

Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

- Hypoalergenní mutanty a isoformy s redukovanou IgE aktivitou, avšak se zachovanou reaktivitou pro aktivaci T lymfocytů, jsou pro specifickou imunoterapii zásadní.
- Mnohdy dostačuje k redukcí alergenicity mutace pouze na úrovni jediné aminokyseliny (např. u alergenu jablka Mal d 1 substituce serinu na 111 pozici za prolin nebo cystein (rMal d 1 /S111P,C/), přičemž prolinová mutanta vykazuje vyšší redukcí vazebné aktivity pro specifické IgE (Lorenz AR, 2001).
- Podobně byly vytvořeny mutanty dalších alergenů, včetně alergenu pylu břízy.

rBet v 1

- Multicentrická studie, 124 pacientů
- směs 2 rBet v 1 fragmentů, nebo rBet v 1 trimer; adsorbce na $Al(OH)_3$
- hypaalegenní rek. deriváty
 - tolerováno 80 mikrogramů/dávka;
 - kumulativní dávka 150 mikrogramů
- silná IgG (IgG1, IgG4, IgG2) odpověď

Niederberger et al., 2004, 2007

rBet v 1 vs. nBet v 1

- Multicentrická studie, 147 pacientů
- srovnání rekombinantního proteinu s přirozeným; adsorbce na $Al(OH)_3$
- max. dávka 15 mikrogramů
- měsíční aplikace po dobu 2 let
- silná IgG (IgG1, IgG4, IgG2) odpověď

Pauli et al., 2006

Rekombinantní alergeny v diagnostice a terapii alergických onemocnění

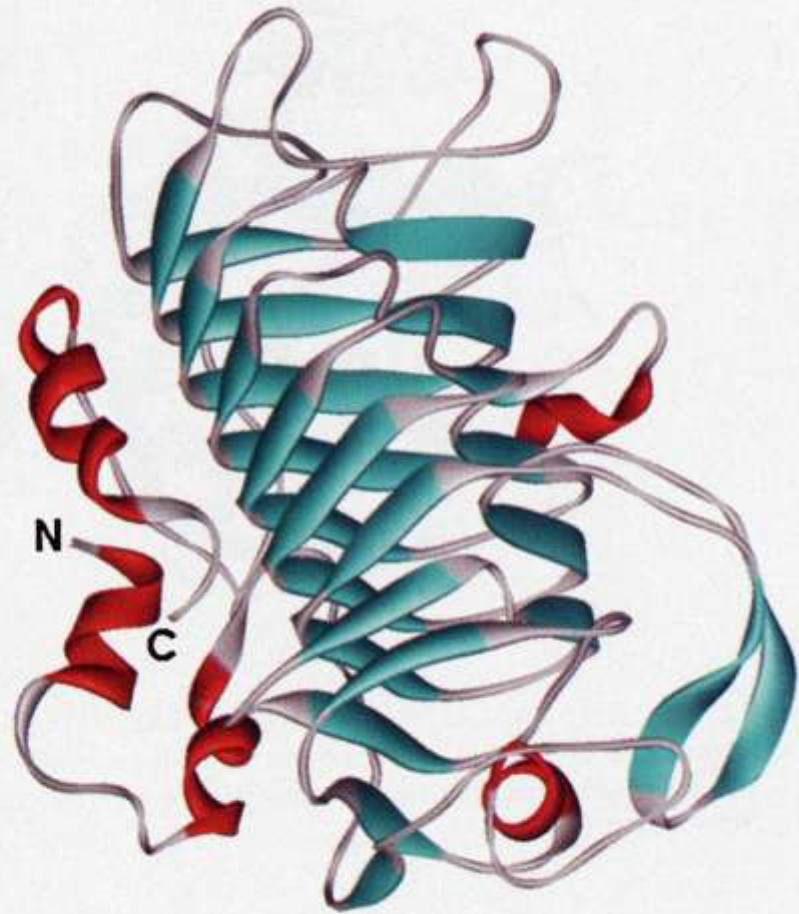
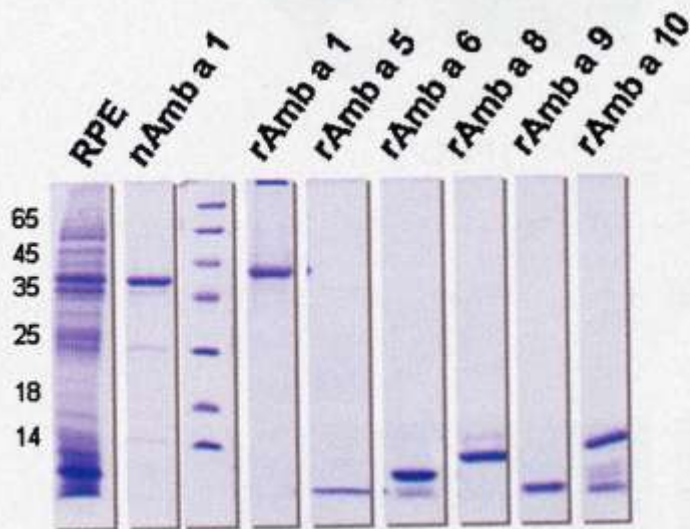
- Připravit je možné i hypoalergenní rekombinantní fragmenty jednotlivých alergenů (tj. bez části s IgE reaktivitou)
- dimery nebo trimery hypoalergenních molekul (s důsledkem zvýšení imunogenicity v rámci specifické alergenové imunoterapie)
- fúzované proteiny.
- Důsledkem aplikace testováním získaných nejvhodnějších hypoalergenních derivátů je také minimalizování rizika nežádoucí anafylaktické reakce u specifické léčby a to i při vyšších dávkách vakcinační imunoterapie.

V Renčově „Císařově mimu“ se ve vzrušeném dialogu vyznává vladař Dioklecián: „Já však chci stálost, pevnost, řád.“ Herec Genesisius císaře vybízí: „Hledej řád v tom, co se mění.“

Domnívám se, že tento dramatický fragment dobře vystihuje imunologii, úsek biologie vystavený neustálým proměnám. Považujeme ji dnes za integrující obor soudobé biomedicíny. Její postavení vyplývá z difúznosti imunitního systému, který svými strukturálními jednotkami a z nich uvolňovanými působky obhlíží organismus a spolureguluje řadu fyziologických a patologických pochodů. Pokusme se hledat řád v tom, co se v imunologii mění.

C. John, Imunologie jako hra s možnostmi, Sanguis 2005; 42, 11.

Pylové zrno a protein

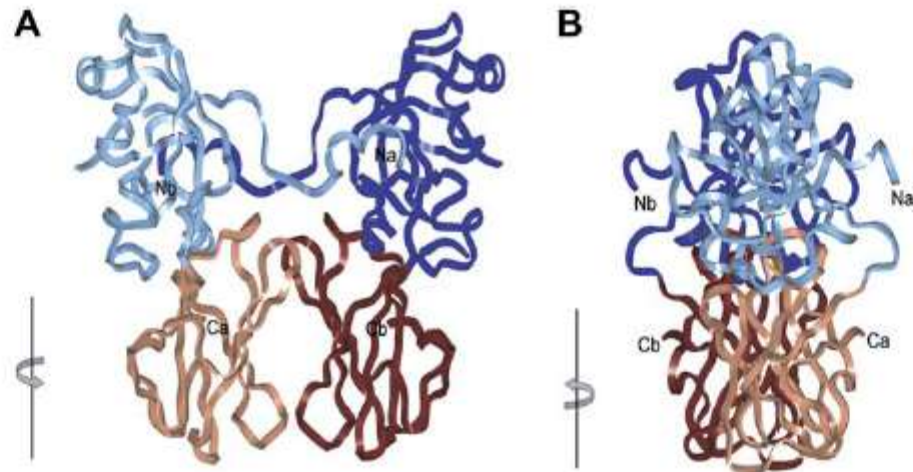


Dimer Phl p 1 (bojínek)

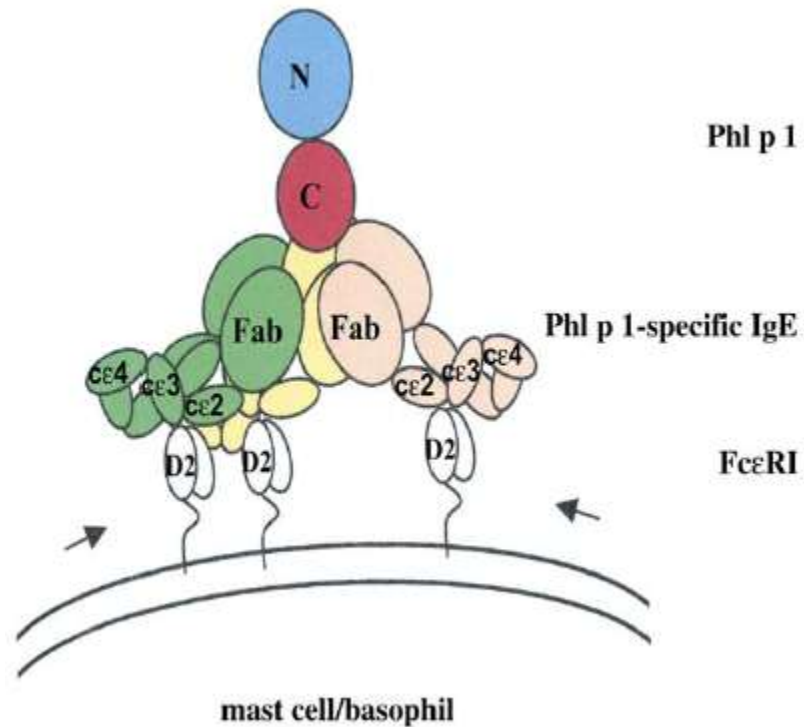
J ALLERGY CLIN IMMUNOL
VOLUME 117, NUMBER 6

2006

Flicker et al



Agregace receptorů (Fc epsilon R I)



Epidemiologická studie změny reaktivity v průběhu 20 let na alergenů břízy a bojínku

- Finsko, Vammala
- specifické IgE
- antigeny: rPhl p 1, 2, 5, 6, 7, 11, 12
nPhl p 4
rBet v 1, 2, 4

Závěr: Nález zvýšení specifického IgE,
s vyšší prevalencí IgE reaktivity
k hlavním alergenům Bet v 1 a Phl p 5.

Česká republika

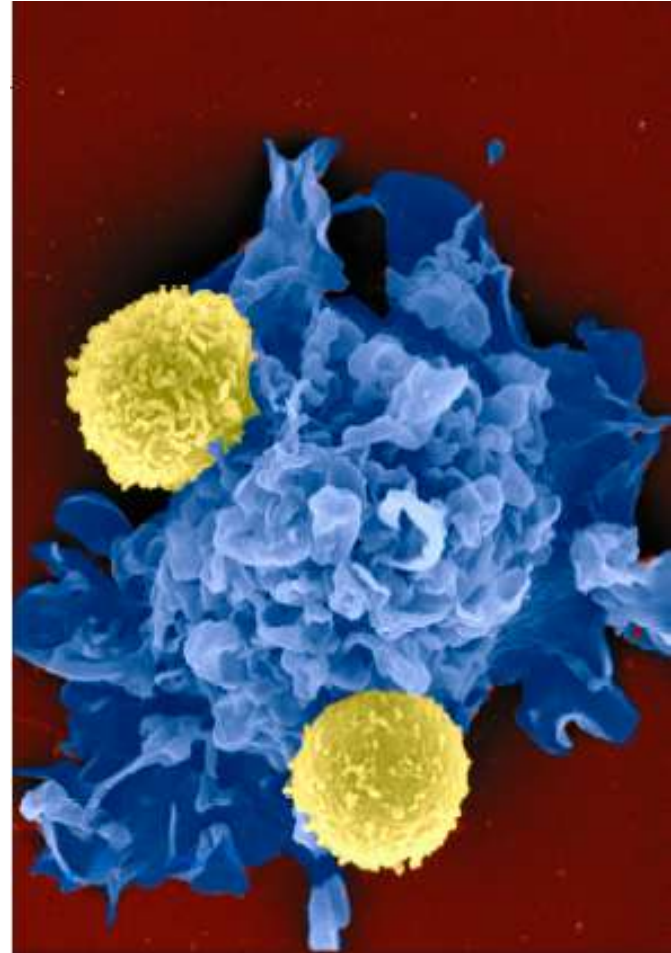
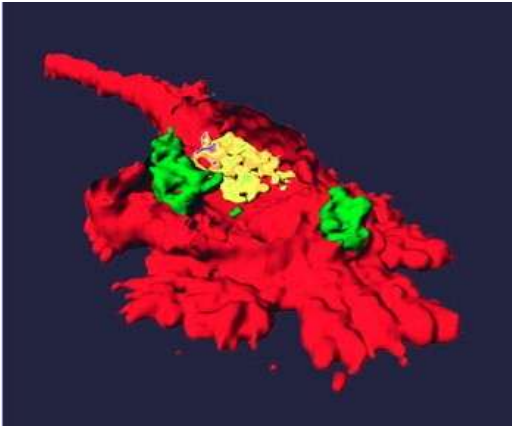
2 500 000 ALERGIKŮ

s klinickými projevy alergie

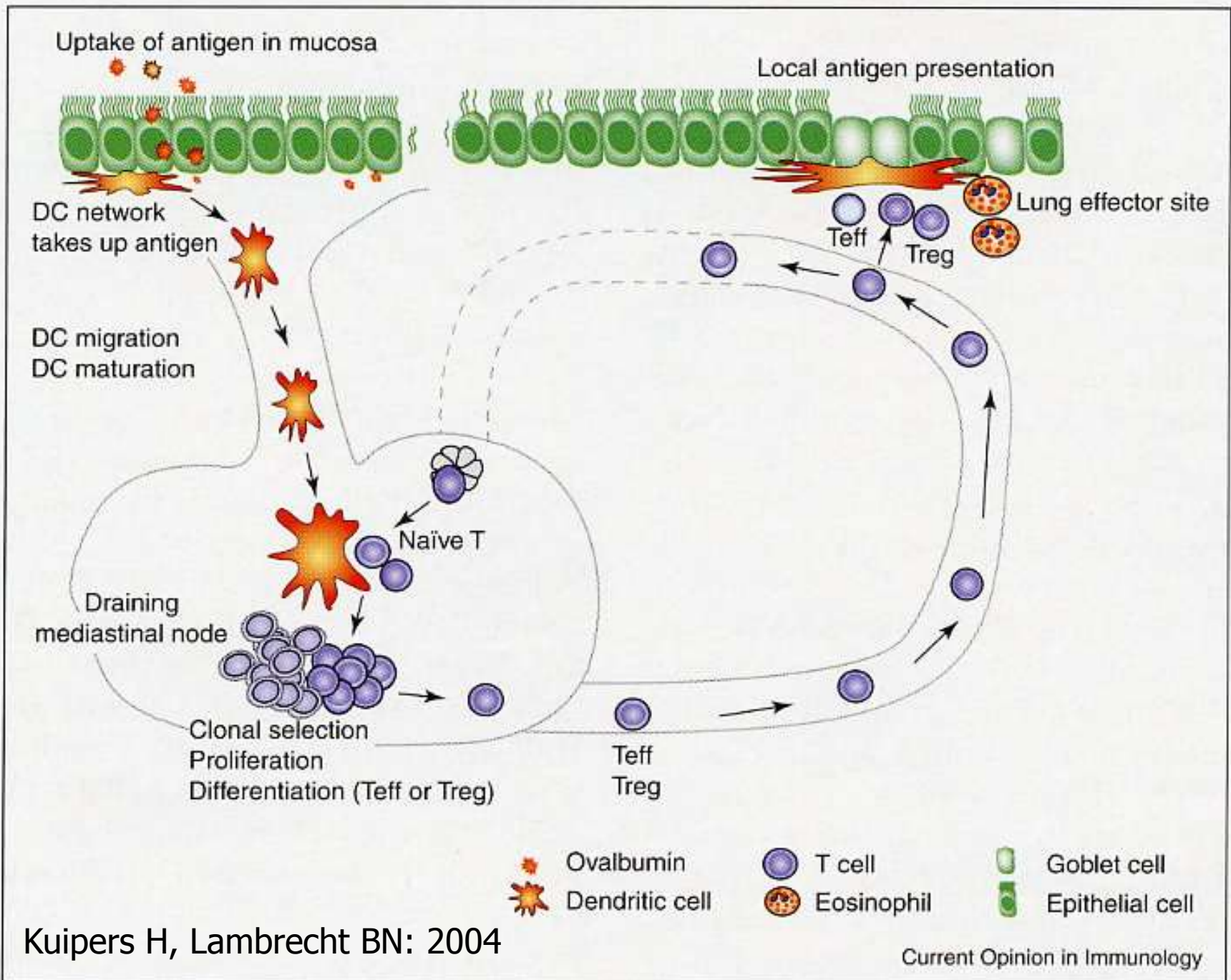
Regulace

**Pyl polarizuje
dendritické buňky
(bioaktivní lipidy
inhibují produkci IL-12)**

*Traidl-Hoffmann et al.,
J Exp Med 2005*



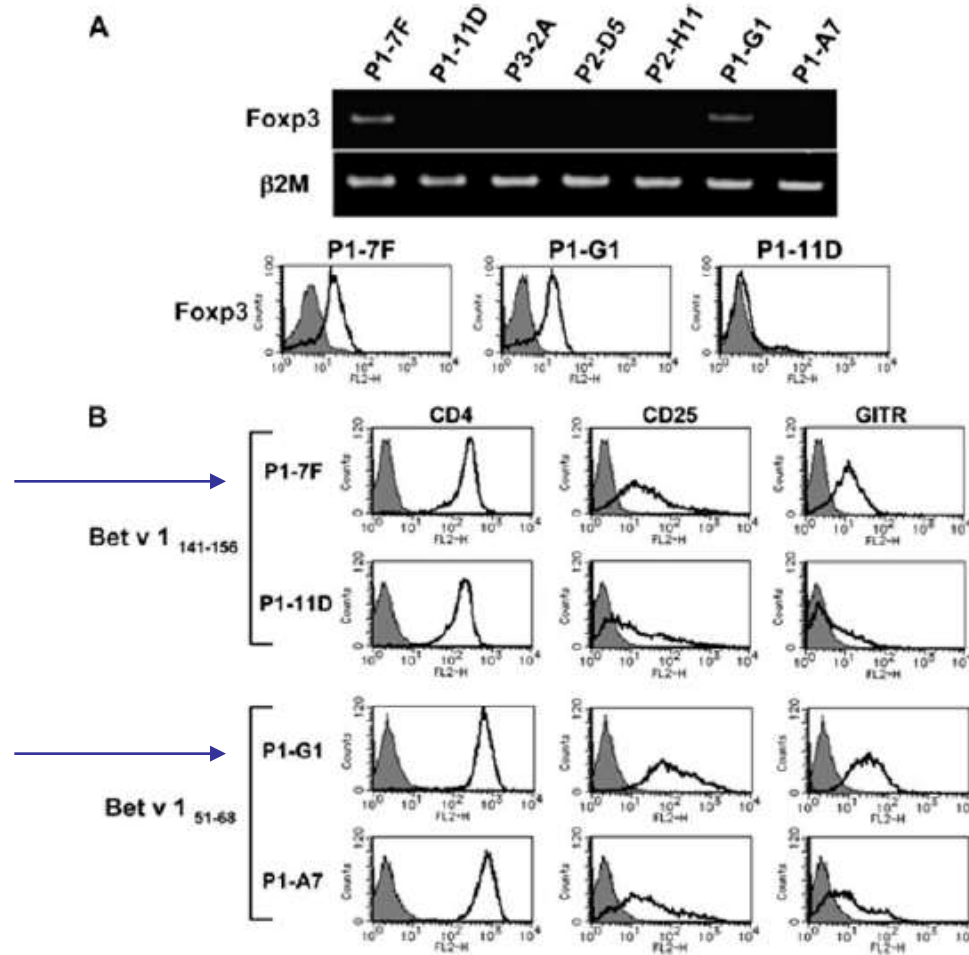




Kuipers H, Lambrecht BN: 2004

Bet v 1 peptidová reaktivita a Treg

Bet v 1-SPECIFIC Treg CELLS



Nagato T. et al., The Journal of Immunology, 2007, 178:1189–1198

PLATÍ TÉŽ PRO ALERGOLOGII

- Posun k biologicky a geneticky poučené tvorbě nových vakcín zajistil imunologii privilegované postavení. Stala se strážní věží biomedicíny. Citlivě vnímá signály nebezpečí, které i dnes dotírají na vše živé. Doufejme, že i ve třetím tisíciletí bude dávat naší planetě naději. *Hledá totiž rád v tom, co se mění.*

C. John, Imunologie jako hra s možnostmi, Sanguis 2005; 42, 11.

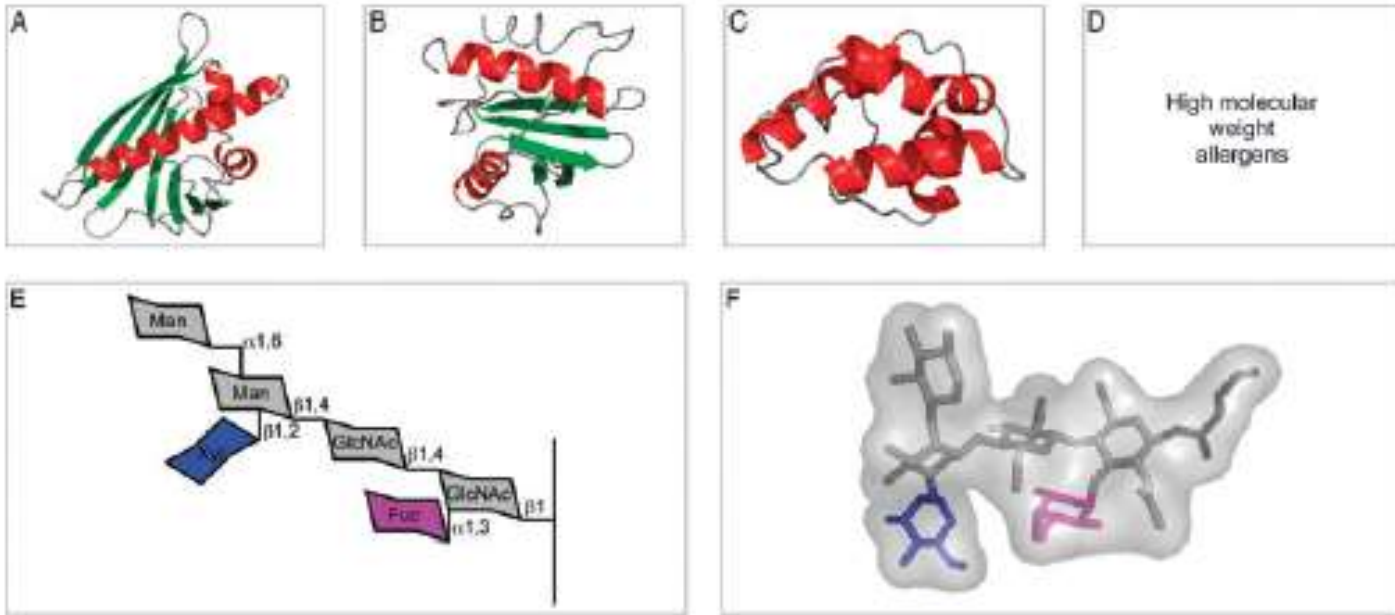
















Rekombinantní alergeny 2007

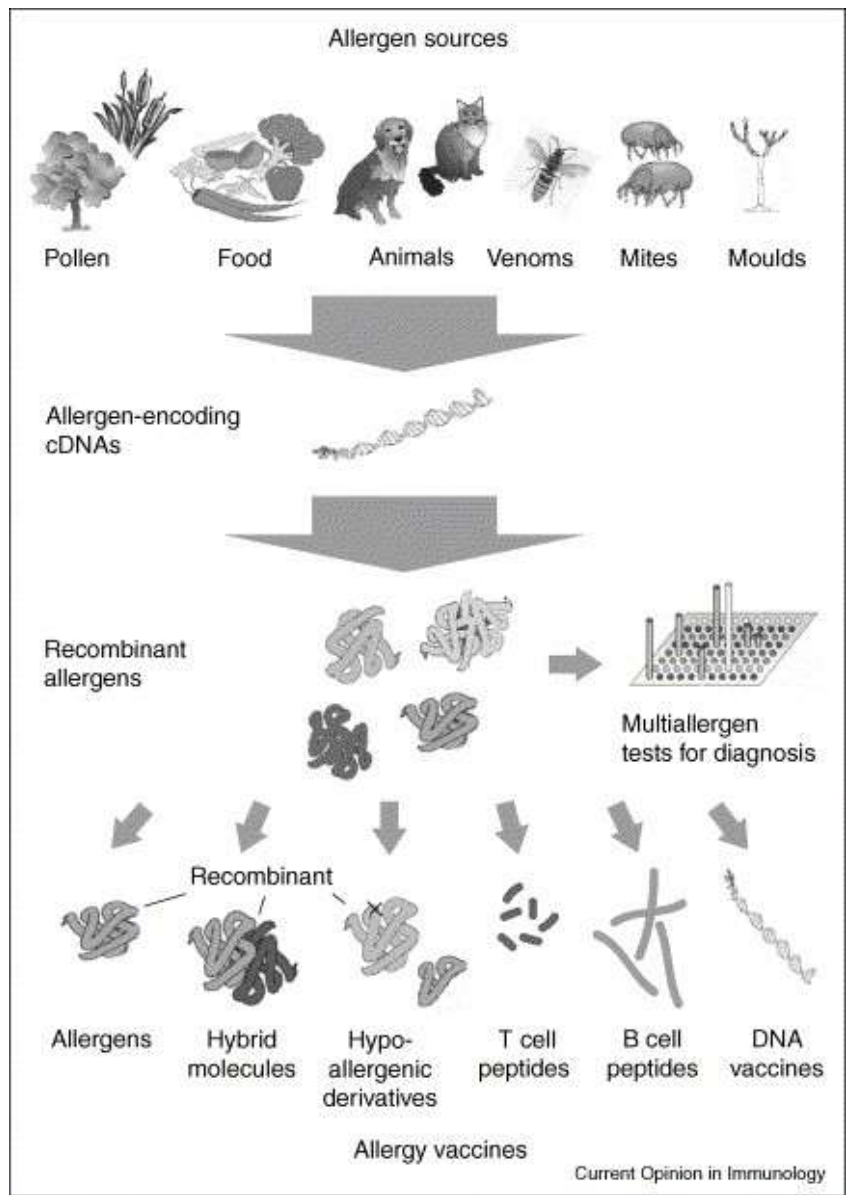
Děkuji za pozornost.



Zkřížená reaktivita pyly - potraviny: cukerné zbytky



 <p><i>Artemisia vulgaris</i></p>	<p>celery-mugwort-spice-syndrome</p> <p>mugwort-mustard-syndrome</p> <p>mugwort-peach-association</p> <p>mugwort-chamomile-association</p>	 <p><i>Apiaceae</i></p>  <p><i>Solanaceae</i></p>	 <p><i>Piperaceae</i></p>  <p><i>Anacardiaceae</i></p>	 <p><i>Liliaceae</i></p>  <p><i>Cruciferae</i></p>  <p><i>Leguminosae*</i></p>  <p><i>Rosaceae*</i></p>  <p><i>Rosaceae</i></p>  <p><i>Asteraceae</i></p>
 <p><i>Ambrosia artemisiifolia</i></p>	<p>ragweed-melon-banana-association</p>	 <p><i>Cucurbitaceae</i></p>	 <p><i>Musaceae</i></p>	



Přirozené a rekombinantní alergeny

- Informace o sekvenci, struktuře, funkčních vlastnostech a alergenicitě v současné době již stovek charakterizovaných molekul alergenů jsou obsaženy a uchovávány ve specializovaných databázích.
- Velmi praktickou a pravidelně aktualizovanou databází se jeví Allergome Database dostupná na internetu s adresou webových stránek <http://www.allergome.org/>, která v současné době zahrnuje údaje od 60. let minulého století (nyní z více než 6 000 odborných publikací).