

Sodobna cepiva proti vnetju srednjega ušesa

Novel vaccines against otitis media

Borut Štrukelj

Povzetek: V zadnjem desetletju so bila razvita s pomočjo sodobnih biotehnoloških metod tri konjugirana cepiva proti okužbam, ki jih povzroča bakterija *Streptococcus pneumoniae*. Tehnologija razvoja zajema tri bistvene faze: osamitev površinskih polisaharidnih antigenov iz najbolj patogenih serotipov bakterije, izražanje rekombinantnega proteinskega nosilca oziroma alternativno osamitev proteinskega nosilca iz drugih bakterijskih virov in kemijsko ali encimsko pripetje polisaharida na proteinsko ogrodje. Tako pridobljena nova cepiva predstavljajo korak naprej v varnosti in učinkovitosti in jih uporabimo za zaščito pred okužbo pri dojenčkih, mladini in odrasli populaciji.

Ključne besede: konjugirana, cepljenje, vnetje srednjega ušesa, Synflorix, Prevenar

Abstract: During the latest decade three conjugate vaccines against infection with *Streptococcus pneumoniae* were developed by using up-to-date biotechnological methods. The technology is composed of three main steps: isolation of polysaccharide antigens from the most pathogenic serotypes, expression of recombinant or naive protein carrier and chemically or enzymatically driven conjugation. The new technology represents more safe and efficacious bioproduction of vaccines used in infants, adolescents or mature population.

Key words: conjugate, vaccination, otitis media, Synflorix, Prevenar

1 Cepiva: da ali ne?

V zadnjem desetletju se v strokovnih in laičnih medijih velikokrat postavlja vprašanje smiselnosti in varnosti cepljenja. Brez dvoma je glavna prednost cepljenja preprečevanje okužb, saj z vnosom antigenov, ki so lahko naravnega, sinteznega ali rekombinantnega izvora, aktiviramo nastanek imunoglobulinov, ki nas začasno ali trajno zaščitijo pred patogeni mikroorganizmi. Pomislek pred cepljenji nastaja predvsem glede cepljenja dojenčkov, a nedvoumno je dokazano, da bi se z zmanjševanjem deleža cepljenih otrok na nekem področju nalezljive bolezni hitro razširile. Tako so s sistematičnim cepljenjem v razvitem svetu izjemno zmanjšali pojav davice, mumpsa, tetanusa, oslovskega kašlja, poliomielitisa, ošpic, rdečk, črnih koz, okužbe s hemofilus influenzae tipa B in hepatitisa B. prof.dr. Miha Likar v knjigi »Cepiva danes in jutri« ocenjuje, da pomeni cepljenje za preprečevanje nalezljivih bolezni celo večji uspeh farmacevtske in medicinske znanosti kot uporaba antibiotikov. Lep primer za uspešnost cepljenja je izkoreninjenje črnih koz, kje je bila zadnja epidemija leta 1976, ko je za črnimi kozami zbolelo petnajst milijonov ljudi in umrlo okoli milijon bolnikov, leta 1980 pa je Svetovna zdravstvena organizacija sporočila, da so črne koze izkoreninjene in je virus črnih koz prišten le v strogo zaščiteni referenčni laboratoriji (1). Zanimivi, a strokovno nedokazani so argumenti proti cepljenju, ki se sklicujejo na nedodelan sistem, na dojenčkov še nerazvit imunski sistem, na pomožne snovi, ki sebujejo organsko vezano živo srebro, fenolne spojine, aluminijeve soli, formaldehid, tuje proteine in nečistote. Jasno je, da sproži vnos tuje beljakovine v organizem reakcijo, ki sproži vnetni proces, da je na nekaj

stotisoč cepljenj en resen zaplet oziroma na nekaj milijonov odmerkov tudi kakšen smrtni primer. A pri nobenem zdravlilu razmerje med koristnostjo in tveganjem ni tako v prid uporabi, kot je to pri cepivih (3,4).

Podatke o neželenih stranskih učinkih, ki nastanejo po cepljenju, zbere vsako leto Institut za varovanje zdravja RS. Za leto 2008 podatki kažejo največ neželenih učinkov pri uporabi kombiniranih cepiv, predvsem pri uporabi pet valentnega cepiva proti davici, tetanusu, oslovskemu kašlju, hemofilus influeci tipa B in poliomielitisu, kjer so v 46,6 % primerov opazili lokalno bolečino, rdečino in oteklino po vnosu antigena na mestu vboda, v 20% je prišlo do povišane telesne temperature, le pri enem, 4 mesečnem otroku je prišlo do pojava akutne mieloblastne levkemije. Deklica je poleg petvalentnega cepiva dobila tudi cepivo proti rotavirusu. Torej gre za en resen primer v celi generaciji cepljenih dojenčkov, kar lahko uvrstimo med varen način zaščite. V kolikor upoštevamo nujno reakcijo organizma po vnosu antigena, ki se kaže v bolečem, pordelem in oteklem tkivu na mestu vboda, lahko večino nepirjetnih učinkov uvrstimo med poglavitne, zdravilne učinke in ne med neželjene učinke, ki jih cepivo povzroči, saj je vnetni proces nujni odgovor organizma na vnos tujega antigena.

V aktivnostih skupin proti cepljenju omenjajo tudi resne neželjene učinke cepiv, kot je avtizem, razvoj avtoimunih bolezni in okvar možganov pri dojenčkih, česar pa IVZ v Sloveniji ne beleži in so verjetno posledica statistično nepreverjenih posameznih primerov, ki mogoče sploh niso v povezavi s prejetimi cepivi. Seveda pa lahko cepljenje zavrremo v primeru alergij na sestavine cepiva oziroma zaradi pojave resnega

neželjenega učinka po predhodnem odmerku istega cepiva, o čemer odloči tričlanska komisija strokovnjakov, ki jo imenuje minister, odgovoren za zdravje, po obvestilu lečečega zdravnika (1).

2 Povzročitelji vnetja srednjega ušesa

Vnetje srednjega ušesa (Otitis media) nastane zaradi okužbe z bakterijami, virusi ali glivnimi patogeni. Vnetje oz. okužba srednjega ušesa je v otroštvu pogosta bolezen z različnimi etiologijami. Je eden najpomembnejših vzrokov za predpisovanje antibiotikov v razvitih državah. Odpornost pomembnih bolezenskih povzročiteljev, tudi *S. pneumoniae*, proti antibiotikom v številnih državah narašča. Ponavljajoče akutno vnetje srednjega ušesa pogosto zahteva kirurški poseg z vstavitvijo ušesne cevke skozi bobnič, kar omogoča prezračevanje in praznjenje srednjega ušesa. Pri dojenčkih in manjših otrocih je daleč najpogostejše vnetje zaradi bakterije *Streptococcus pneumoniae*, temu po pogostosti sledi okužba z bakterijama *Haemophilus influenzae* in *Pseudomonas aeruginosa*, medtem, ko pri starejših adolescentih in odraslih prevladuje okužba z bakterijskim patogenom *Haemophilus influenzae*. Med virusnimi okužbami najpogosteje zasledimo respiratorni sincicijski virus (RSV) in viruse, ki povzročajo običajna prehladna obolenja. Predvsem bakterija *H. influenzae* lahko povzroči obširno okužbo, ki lahko vodi v bakterijski meningitis ali bakterijsko pljučnico. Vnetju srednjega ušesa so večkrat podvrženi otroci z specifični genotipom v genih AP2B1 in CCL5 (2). Zdravljenje sestoji iz kratkotrajne uporabe primernih antibiotikov v primeru bakterijskega vnetja srednjega ušesa oziroma preventivnega cepljenja (5,6).

3 Konjugirana cepiva: korak naprej v učinkovitosti in varnosti

Čeprav je razvoj cepiv star že dobrih 100 let, je šele sodoben biotehnoški pristop, ki vključuje zmogljive kromatografske tehnike in metode genskega inženirstva, omogočil razvoj konjugiranih cepiv. Imenujemo jih tudi cepiva s prečiščenimi antigeni in v primerjavi z živimi (oslabljenimi) cepivi ali mrtvimi cepivi pomenijo večjo učinkovitost z vidika delovanja antigena in večjo varnost glede nečistot oziroma potencialnih sprožilcev bolezenskih stanj. Konvencionalni način proizvodnje cepiv z uporabo oslabljenih živih ali mrtvih cepiv velikokrat vodi do manj natančnega odmerjanja aktivne genske determinante, poleg tega pa predstavlja nek mikroorganizem nosilca več centrov, ki lahko reagirajo ne le z imunskim sistemom, ampak z različnimi tarčami v organizmu, kar lahko vodi do močnejše izraženih neželenih učinkov. Antigenske determinante, ki rezultirajo iz proteinskih površinskih antigenov posameznih mikroorganizmov, so močnejše podvržene mutacijam in s tem manjši učinkovitosti cepiv proti prvotnemu antigenu, kot sodobna uporaba konjugiranih cepiv, ki vsebujejo antigenske determinante le površinskih polisaharidnih antigenov. Žal pa čisti polisaharidi bistveno slabše aktivirajo T-celični imunski sistem, zato so raziskovalci v zadnjih 20 letih razvili konjugirana cepiva (7).

Konjugirana cepiva vsebujejo dobro prečiščene površinske polisaharidne ali glikoproteinske antigene, ki jih povežemo s proteinskih nosilcem. Tako pridobimo močnejše izražene antigenske lastnosti, saj je konjugat običajno veliko bolj imunogen kot sam polisaharid ali

glikoproteinski antigen, z vidika varnosti pa manj onečiščen z ostalimi komponentami mrtvega ali oslabljenega patogena.

Glede na učinkovitost konjugiranih cepiv je potrebno omeniti več dejavnikov. Prvi je vsekakor še razvijajoč imunski sistem dojenčkov in otrok pod dvema leti, kar onemogoča uporabo prečiščenih polisaharidnih cepiv ali celo mrtvih in oslabljenih živih cepiv, saj imunski sistem pri dojenčkih še ne odreagira na vnos polisaharidnega antigena dovolj močno, da bi lahko nudil zaščito ob kasnejši okužbi s patogeni. Zaradi haptenske narave konjugiranih cepiv pa že pri dojenčkih sprožimo aktivacijo T in B limfocitnega sistema (tabela 1). Nasprotniki cepljenja svarijo prav pred prezgodnjo aktivacijo imunskega sistema pri dojenčkih. Trenutno ni dokazov o škodljivosti prezgodnje aktivacije imunskega sistema pri dojenčkih, prednosti pa je veliko. Seveda velja biti pozoren, saj dolgoletnih izkušenj tu še nimamo. Predvsem bi morali biti pozorni na kasnejšo možno povezavo med razvojem avtoimunih bolezni in uporabo konjugiranih cepiv pri dojenčkih (8).

Preglednica 1: Prednost konjugiranih cepiv pred polisaharidnim antigenom

Table 1: Comparison the superiority of conjugate vaccine among polysaccharide antigen

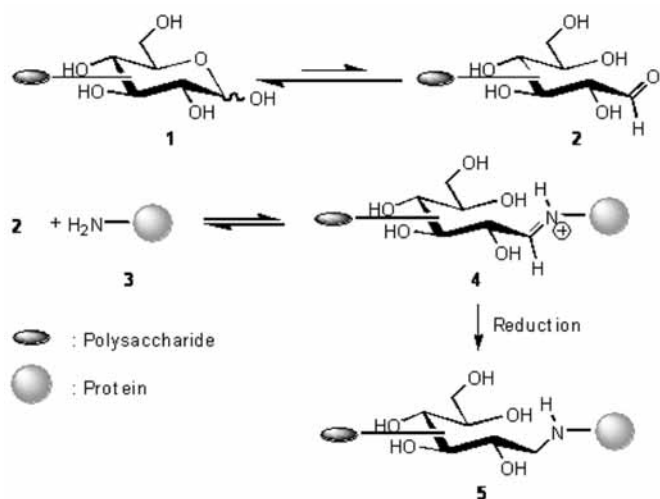
Lastnost	Polisaharidni antigen	Konjug. cepiva
Čistost antigena	majhna	velika
Imunogenost pri otrocih pod 2. leti	majhna	velika
B celični imunski odziv	Da	Da
T celični imunski odziv	Ne	Da
Imunski spomin	Ne	Da
Dolgotrajna zaščita	Ne	Da
Učinek „booster“	Ne	Da

3.1 Tehnologija priprave konjugiranih cepiv

Prvi korak pri pripravi konjugiranih cepiv je osamitev oziroma priprava antigena. Antigene, ki so največkrat površinski polisaharidi, glikoproteini ali proteini, lahko pridobimo na več načinov: z izolacijo iz patogenih mikroorganizmov in nadaljnjim čiščenjem, sintezno (v primeru peptidnih antigenov ali pa enostavnejših polisaharidov) ali pa s pomočjo rekombinantne tehnologije DNA (v primeru glikoproteinov ali proteinskih antigenov).

V drugem koraku moramo pripraviti stabilen antigenski proteinski nosilec, na katerega bomo pripeli pripravljene antigen. V ta namen največkrat uporabimo tehnologijo rekombinantne DNA in izrazimo proteinski nosilec v sesalskih celicah, v glivnih celicah ali bakteriji *E. coli* (9).

Sledi kovalentno pripetje polisaharida na proteinski nosilec, pri čemer moramo paziti, da ne podremo antigenskih determinant tako antigena, kot nosilca. Vsebnost polisaharida je zelo pomembna, saj premalo antigena ne daje dovolj močnega imunskega odziva, preveč polisaharida pa lahko vodi do neaktivnosti T-celičnega sistema. Temu sledi kemijska reakcija, ki je shematsko prikazana na sliki 1. V prvi vrsti gre za redukcijo do aldehidne skupine terminalnega oligosaharida, čemur sledi pripetje proste NH₂-skupine proteinskega nosilca. Nastane iminski intermedat, ki ga reduciramo do primarnega amina.



Slika 1: Kovalentna vezava polisaharidnega antigena na proteinski nosilec

Scheme 1: Covalent binding of polysaccharide antigen to protein carrier

3.2 Registrirana cepiva proti vnetju srednjega ušesa

Na tržišču na območju EU so trenutno na voljo tri konjugirana cepiva proti vnetju srednjega ušesa: Synflorix, Prevenar in Prevenar 13.

Prevenar

Prevenar je bilo prvo konjugirano cepivo, odobreno kot cepivo za aktivno imunizacijo proti boleznim, ki jih povzroča *Streptococcus pneumoniae* serotipov 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F in 23F, ki vključuje sepso, meningitis, pljučnico, bakteriemijo in akutno vnetje srednjega ušesa). Polisaharidi

omenjenih serotipov so vezani na CRM197 nosilni protein. Uporablja se pri dojenčkih in otrocih od 2. meseca do 5. meseca. Po strokovnih ocenah so ti serotipi odgovorni za približno 54 % do 84 % invazivnih okužb dojenčkov in otrok, ki so mlajši od dveh let, in približno 62 % do 83 % invazivnih okužb otrok, ki so stari med dvema in pet let.

Učinkovitost zdravila Prevenar pri preprečevanju invazivne bolezni, ki jih povzroča bakterija *S. pneumoniae*, so raziskali pri skoraj 38 000 dojenčkih. Polovica dojenčkov je prejela zdravilo Prevenar, preostali pa so prejeli cepivo, ki ni učinkovito proti bakteriji *S. pneumoniae*. Cepljenje je bilo izvedeno v 2., 4., 6. in 12.–15. mesecu starosti. V študiji so preverjali število otrok, pri katerih se je v 3,5-letnem obdobju te študije pojavila invazivna bolezen zaradi bakterije *S. pneumoniae*. Razmerje med učinkovitostjo kontrolnega cepiva in cepiva Prevenar v preprečevanju pojava invazivne bolezni je bilo 1:5 v korist Prevenarja, kar kaže na njegovo veliko učinkovitost (8).

Synflorix

Synflorix je pnevmokokno cepivo druge generacije, ki se uporablja za cepljenje dojenčkov in otrok, starih od šest tednov do pet let, proti invazivni bolezni in akutnemu vnetju srednjega ušesa (otitis media), ki ga povzroči bakterija *S. pneumoniae*. Invazivna bolezen nastopi, kadar se bakterija razširi po telesu in povzroči resne okužbe, kot so septikemija (okužba krvi), meningitis (vnetje možganskih ovojnic in ovojnic hrbtnega mozga) in bakterijska pljučnica. Synflorix® je desetvalentno konjugirano cepivo, ki vsebuje naslednje pnevmokokne serotipe: 1,4,5,6B,7F,9V, 14,18C, 19F, 23F, ki po opisu v EPAR (10) povzročijo okoli 90% vseh okužb z bakterijo *Streptococcus pneumoniae*. Vsebuje torej tri serotipske polisaharide več od Prevenarja, prav tako pa so posamezni polisaharidi vezani na tri nosilne proteine: rekombinantni protein D iz netipiranega seva *Haemophilus influenzae*, na proteinski nosilec tetanusnega toksoida in na proteinski nosilec davičnega toksoida. Z ELISA testi proti posameznim antigenom so v klinični študiji, ki je vključevala skoraj 5000 dojenčkov, starih 3 mesece, dokazali, da je nastanek večje količine

Preglednica 2: Primerjava deleža oseb z odgovarjajočim titrom anti IgG protiteles proti posameznim serotipom med cepivoma Prevenar in Prevenar 13

Table 2: The comparison of the ratio of IgG antibodies against different serotypes among Prevenar and Prevenar 13

Serotipi	Prevenar 13 % (N+282-285)	7-valentni Prevenar % (N=277-279)	Razlika (95% CI)
Serotipi 7-valentnega cepiva Prevenar			
4	98.2	98.2	0.0 (-2.5; 2.6)
6B	77.5	87.1	-9.6 (-16.0; -3.3)
9V	98.6	96.4	2.2 (-0.4; 5.2)
14	98.9	97.5	1.5 (-0.9; 4.1)
18C	97.2	98.6	-1.4 (-4.2; 1.2)
19F	95.8	96.0	-0.3 (-3.8; 3.3)
23F	88.7	89.5	-0.8 (-6.0; 4.5)
Dodatni serotipi v cepivu Prevenar 13			
1	96.1	87.1*	9.1 (4.5; 13.9)
3	98.2	87.1	11.2 (7.0; 15.8)
5	93.0	87.1	5.9 (0.8; 11.1)
6A	91.9	87.1	4.8 (-0.3; 10.1)
7F	98.6	87.1	11.5 (7.4; 16.1)
19A	99.3	87.1	12.2 (8.3; 16.8)
Serotip v cepivu Prevenar z najnižjim deležem odziva v študiji 006 je bil 6B (87.1%)			

specifičnih protiteles proti vsem posameznim serotipom, razen proti serotipu 6B in 23F, kjer je bilo z imunskimi testi dokazana slabša imunogenost. Kljub temu, da poznamo več kot 90 različnih streptokoknih serotipov, pa je 10-15 tistih, ki povzročajo 90% vseh vnetij srednjega ušesa. Zatorej Synflorix serološko pokriva večji del spektra najbolj patogenih serotipov. V študiji so dojenčki prejeli dva odmerka. V skupini cepljenih otrok, primerjalno proti skupini, ki ni bila cepljena, so ugotovili signifikantni padec okužn srednjega ušesa, ki je posledica bakterijskega vnetja. Ker so okužbe srednjega ušesa med otroci do tretjega leta starosti najpogostejši vzrok za obisk pri zdravniku, je pomembno vsako zmanjšanje števila otrok z vnetjem srednjega ušesa (10).

Prevenar 13

Prevenar 13 je sodobno konjugirano cepivo proti vnetju srednjega ušesa, oziroma proti boleznim, ki jih povzroča *Streptococcus pneumoniae* serotipov 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F in 23F, konjugirani na nosilni protein CRM197, ki vključuje sepso, meningitis, pljučnico in bakteriemijo. Prevenar 13 vsebuje najširši spekter patogenih pnevmokoknih serotipov, saj ima kar 6 več od Prevenarja, ki ga uvrščamo med konjugirana cepiva prve generacije. Od cepiva Synflorix se razlikuje po treh dodatnih pnevmokoknih polisaharidnih serotipih. Njegovo široko imunogenost prikazuje preglednica 2 (11):

Z vsemi tremi pnevmokoknimi cepivi: prevenar, Prevenar 13 in Synflorix imamo na voljo dovolj pestro izbiro sodobnih cepiv proti vnetju srednjega ušesa, ki je povzročeno z bakterijskimi patogeni. Cepljenje proti okužbam

patogenov, ki povzročajo vnetje srednjega ušesa je torej ekonomsko, etično in epidemiološko upravičeno.

4 Literatura

1. Miha Likar: Cepiva danes in jutri (2004). Arkadija, 12-23. (ISBN: 9616451065)
2. Casselbrant ML, Mandel EM, Jung J, Ferrell RE, Tekely K, Szatkiewicz JP, Ray A, Weeks DE (2009). "Otitis media: a genome-wide linkage scan with evidence of susceptibility loci within the 17q12 and 10q22.3 regions". BMC Medical Genetics 10: 85.
3. Rovers MM, Schilder AG, Zielhuis GA, Rosenfeld RM (2004). "Otitis media". Lancet 363: 564-573
4. Rosenfeld RM, Culpepper L, Yawn B, Mahoney MC (2004). "Otitis media with effusion clinical practice guideline". Am Fam Physician 69 : 2778-9
5. Cripps AW, Otczyka DC, Kydb JM. (2005) Bacterial otitis media: a vaccine preventable disease? Vaccine; 23:2304-2310.
6. Pichichero ME (2005). Evolving Shifts in Otitis Media Pathogens: Relevance to a Managed Care Organization. Am J Manag Care. 11:S192-S201.
7. Pollard A.J., Perrett K.R. Beverley P.C. (2009): Maintaining protection against invasive bacteria with protein-polysaccharide conjugate vaccines. Nature Reviews Immunology 9, 213-220
8. Nossal G.J. Vaccines of the future. (2011). Vaccine. ;29 Suppl 4:D111-5.
9. Westerink MA, Schroeder HW Jr, Nahm MH. (2012): Immune Responses to pneumococcal vaccines in children and adults: Rationale for age-specific vaccination. Aging Dis. 3:51-67.
10. Prymula R, Schuerman L. (2009). 10-valent pneumococcal nontypeable Haemophilus influenzae PD conjugate vaccine: Synflorix. Expert Rev Vaccines. 8:1479-500.
11. Prevenar 13 (2010) EPAR Povzetek glavnih značilnosti zdravila (SmPC)