

Moderní technologie výroby vakcín. Část II.

(A plethora of hi-tech vaccines - genetic, edible, sugar glass, and more. Special report).

Maurice John, Children's Vaccine Initiative (CVI)
CVI Forum, č. 18, July 1999, s. 5-23.
Volně přeložil a zkrátil MUDr. Plesník

V první části byly podány informace o DNA vakcínách a o tzv. jedlých vakcínách z geneticky pozměněných rostlin, obsahujících vakcinální antigeny. V této závěrečné části bude popsán výzkum tzv. cukrových vakcín a možnosti perkutánní vakcinace.

Před čtyřmi lety navštívil J. Lloyd jednu laboratoř, kde mu ukazovali jakousi jahodu. Aspoň tvrdili, že je to jahoda. Všechno co viděl byl však malý škraloupek na talířku. Po přidání několika kapek vody se škraloup změnil během pár vteřin na krásnou, zářivě červenou jahodu. Nejen že vypadal jako jahoda, také tak voněl a chutnal.

Lloyd, expert SZO na očkovací látky, začal pak hledat způsob jak využít trehalózy, látky odpovědné za tuto zázračnou přeměnu, k imunizaci. Na někdy hodně dlouhé cestě od výrobce k očkovanici jsou dnešní vakcíny chráněny před zkázou teplem a jinými faktory prostředí tím, že jsou lyofilizací vysušeny na prášek, nebo že jsou přechovávány v chladovém řetězci. Oba způsoby mají své nevýhody. Lyofilizace některé vakcíny poškozuje a při rekonstituci lyofilizátu je riziko kontaminace z nesterilního zacházení. Udržování chladového řetězce je nákladné a u velkého množství vakcíny, potřebného pro hromadné očkování, je velice obtížné.

Zdálo se, že trehalóza bude vhodným řešením těchto potíží. Podobně jako disacharidy (sukróza, maltóza, laktóza a glukóza) je i trehalóza přítomna v různých biologických tkání, tak řečeno od žampionů po savce. Organismy využívají zásob energie v těchto uhlovodanech k přežití extrémního sucha, nebo chladu. Např. některé rostliny pouští, jako vraneček (*Selaginella*), pomocí trehalózy přežívají celé měsíce v naprosto vyschlé podobě. Červ *Ditilenchus dipsaci* byl po 23 letech dormance ve vyschlém stavu oživen několika kapkami vody. Bakterie, houby a další organismy objevily tento způsob přežití, učeně zvaný "anhydrobióza" (život bez vody), již před několika miliardami roků.

Zdá se, že trehalóza je uhlovodík široce využívaný živými tvory s přirozeným sklonem k dočasnému nežití. Trehalóza je velmi vhodná k obnově vyschlých biologických tkání do jejich původní podoby a fyziologického stavu. Má schopnost přecházet během chlazení nasyceného roztoku z tekutého stavu do viskózního a nakonec do pevné, sklu podobné struktury. Toto uhlovodíkové "sklo" imobilizuje, konzervuje a chrání bílkoviny a další molekuly z roztoku v podstatě stejným způsobem, jako jantar konzervuje prehistorický hmyz. Sklo se stykem s vodou snadno rozpouští

uvolňuje svůj obsah, který rychle nabývá původní tvar a funkce.

Trehalóza se užívá (hlavně v Japonsku) k prezervaci a slazení potravin a nápojů. V medicíně slouží k uchování tkáně rohovky před transplantací a při krevních převodech. V r. 1990 byly zahájeny práce na využití trehalózy k přípravě vakcín.

- 2 -

Možností je celá řada:

- * vakcíny v podobě skelných jehel, obsahujících antigeny proti různým infekčním agens. Jehly se zavedou do kůže, kde se po styku s podkožní tekutinou okamžitě rozpouští a uvolňují antigen v množství určeném chemickým složením roztoku trehalózy. Tyto "jehly", jsou samy o sobě vakcínou.
- * výroba v podobě niti, která může být ihned rekonstituována ve fyziologickém roztoku, nebo rozdrčena na droboučké střípky, působící v kůži jako mikroskopické jehličky.
- * po vysušení horkým vzduchem, nebo ve vakuu, vzniká pěna nebo jemný prášek, který může být fouknut do nosu, nebo vpraven do kůže tlakovým injektorem, případně v podobě aerosolu nastříkán do nosu či úst.
- * sprej odvodněná v ultrazvukovém nebulizéru dává vznik droboučkým sklovitým kuličkám (mikrosférám), obalujícím vakcinální antigeny. Lze je podávat orálně.
- * aplikace v podobě suspence v hydrofobním roztoku (parafinový olej, sezamový olej, etyloléat) pro okamžitou aplikaci, nevyžadující rekonstituci obvykle práškovité substance.

U žádné z těchto trehalozových podob vakcín nedochází ni po dlouhém působení tepla nebo chladu k detekovatelnému úbytku potence. Např. toxoidy DiTe si během skladování až při 60°C po dobu jednoho roku zachovaly původní aktivitu, pertusový bakterin při 37°C až 3 měsíce a při 60°C až měsíc. Spalničková vakcína i v lyofilizované podobě ztrácí více než 90% své potence je-li uložena dva měsíce při pokojové teplotě. Za stejných podmínek však její trehalozový prášek neztratil nic na potenci. Dokonce ani uložení vakcín proti chřipce a tetanu při -70°C po dobu devíti měsíců nemělo nepříznivý vliv na jejich potenci. Ani aluminiumhydroxid, adjuvans vakcín, nedoznal následkem vysušování trehalózou žádné poškození. Nevýhodou tohoto postupu však je, že nelze jej užít u živých, celovirionových vakcín, např. u orální poliovakcíny. Někdy trehalóza nedokáže proniknout u některých virů do všech jejich koutů a štěrbin, vyplněných molekulami vody. Odborníci, kteří se obeznámili s možnostmi trehalózy, jsou přesvědčeni o její výhodnosti. V lednu 1999 byl zahájen projekt "cukrové vakcíny", plánovaný na dva roky a s rozpočtem 200. 000 USD. Jsou však nejméně dvě velké překážky. Jednou z nich je to, že trehalóza je považována za intelektuální majetek a stala se příčinou řady sporů biotechnologických podniků na obou stranách Atlantiku. Druhou

je, že i když někteří výrobci vakcín uskutečnili velmi úspěšné pokusy s těmito typy vakcín, využití technologického postupu lze očekávat jen u menšího počtu výrobců, zásobujících vakcínami rozvojové země s extrémními rozdíly teplot

Překážkou může být i vyšší cena vakcín s trehalózou. Naděje na nižší výrobní náklady vyvolali japonští výzkumníci, kterým se podařilo získávat velká množství trehalózy ze škrobu.

V současnosti se právníci snaží odstranit právní překážky ve využití tohoto objevu.

- 3 -

Náplastové vakcíny

Jak říká jedno přísloví "Krása je pouze povrchní", ale často může být počátkem i hlubšího vztahu. Podobné je to i s vakcínami přinejmenším podle názoru amerických odborníků, kteří vidí v epidermis ideální cestu k imunitnímu systému těla.

Začali očkovat dobrovolníky náplastmi napuštěnými cholera toxinem (CT). Ten je silným stimulem imunitního systému a když se zbaví toxicity může být výborným adjuvans pro řadu kandidátních vakcín (ve většině pokusů s CT na zvířatech byla užívána netoxická subjednotka CT). Ani na zvířatech, ani v pilotních studiích u lidí nepozorovali výzkumníci žádné známky toxicity po podání CT prostřednictvím kožních náplastí. Cholera toxin je nebezpečný jen za určitých podmínek. Je-li podán orálně bez neutralizace kyselosti žaludeční šťávy bikarbonátem, může vyvolat průjem. Infuze dostatečně koncentrovaného roztoku může způsobit pneumonii. Byl-li však podán v kožní náplasti, došlo k imunizaci bez jakýchkoliv známek toxicity. U pokusných zvířat (myš, morče, králík, kočka, pes) vedlo vždy 15-ti minutové přiložení náplasti napuštěné CT k výrazné a široké imunitní reakci. Vyšetření za 2 týdny po jediné aplikaci náplasti prokázalo jak protilátkovou, tak buněčnou odpověď. Protilátky byly nalezeny nejen v séru, ale i ve střevní sliznici. Podobné výsledky byly získány i s jinými bakteriálními toxiny (termolabilním enterotoxinem E. coli).

Není jasné proč tyto silné toxiny ztrácí po nanesení na kůži svou toxicitu. Možnou příčinou se zdá okolnost, že toxiny neproniknou do hlubších vrstev kůže, nebo do svalů, kde by mohly způsobit těžký zánět.

Bylo užito směsi CT s vakcinálním antigenem. Až dosud bylo takto testováno asi 30 antigenů, včetně původců tetanu, záškrtu chřipky a vztekliny. Vždy se objevila imunitní reakce jako proti CT, tak zkoumanému vakcinálnímu antigenu. Ukázalo se, že navlhčení kůže před přiložením náplasti výsledek ještě zlepšuje. Asi proto, že dojde k lepší prostupnosti vrstvičky odumřelých buněk (stratum corneum) na samém povrchu epidermis.

Epidermis se jeví jako výjimečně vhodná přístupová cesta k imunitnímu systému. Má extrémně velkou koncentraci (až 1000/mm²) buněk podílejících se na imunitních pochodech, tzv. Langerhansových nebo dendritických buněk. Ty tvoří 25% celkového kožního obalu těla. Jejich úkolem je předkládat cizorodé antigeny imunitnímu systému. Dojde-li následkem

styku s cizorodým antigenem (např. CT) k aktivaci těchto specializovaných antigen-předkládajících buněk, ty jej dopraví do nejbližších mízních uzlin a vyvolají velkou škálu imunitních pochodů v celém imunitním systému. Tato "transkutánní imunizace" se stala hlavní náplní výzkumu několika pracovišť. V pilotních studiích na dobrovolnících bylo ověřeno, že ani šestihodinové ponechání náplastové vakcíny na kůži nevyvolává žádné nežádoucí změny kůže či celkového stavu očkovanice. Současná druhá fáze studie je zaměřena na průkaz vzniku ochrany po náplastové vakcíně. Očekává se, že budou potvrzeny dobré výsledky získané pokusy na zvířatech. Transkutánní imunizace, zanechávající neporušenou kůži a nevyžadující žádné odborné znalosti, je ideální pro očkování v obtížných podmínkách např. v tropech, utečeneckých táborech atd. Lze užít současně několika náplastí s různými antigeny, imunitní reakce je možné

- 4 -

zvýšit přilepením několika náplastí na různá místa těla, drenážovaná různými lymfatickými uzlinami.

Jiná skupina výzkumníků užívá místo bakteriálních toxinů k aplikaci genových vakcín roztok s adenovirem, který se natírá přímo na kůži, nebo se jím napustí náplast.

Tím však výzkum není zdaleka vyčerpán. Imunogenitu vakcín silně ovlivňuje vhodné adjuvans. Jedno z nejstarších a pořád užívaných je aluminium hydroxid, který stěží nachází konkurenci. Při téměř stovce zkoumaných látek si uchoval vedoucí postavení i u velkých firem, např. SKB.

25 citací, originál v knihovně epid. odd. KHS Ostrava

Poznámka překladatele

Tento článek ("Special Report") je labutí písní nepravidelně vycházejícího občasníku, který vydával sekretariát seskupení Children's Vaccine Initiative (CVI) od r. 1990. Jeho neformálními členy byla různá občanská sdružení, nestátní a privátní zařízení i výrobci vakcín. Podporu dostávalo také od UNICEF, Spojených národů, SZO, Světové banky a Rockefellerovy nadace. Cílem CVI bylo prohlubovat ochranu před infekcemi zdokonalováním již existujících a vývojem nových vakcín tak, aby byly nejen bezpečné a účinné, ale i snadno aplikovatelné v obtížných podmínkách terénu. Koncem r. 1999 však sekretariát CVI končí svou činnost, jak jinak, než pro nedostatek financí. Problémy s financováním zdravotnictví nejsou jen naší specialitou.

Myslím, že závěrečný článek je brilantní ukázkou nových cest které má imunizace (spolu s Vámi) před sebou.