

Rekombinante Allergene

Maßgeschneidert für den Patienten

Welch wichtige Rolle rekombinante Allergene bei der Hyposensibilisierung spielen und wie die Zukunft der Immuntherapie aussehen könnte, erläutern

Dr. med. Philipp Schendzielorz und Prof. Dr. med. Ludger Klimek, Wiesbaden.

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist neben der Allergenkarenz die einzige Behandlungsform, die ursächlich den Verlauf allergischer Erkrankungen, insbesondere den der allergischen Rhinokonjunktivitis, positiv beeinflussen kann. Dabei existieren unterschiedliche Herstellungsverfahren für die Therapieextrakte. Einerseits werden nicht modifizierte, „native“ Allergene mit unveränderter Konformität, andererseits chemisch modifizierte Allergene (Allergoide) für die Therapie verwendet. Durch Kopplung an Trägersubstanzen wie Aluminiumhydroxid, Tyrosin oder Kalziumphosphat entstehen Semidepotextrakte. Alle bislang zur SIT verfügbaren Extrakte weisen allerdings Nachteile auf. Diese sind einerseits begründet in der Gewinnung dieser Extrakte aus natürlichen Quellen, andererseits in der möglichen Auslösung allergischer Nebenwirkungen durch die Therapie. Mehrere Forschungsgruppen haben sich daher in den letzten Jahren mit der Produktion und molekularen sowie klinischen Untersuchung von rekombinanten Allergenen beschäftigt. Hierbei unterscheidet man rekombinante Wildtyp-Allergene, die genau die Eigenschaften des natürlichen Allergens imitieren, von rekombinanten Allergenen, die eine modifizierte Form des natürlichen Allergens darstellen.

Gute Standardisierbarkeit

Letztere verfügen über vorteilhafte Eigenschaften wie eine verminderte allergische Aktivität und also verminderte Nebenwirkungen oder eine erhöhte Immunogenität und somit verbesserte Wirksamkeit oder eine Kombination aus beiden Eigenschaften. Beide haben den Vorteil einer besseren Standardisierbarkeit des Herstellungsverfahrens und der

Möglichkeit einer großtechnischen und daher relativ preisgünstigen Produktion.

Die bisher zur SIT verfügbaren Extrakte entstehen durch herstellereigenspezifische Prozessierung und werden aus natürlichen Allergenquellen (z.B. Milbenkultur, gesammelte Birkenpollen in einer Birkenschonung etc.) gewonnen. Sie werden mittels In-vitro-Methoden auf ihre Gesamtaktivität und den Gehalt an Majorallergenen überprüft und z.B. durch Hauttests biologisch standardisiert. Es handelt sich aber immer um „Naturprodukte“, deren Zusammensetzung und Allergenaktivität erheblich vari-



Dr. med. Philipp Schendzielorz

Grafik: Klimek

Genau Bewertung der spezifischen Eigenschaften möglich

Die rekombinanten Allergene bieten hingegen in vielerlei Hinsicht Vorteile gegenüber den nativen Extrakten. Die rekombinant hergestellten Moleküle ermöglichen eine präzise physikalische, chemische und immunologische Definition und machen eine genaue Bewertung der spezifischen Eigenschaften möglich. So könnten auch die Wirkmechanismen bei der Anwendung besser beobachtet und erforscht werden. Zudem können die-



Prof. Dr. med. Ludger Klimek

ieren können. Somit variiert auch die biologische Potenz. Bei Hausstaubmilben-Präparaten ist beispielsweise die Zusammensetzung und Qualität abhängig von der Kultur und der Weiterverarbeitung. Teilweise werden das Medium und die Abbauprodukte mit verwendet. Dadurch kann es zu Kontaminationen und zu Wirkungsverlust kommen. Pollen können durch klimatische Faktoren und durch Umweltverschmutzung beeinflusst werden. Es besteht außerdem die Gefahr der Kontamination mit bakteriellen Endotoxinen und anderen Kontaminanten. Neben den Allergenen sind oft viele andere Proteine in den Cocktails enthalten. Einige von diesen können theoretisch zu Neusensibilisierungen führen. Proteasen können die Haltbarkeit des Extraktes beeinflussen.

se Allergene pharmakologisch standardisiert und reproduzierbar hergestellt werden. Es kann eine höhere Reinheit im Gegensatz zu den nativen Extrakten erreicht werden und die Allergenmengen können auf der Basis von Mass-Units leicht definiert werden. Somit wäre es dann auch möglich, die einzelnen Präparate unterschiedlicher Firmen besser untereinander zu vergleichen.

Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, die zur Anwendung in den Therapieextrakten hergestellten Allergene gezielt so zu verändern, dass sie sogenannte „hypoallergene“ Eigenschaften aufweisen (hypoallergene rekombinante Allergene). Ebenso ist eine Steigerung der immunologischen Wirksamkeit durch andere Modifikationen denkbar. Letztlich könnte sogar eine patientenindividuelle SIT-Lösung hergestellt werden, die dann exakt gemäß dem Sensibilisierungsprofil des Patienten maßgeschneidert produziert wird.

Entscheidende Auswahlkriterien bei der Herstellung rekombinanter Allergene sind Häufigkeiten von Sensibilisierungen in der Bevölkerung, die klinische Relevanz, das Ausmaß der IgE-Antwort und die Anzahl der vorhandenen IgE-Epitope im Molekül. Besonders untersucht wurden in den vergangenen Jahren Allergene von Baumpollen, Gräserpollen und Hausstaubmilben.

Bei den Baumpollen stellt in Deutschland die Birke das relevanteste Allergen dar. Im Fall der Gräserpollen gibt es hingegen alleine schon mindestens elf genau identifizierte und charakterisierte klinisch relevante Majorallergene. Diese werden als Gruppenallergene erfasst und haben eine unterschiedlich hohe Wertigkeit hinsichtlich des Vorkommens von Sensibilisierungen in der Bevölkerung. Zurzeit werden unter den mehr als 20 Allergengruppen der Hausstaubmilben die Gruppen 1 und 2 (*D. pteronyssinus* und *D. farinae*) als die wichtigsten angesehen. Neben diesen häufigen Allergenen wurde Fel d 1 als Katzen-Majorallergen und Api m 1 (Phospholipase A2) als Bienengift-Majorallergen in klinischen Studien untersucht. Bei einer Beifußallergie bietet sich Amb a 1 für die klinische Anwendung an.

Um die gewünschte DNA-Vorlage für das Allergen zu erhalten, müssen einige Schritte erfolgen:

▶ Extrahierung von Allergenextrakten Von Allergenextrakten wird mRNA extrahiert und mittels des Enzyms Reverse Transkriptase wird die zugehörige cDNA produziert. Daraufhin werden mithilfe von Phagen cDNA-Banken angelegt. Durch IgE-Immunoscreening mit Patientenserum werden aus den cDNA-Banken die biologisch aktivsten Isoformen ausgewählt. Diese cDNA können nun als Vorlage zur Erstellung des Proteins genutzt werden.

▶ Exprimierung der cDNA in einem Vektor

Im nächsten Schritt wird die cDNA in einem passenden Vektor (veränderter Viruspartikel) eingefügt. Mit dessen Hilfe wird die cDNA in einen geeigneten Fremdorganismus eingeschleust (Transduktion). Als Empfängerorganismus wird häufig das Bakterium *Escherichia coli* verwendet. In dem Bakterium kann nun das rekombinante Protein synthetisiert werden. Allerdings wird so nur ein Protein ohne posttranslationale Modifizierung erstellt. Wenn jedoch eine identische Faltung oder Glykosylierung gewünscht ist, sollten andere Organismen wie die Hefe *Pichia pastoris* verwendet werden.

▶ Erstellung und Qualitätskontrolle der exprimierten Proteine

Das erstellte rekombinante Protein wird der Kultur entnommen und durch chromatographische Methoden gereinigt. Entscheidend ist, frem-

gen mit rekombinanten Allergenen auf eine verbesserte und schnellere Wirkung (signifikant reduzierte Symptom-Medikation-Scores) hin. Zudem konnten Veränderungen immunologischer Parameter sowie günstige Sicherheitsprofile vergleichbar mit der herkömmlichen SIT festgestellt werden. Diese Ergebnisse liegen vor allem für Gräser- und Birkenpollen-Allergiker vor. Inwiefern hypoallergene rekombinante Allergene aufgrund ihrer in immunologischen Grundlagenexperimenten gezeigten niedrigen allergischen Aktivität auch zu weniger Nebenwirkungen führen, muss noch weiter klinisch untersucht werden.

Erfolgreiche Ergebnisse erster Studien

Die erfolgreichen Ergebnisse erster klinischer Studien mit rekombinanten Allergenen lassen den Rückschluss zu, dass eine spezifische Immuntherapie mit rekombinanten Allergenen nach den gleichen Prinzipien wie bei einer SIT mit natürlichen Extrakten stattfinden kann. Zukünftige Arbeiten werden weiter die molekularen Eigenschaften, die Wahl der passenden Allergene, die optimale Dosisfindung und die klinische Wirksamkeit bzw. Sicherheit der SIT mit rekombinanten Allergenen objektiv untersuchen müssen. Des Weiteren ist es notwendig, frühe biologische bzw. immunologische Marker für den klinischen Erfolg

Rekombinante Allergene : Die Herstellung optimierter Therapieextrakte wird ermöglicht

1. Nur relevante Allergene werden berücksichtigt
2. Optimierte Dosierung der relevanten Allergene
3. Hohe Reinheit der Allergenextrakte (keine Salze, Mediatoren, Farbstoffe) – dadurch weniger Neusensibilisierungen
4. In vitro in unbegrenzter Menge herstellbar

de Proteine und Endotoxine zu entfernen. Zur Qualitätskontrolle der rekombinanten Allergene wird eine ganze Reihe von analytischen Methoden durchgeführt. Man überprüft die Identität, die Reinheit, die Konzentration und Potenz der Proteine bis hin zur Messung der Aktivierung von Basophilen oder der T-Zell-Reaktivität. Letztlich ist entscheidend, dass eine Master-Zellbank angelegt wird, die die genaue DNA, den verwendeten Vektor und Fremdorganismus beinhaltet. Jede erneute Produktion verwendet nun die Zellen dieser Master-Zellbank.

Mögliche Modifizierungen

Neben der Produktion von rekombinanten Wildtyp-Allergenen besteht die Möglichkeit, hypoallergene rekombinante Allergene zu erstellen. Das Ziel ist vor allem, eine Reduzierung der IgE-Aktivität durch Zerstörung oder Ausschaltung von B-Zell-Epitopen sowie eine Erhöhung der Immunogenität durch eine verbesserte T-Zell-Aktivierung. Zusammenfassend deuten die Ergebnisse erster klinischer Beobachtun-

einer SIT zu finden und zu definieren. Zusammenfassend könnten die modifizierten hypoallergenen rekombinanten Allergene (einschließlich konjugierter Allergene und der Peptidtherapie) folgende Vorteile bieten:

1. Reinheit der Allergenpräparate ohne irrelevante andere Proteine oder Kontaminationen
2. Exakte, reproduzierbare Produktion
3. Möglichkeit der Mischung unterschiedlicher Allergene derselben Familie mit adäquaten Mengenanteilen
4. Standardisierung und Vergleich der einzelnen Präparate untereinander
5. Niedrigere allergische Aktivität und somit eine höheres Sicherheitsprofil
6. Höhere Immunogenität, die zu besserer und längerer Wirksamkeit führt
7. Patientenfreundliche Applikation
8. Auf Patienten zugeschnittene Immuntherapie
9. Möglicherweise prophylaktische Strategien in der Immuntherapie