

Farmacocinetica di un allergene e di un allergoide monomero per terapia oromucosale in volontari allergici

M. BAGNASCO, G. PASSALACQUA*, G. VILLA†, C. AUGERI†, G. FLAMIGNI†, E. BORINI, P. FALANGIANI‡, G. MISTRELLO‡, G.W. CANONICA* E G. MARIANI†

Allergia ed Immunologia Clinica, *Allergia e Malattie Respiratorie e †Servizio di Medicina Nucleare, Dipartimento di Medicina Interna, Genova; ‡Lofarma S.p.A., Milano, Italia

Riassunto

Presupposti ed obiettivi - Le conoscenze in merito alla farmacocinetica degli allergeni per immunoterapia locale sono scarse. Per questo motivo, abbiamo studiato la farmacocinetica di un vaccino allergenico in compresse orosolubili disponibile in commercio (LAIS[®], Lofarma S.p.A.) in volontari allergici.

Metodi - L'allergoide monomero carbamitato, derivato dall'allergene principale della *Parietaria judaica* (Par j 1) e caratterizzato dal mantenimento delle dimensioni molecolari originali, e l'allergene nativo sono stati radiomarcati con ¹²⁵I e quindi incorporati nelle compresse solubili destinate al commercio, che sono state poi somministrate a soggetti allergici. Subito dopo la somministrazione, sono state effettuate delle scansioni sequenziali, mentre ulteriori rilevamenti tramite scintigrafia statica sono stati acquisiti in epoche successive, ed inoltre è stata misurata la radioattività plasmatica a diversi intervalli di tempo.

Risultati - A livello locale, non sono state riscontrate differenze tra la farmacocinetica dell'allergene e quella dell'allergoide; parte del tracciante è rimasta all'interno della bocca per almeno 2 ore dalla deglutizione. Non è stato possibile rilevare alcun assorbimento diretto da parte della mucosa orale, in quanto la radioattività plasmatica è aumentata solo in seguito alla deglutizione ed ha raggiunto il suo massimo 2 ore dopo. Comunque, il picco plasmatico raggiunto con l'allergoide in compresse è risultato significativamente più elevato rispetto al picco ottenuto con l'allergene nativo. Infine, in corrispondenza del picco plasmatico è stato possibile rintracciare costantemente una certa quantità di allergoide non degradato nel torrente circolatorio, mentre non sono state individuate tracce di allergene in quella sede.

Conclusioni - I risultati hanno indicato che l'allergoide e l'allergene in compresse si comportano in modo simile per quanto riguarda la cinetica a livello locale, mentre il picco plasmatico dell'allergoide è risultato più elevato rispetto a quello dell'allergene. Pertanto, concludiamo che la modifica chimica dell'allergene potrebbe avere delle ripercussioni sulla farmacocinetica, rendendo l'allergene stesso meno suscettibile nei confronti della degradazione enzimatica.

Parole chiave: Par j 1, allergoidi, farmacocinetica, immunoterapia locale, radiomarcatura

Clinical and Experimental Allergy, Vol. 31, pp 54-60, Presentato il 13 Ottobre 1999, Rivisto il 22 Novembre 1999, Accettato il 31 Marzo 2000.

Introduzione

Le vie di somministrazione locali (non iniettive) dell'immunoterapia allergenica (ITA) rappresentano un argomento di considerevole interesse scientifico, specialmente nei Paesi Europei [1].

Corrispondenza: Giorgio Walter Canonica, Servizio di Allergia e Malattie Respiratorie, Dipartimento di Medicina Interna, Padiglione Maragliano, Largo C. Benzi, 10, 16132 Genova, Italia. E-mail: gcanonica@qubisoft.it

Lo scopo generale della ITA non iniettiva è quello di minimizzare i rischi di effetti avversi che potrebbero manifestarsi in relazione alla somministrazione per via sottocutanea, fornendo ai pazienti una forma di ITA più confortevole e gradita. La letteratura disponibile dimostra l'efficacia della ITA nasale e sublinguale/da deglutire; sia l'Organizzazione Mondiale per la Sanità [2], sia l'Accademia Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica e la Società Europea di Allergologia ed Immunologia Clinica Pediatrica (EAACI/ESPACI) [3] indicano queste vie di somministrazione come possibili alternative alla IT iniettiva negli adulti.



Figura 1. Disegno dello Studio

Nella ITA sublinguale/da deglutire, al paziente viene richiesto di mantenere l'allergene (preparato come medicamento in gocce o in compresse solubili) sotto la lingua per 1 o 2 minuti, e quindi di deglutirlo. Questa via di somministrazione si è dimostrata efficace sia nel migliorare il quadro sintomatologico, sia nella riduzione della richiesta di farmaci di soccorso a fronte di effetti collaterali [4-9]. Inoltre, si è rivelata in grado di modulare l'infiammazione allergica a livello locale [9]. La definizione della farmacocinetica di un estratto allergenico da utilizzarsi nella ITA è una questione rilevante al fine di esplorare il meccanismo di azione ed ottimizzare lo schema posologico del preparato, specialmente in caso di somministrazione per vie locali. Ciò nonostante, i dati disponibili sull'argomento sono sparpagliati (ottenuti per lo più in modelli animali) e spesso i risultati che essi forniscono non sono conclusivi [10-12].

In uno studio recente, in cui l'allergene principale della *Parietaria Judaica* (Par j 1) è stato radiomarcato e somministrato a volontari sani [13], abbiamo dimostrato che l'assorbimento diretto dell'allergene attraverso la mucosa sublinguale non avviene, mentre una frazione rilevante della proteina persiste all'interno della bocca per un periodo di tempo sino a 24 ore dopo la somministrazione. In verità, la maggior parte della radioattività rilevata nel sangue deve essere attribuita alla frazione deglutita. Pur tuttavia, il suddetto studio è stato condotto in volontari sani ed in condizioni sperimentali, che risultano significativamente differenti dalla somministrazione del vaccino nella pratica clinica. Pertanto, abbiamo sentito la necessità di intraprendere la sperimentazione in oggetto, in cui si esamina la cinetica di un preparato disponibile in commercio, costituito da un vaccino contenente un allergene modificato, in volontari allergici.

L'allergoide monomero carbamitato, derivato dall'allergene principale della *Parietaria judaica* (Par j 1) è stato radiomarcato con iodio 123 (^{123}I) ed incorporato nelle compresse orosolubili destinate al commercio. La cinetica locale e sistemica è stata valutata in volontari allergici, rispettivamente mediante scansioscintigrafia e misurazione della radioattività plasmatica, e confrontata con la cinetica dell'allergene nativo.

Materiali e Metodi

Disegno dello studio

Il presente studio indaga l'assorbimento ed il destino dell'allergene Par j 1 radiomarcato con ^{123}I o dell'allergoide radiomarcato (^{123}I -Par j 1), somministrati sotto forma di compresse orosolubili ad otto volontari allergici e ad un soggetto sano. La cinetica dell'allergene radiomarcato all'interno della bocca durante e dopo la dissoluzione della compressa è stata valutata mediante scintigrafia con formazione di immagini dinamiche. L'assorbimento del tracciante è stato studiato mediante determinazione della radioattività plasmatica in tempi diversi. In corrispondenza del picco plasmatico di radioattività, sono stati effettuati anche dei gel-cromatogrammi. Gli esperimenti sono stati effettuati nel periodo compreso tra Luglio e Dicembre, affinché tutti i soggetti fossero asintomatici. Il disegno generale dello studio è schematizzato nella Figura 1.

Soggetti

Nove volontari (cinque uomini e quattro donne) di età compresa tra i 25 ed i 43 anni sono stati arruolati nello studio.

I parametri di laboratorio di routine (comprendenti gli ormoni tiroidei liberi ed i livelli plasmatici di tireotropina) valutati prima dell'inizio dello studio sono risultati nella norma per tutti i soggetti. Otto soggetti erano affetti da rinocongiuntivite stagionale esclusivamente dovuta al polline di *Parietaria*, come confermato mediante prick test (classe ++ o superiore) e RAST (classe 1). Al momento dello studio, tutti i soggetti erano asintomatici, non assumevano alcun farmaco e non erano mai stati sottoposti ad una ITA in precedenza. Il nono volontario non era affetto da atopìa.

L'assorbimento di iodio radiomarcato da parte degli ormoni tiroidei liberi è stato minimizzato grazie alla somministrazione di una soluzione satura di ioduro di potassio (20 gocce due volte al giorno nei 3 giorni precedenti lo studio) e di perclorato di potassio (200 mg., due capsule il giorno dello studio). Tutti i volontari hanno sottoscritto un consenso informato allo studio, il cui protocollo è stato approvato dal Comitato Etico del Dipartimento di Medicina Interna dell'Università di Genova.

Allergoide ed allergene radiomarcato con ^{125}I

L'allergene Par j 1 è stato ottenuto mediante trattamento di un estratto grezzo di *Parietaria Judaica* con una soluzione di $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 90%; il supernatante è stato quindi dializzato con 5 mM di NH_4HCO_3 ed eluito attraverso una colonna per cromatografia liquida ad alta pressione (C18, 13 x 300 mm, Deltapak Waters Italia, Milano, Italia) con acetonitrile/acido triluoroacetico (0.1%) ad una portata di 6 ml/min. Le frazioni contenenti Par j 1 (identificate con un anticorpo specifico) sono state raggruppate, liofilizzate e sottoposte a cromatografie ripetute, sino ad ottenere un unico picco con peso molecolare di 12.5 kDa (analisi SDS-PAGE). L'allergene è stato conservato come soluzione sterile in 0.15 M di soluzione salina tamponata con fosfato ad una concentrazione di circa 0.8 mg/ml. L'allergoide monomero corrispondente, che costituisce il principio attivo del prodotto in commercio, è stato preparato facendo reagire l'allergene con cianato di potassio a pH alcalino, per ottenere la carbamilazione selettiva degli α -amminogruppi dei residui di lisina [14]. È stato conservato come polvere liofilizzata. A differenza degli allergoidi polimerici (ottenuti mediante trattamento con formaldeide o glutaraldeide), gli allergoidi carbammati mantengono le dimensioni molecolari dell'allergene nativo: questa caratteristica li rende indicati per la somministrazione mucosale [11].

L'allergene (circa 30 μg) e l'allergoide (circa 120 μg) sono stati radiomarcati con il metodo iodogeno [15] utilizzando 185-300 MBq (5-8 mCi) di ^{125}I privo di trasportatore (Nyeomed-Amersham-Sorin Radiopharmaceuticals, Saluggia, Vercelli, Italia) con attività specifica di 7400 TBq/ μM o 200 Ci/ μM . Lo ioduro di ^{125}I che non ha reagito è stato rimosso mediante successiva gel filtrazione attraverso colonne preconfezionate PD 10 Sephadex G-25 M (Pharmacia, Uppsala, Svezia). Le proteine finali radiomarcate erano caratterizzate da una radioattività specifica di 0.9-1.5 MBq/ μg (25-40 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Gli esperimenti preliminari effettuati tramite marcatura con ^{125}I hanno dimostrato una stabilità notevole nei confronti della deiodizzazione delle proteine radiomarcate, che perdura per parecchi giorni, sia in soluzione salina fisiologica, sia nel siero.

Lo iodio ^{125}I è stato scelto per le sue proprietà fisiche (emissione γ principale a 159 keV, emivita 13.2 ore). Un volume di tracciante pari a 50 μl (corrispondente a 50-100 μCi) è stato in seguito fatto assorbire dalle compresse mediante una micropipetta. Ciascuna compressa era caratterizzata dalla stessa composizione di quelle immerse in commercio per l'immunoterapia (LAIS, Lofarma S.p.A., Milano, Italia); lattosio, cellulosa microcristallina, biossido di silicio e magnesio stearato. La durezza delle compresse (determinata mediante durometro) risultava compresa tra 5 e 7 kg, corrispondente ad un tempo di dissoluzione pari ad 1 o 2 minuti.

Procedura di somministrazione

Ciascuno dei soggetti ha ricevuto una compressa contenente la proteina radiomarcata, così come avviene nel corso normale dell'immunoterapia. La compressa doveva essere sciolta in bocca e, una volta dissolta, deglutita. Ciascuno dei soggetti ha ricevuto circa 1-2 μg di allergene/allergoide Par j 1 per somministrazione, corrispondente ad una dose di radioattività di 1.8-3.7 MBq (50-100 mCi). Le compresse sono state somministrate entro 60 minuti dalla radiomarcatura. Sono state acquisite immagini dinamiche mediante scintigrafia, effettuata mentre la compressa era in fase di scioglimento e protratta sino a 20 minuti dopo la somministrazione. In seguito, il soggetto era autorizzato a muoversi, deglutire e risciacquare la bocca.

Dati acquisiti mediante scintigrafia

Per l'acquisizione di dati mediante scintigrafia è stata utilizzata una fotocamera a raggi gamma caratterizzata da un campo visivo di larga portata (SP6, Elscint, Haifa, Israele). I dati acquisiti mediante scintigrafia effettuata immediatamente dopo la somministrazione di ^{125}I Par j 1 erano costituiti da una serie di immagini sequenziali registrate in continuo ad una frequenza pari ad 1 immagine ogni 10 secondi, riprese mentre le compresse si scioglievano e per un periodo massimo di 20 minuti. Durante la fase di acquisizione di dati mediante scintigrafia dinamica, la testa del soggetto veniva mantenuta in prossimità del collimatore della fotocamera a raggi gamma. Successivamente alla formazione di immagini dinamiche effettuata nella fase iniziale, delle singole immagini (scintigrafia a formazione di immagini statiche) della testa, del torace e dell'addome sono state registrate 20 minuti, 1 ora, 2 ore, 3 ore e, in tre casi, 18 e 24 ore dopo la somministrazione del tracciante.

Prelievo di campioni di sangue e determinazione delle specie marcate

Durante lo studio, da ciascuno dei soggetti allergici sono stati prelevati dei campioni di sangue venoso di quantità pari a 5 ml, con impiego di provette eparinizzate. Tutto il plasma è stato separato mediante centrifugazione e suddiviso in unità 1 ml ciascuna, le quali sono state sottoposte a misurazione del contenuto radioattivo in un contatore a raggi gamma di tipo a pozzo. Inoltre, è stata effettuata l'analisi delle specie radioattive circolanti nel plasma (nei campioni ottenuti 1 ora e 2 ore dopo la somministrazione) mediante gel-filtrazione, utilizzando delle colonne PD-10 preconfezionate (Sephadex G-25), come descritto in precedenza [13].

PAR ALLERGOIDE

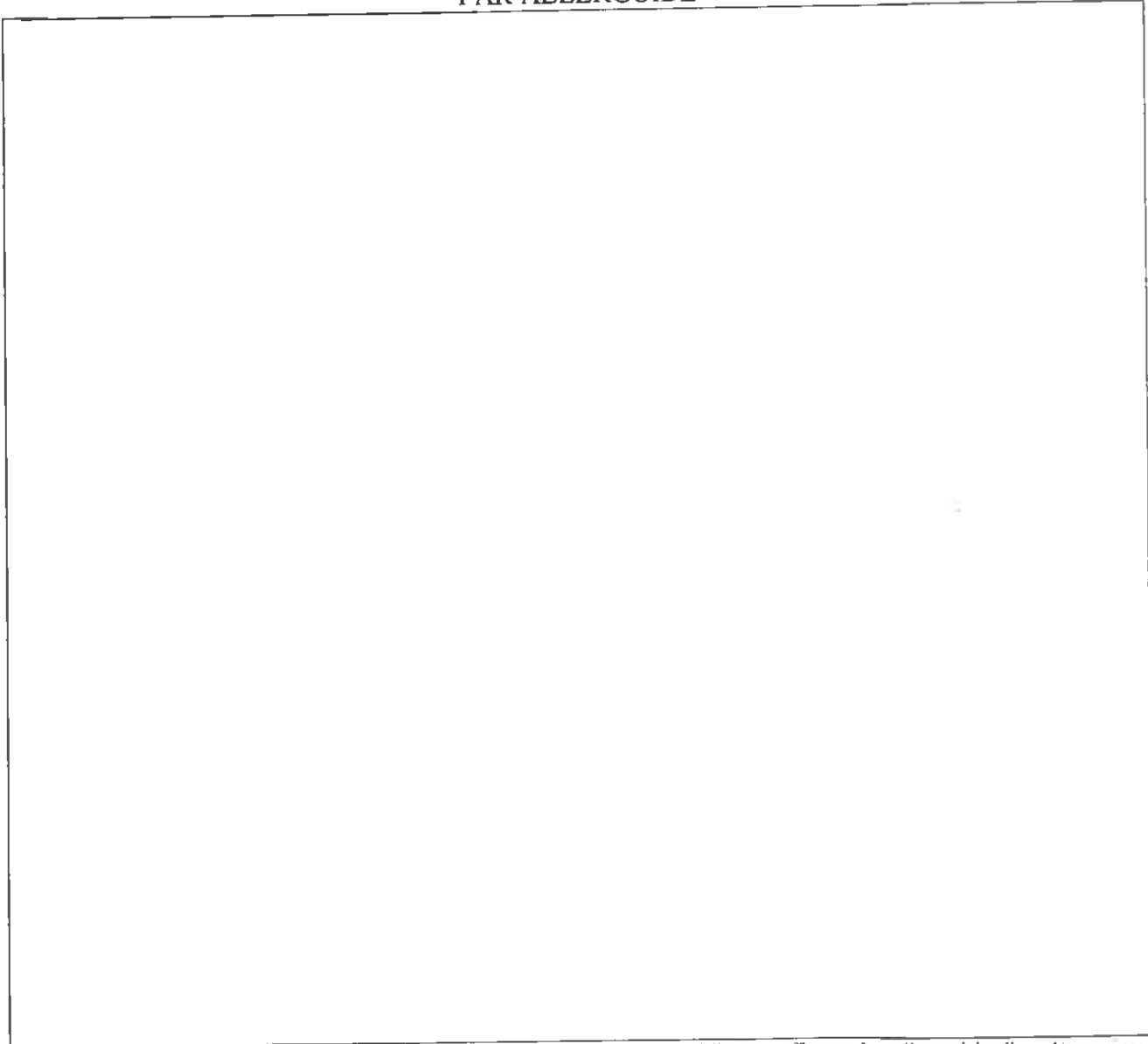


Figura 2 - Immagini acquisite mediante scintigrafia a formazione di immagini statiche della testa, effettuata 1 ora (immagini nella parte superiore della Figura) e 2 ore (immagini nella parte inferiore della Figura) dopo la somministrazione della compressa contenente l'allergoide radiomarcato. La vista laterale (sul lato sinistro della Figura) e la vista frontale (sul lato destro della Figura) mostrano la persistenza di radioattività all'interno della bocca, persino dopo il risciacquo di quest'ultima.

Risultati

Delle attività specifiche comparabili sono state ottenute sia con l'allergene Par j 1, sia con l'allergoide. Il profilo cromatografico dell'allergene radiomarcato è risultato altamente simile a quello dell'allergoide radiomarcato e coincidente con i dati ottenuti nel nostro studio precedente [13]. Non è stato riscontrato alcun effetto avverso imputabile alla somministrazione delle proteine radiomarcate.

Nei tre soggetti che sono stati sottoposti a scintigrafia tra le 18 e le 24 ore dopo la somministrazione è stata riscontrata la registrazione di una quantità minima di radioattività nella ghiandola tiroide, malgrado l'avvenuta somministrazione della terapia tiro-bloccante.

Immagini risultanti dalla scintigrafia

La formazione di immagini dinamiche durante la fase iniziale (pochi minuti dopo la somministrazione, mentre le compresse venivano disciolte) non ha mostrato alcuna modifica del contenuto radioattivo all'interno della bocca.

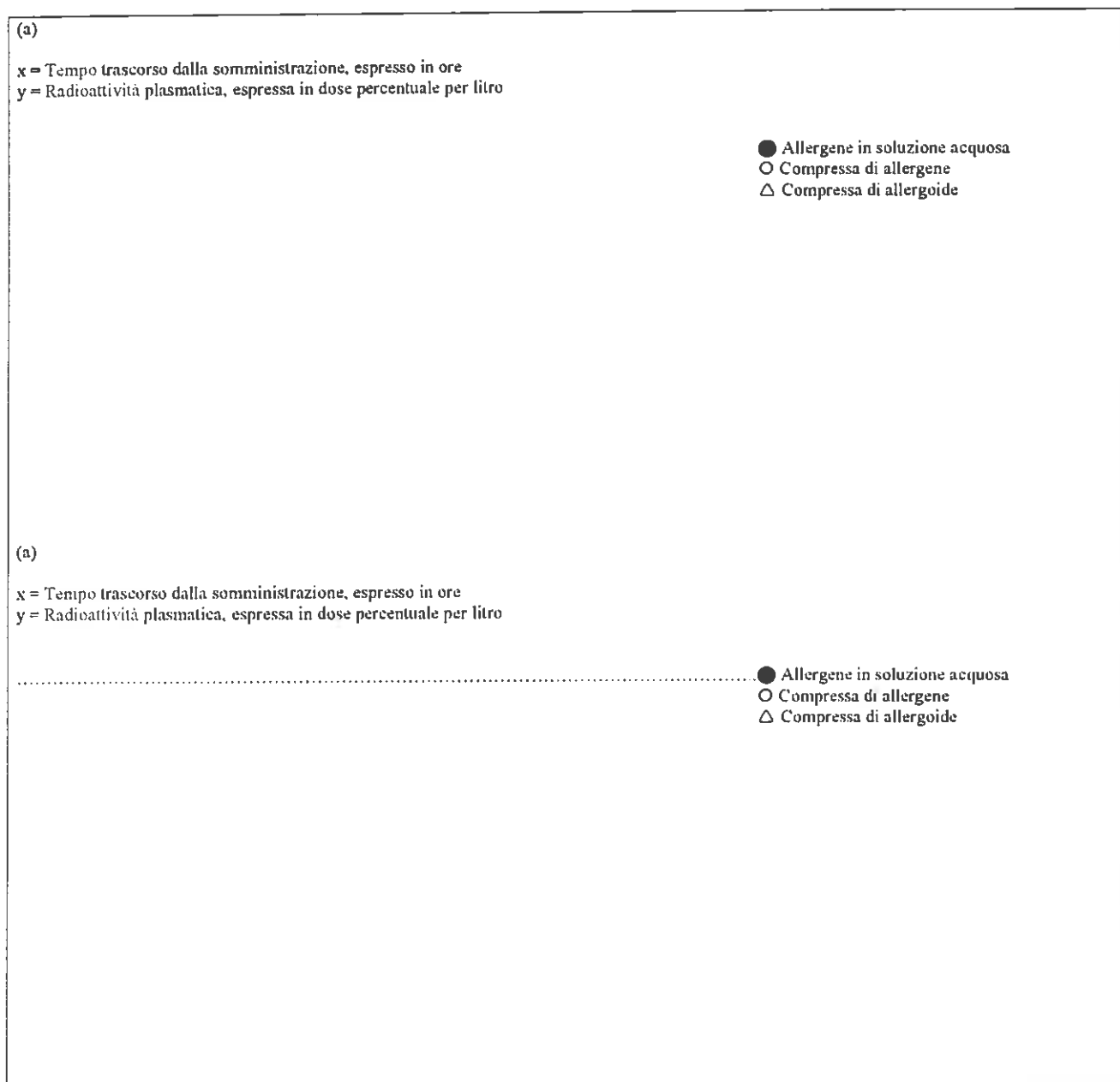


Figura 3 - Radioattività plasmatica (espressa come dose percentuale per litro \pm SEM) a tempi diversi, dal tempo 0 a 3 ore (a) e dal tempo 0 a 18 ore (b) dopo la somministrazione dell'allergene e dell'allergoide in compresse. Ai fini della comparazione, è stato tracciato anche l'andamento della cinetica dell'allergene somministrato sotto forma di soluzione acquosa (casistica storica [13]). ● = Allergene in soluzione acquosa ○ = Allergene in compresse △ = Allergoide.

In seguito allo scioglimento della compressa, ed in corrispondenza della sua deglutizione da parte del soggetto, ha avuto luogo la visualizzazione progressiva della faringe e dell'esofago, come avviene nella somministrazione di qualsiasi bolo radioattivo per via orale. In seguito alla deglutizione, si è manifestata una distribuzione rapida del tracciante nel tratto gastro-intestinale. E' stata riscontrata la permanenza di una quantità misurabile di allergoide radiomarcato (circa il 2% della dose) all'interno della bocca sino ad un tempo massimo di 2 ore (Figura 2).

L'accumulo del tracciante all'interno della bocca 3 ore dopo la somministrazione è risultato pressoché trascurabile in tutti i soggetti, e le scansioni registrate in tempi successivi non hanno permesso di individuare alcuna traccia di allergoide radiomarcato. Per quanto riguarda la cinetica a livello locale, non è stata riscontrata alcuna differenza tra l'allergene e l'allergoide, né sono state osservate differenze tra i volontari allergici ed il soggetto sano.

X = Volume di eluizione (ml)
Y = Radioattività/frazione (cpm o μCi)

● Paziente 4
○ Paziente 5
△ Miscela per radiomarcatura

Figura 4 - Gel-cromatogrammi dei campioni di sangue ottenuti 2 ore dopo la somministrazione dell'allergoide radiomarcato a due pazienti. Ai fini della comparazione, è stato riportato anche il tracciato relativo al profilo cromatografico della miscela utilizzata per la radiomarcatura dell'allergoide prima della purificazione mediante cromatografia. Risulta chiaramente individuabile un picco avente peso molecolare corrispondente all'allergoide intatto. ● = Paziente 4; ○ = Paziente 5; △ = Miscela per radiomarcatura

Cinetica della radioattività plasmatica

L'andamento dei valori di radioattività plasmatica nel tempo è stato tracciato nei grafici a e b della Figura 3. Non è stata rilevata alcuna radioattività nel plasma sino al momento della deglutizione; in seguito alla deglutizione la radioattività plasmatica ha iniziato a salire lentamente, sino a raggiungere il picco massimo in circa 2 ore. L'allergene, tanto in compresse quanto in soluzione acquosa, ha rivelato una cinetica quasi sovrapponibile. D'altro canto, il modello di radioattività plasmatica è risultato diversa tra allergene ed allergoide; nel caso di quest'ultimo, il picco raggiunto è risultato più elevato ($P < 0.05$, test di Mann-Whitney). La gel-filtrazione tramite colonna Sephadex G25 dei campioni di plasma ottenuti a 2 ore ha indicato un picco principale nella regione a basso peso molecolare (composta per la maggior parte da iodio libero), come riportato nella Figura 4. Come prevedibile, nei pazienti ai quali è stato somministrato l'allergoide, è stato osservato un picco di modesta entità, corrispondente al peso molecolare della proteina nativa.

Discussione

In uno studio precedente [13] avevamo sviluppato un approccio sperimentale al fine di indagare la cinetica di un dato allergene radiomarcato, ed avevamo fornito delle informazioni preliminari riguardanti gli esseri umani in buona salute. In tale studio l'allergene radiomarcato è stato somministrato in soluzione acquosa, ed è stato trattenuto sotto la lingua per un periodo di 20-30 minuti senza deglutire. Tali condizioni sperimentali sono molto diverse rispetto alla pratica clinica corrente. Pertanto, abbiamo valutato la cinetica di un vaccino disponibile in commercio (LAIS Lofarma S.p.A., allergoide monomero) replicando le condizioni di somministrazione ai soggetti allergici nel corso regolare della I.T.A. L'allergoide radiomarcato (e l'allergene, come controllo) sono stati incorporati nelle compresse orosolubili del commercio che sono state poi somministrate ai soggetti seguendo le istruzioni del produttore. A causa delle dimensioni della compressa (10 x 3 mm), è stato possibile incorporare solo una piccola quantità di tracciante, il che ha comportato la somministrazione di una bassa dose di ¹²⁵I e quindi la possibilità di individuare un livello di radioattività ridotte

Anche in queste condizioni, è stato comunque possibile osservare delle immagini di buona qualità nel corso della scintigrafia, nonché dei livelli di radioattività plasmatica chiaramente individuabili.

Le attività specifiche ed i profili di radioattività ottenuti mediante gel-filtrazione che sono stati raggiunti sono risultati simili sia con l'allergene radiomarcato, sia con l'allergoide radiomarcato; infatti, i pesi molecolari delle due proteine sono sovrapponibili (12.5 kDa) ed era prevedibile che la modifica chimica dell'allergene (da cui si ottiene l'allergoide) non dovesse influenzare l'efficacia della radiomarcatura. È bene notare che la cinetica dell'allergoide è significativamente diversa da quella dell'allergene, in quanto il picco plasmatico ottenuto è più elevato. Non si è verificato alcun assorbimento dell'allergoide radiomarcato nel torrente circolatorio attraverso la mucosa sino a quando il tracciante è rimasto all'interno della bocca: infatti, la radioattività plasmatica ha iniziato a manifestarsi solo in seguito alla deglutizione. Inoltre, un picco cromatografico corrispondente al peso molecolare dell'allergoide è stato osservato, conformemente alle attese, nel campione di plasma prelevato due ore dopo la somministrazione; ciò conferma che parte della proteina può essere assorbita nel tratto gastro-intestinale con una degradazione modesta o nulla. Questo fatto potrebbe esercitare un ruolo rilevante nel meccanismo d'azione. L'aumentata resistenza alla degradazione ad opera degli enzimi gastro-enterici potrebbe spiegare il maggior assorbimento dell'allergoide e la sua comparsa nel flusso ematico. Ciò potrebbe dipendere dalla sostituzione della maggior parte dei residui -NH₂, che sono necessari affinché molti enzimi possano esplicare la loro azione idrolitica. Il fatto che la modifica non influisca sulla capacità dell'allergoide di evocare la produzione di anticorpi specifici contro l'allergene non modificato [14] è degno di nota.

Una certa persistenza sia dell'allergene radiomarcato sia dell'allergoide radiomarcato all'interno della bocca è stato osservato per un periodo di tempo sino a 2 ore, mentre nel precedente studio effettuato con l'allergene in soluzione acquosa tale persistenza si protraveva ulteriormente nel tempo; probabilmente questo fatto dipende dal protrarsi del tempo di permanenza del tracciante all'interno della bocca. In questo studio, lo scioglimento delle compresse ha avuto luogo in un tempo di 1 minuto - 1 minuto e mezzo (dopo di che i pazienti deglutivano). Un contatto anche breve dell'antigene con la mucosa è sufficiente a determinare la persistenza del composto all'interno della bocca per ore. Inoltre, non è possibile escludere che la persistenza a più lungo termine di parte dell'allergene somministrato sfugga al rilevamento a causa della minore quantità di radioattività somministrata. Ad ogni modo, la persistenza degli allergeni a livello locale potrebbe risultare coerente con l'ipotesi per cui è possibile che le difese immunitarie delle mucose potrebbero essere coinvolte nel meccanismo di azione della ITA locale.

In breve, il presente lavoro consente di trarre le seguenti conclusioni: primo, la principale via di assorbimento (il tratto digestivo) e la persistenza all'interno della bocca sono simili tanto per l'allergoide quanto per l'allergene nativo; secondo, è probabile che il vaccino contenente l'allergoide sia più efficacemente assorbito rispetto all'allergene nativo.

Ringraziamenti

Una parte di questo studio è stata finanziata grazie alle donazioni ricevute da: ARMIA (Associazione Ricerca Malattie Immunologiche ed Allergiche); Ministero per l'Università e le Ricerche Scientifiche e Tecnologiche della Repubblica Italiana; Istituto Mobiliare Italiano S.p.A.; Fondo Speciale per la Ricerca Applicata 46/82; Istituto Superiore di Sanità, programma finalizzato di ricerca 1998.

EDITORIALE

L'efficacia dell'immunoterapia oromucosale nell'allergia respiratoria

Mentre è ormai ampiamente riconosciuta l'efficacia dell'immunoterapia con allergene specifico (ITS) somministrata mediante iniezione sottocutanea, l'immunoterapia oromucosale ha richiesto tempi più lunghi per affermare le proprie credenziali. Ciò potrebbe essere in parte attribuito ad una mancanza di consenso alle sperimentazioni cliniche dipendente dai metodi di somministrazione e dagli schemi posologici [1]. Le sperimentazioni in cui è stata utilizzata la somministrazione per via oromucosale possono essere catalogate in quattro differenti sezioni: ITS orale con assorbimento a livello gastrico, in cui il vaccino viene preparato sotto forma di gocce, capsule o compresse e viene immediatamente deglutito; ITS orale con assorbimento a livello enterico, in cui il vaccino viene modificato per consentire il rilascio del solo antigene nell'intestino tenue, evitandone la degradazione nello stomaco; (3) sublinguale da deglutire, in cui il vaccino viene trattenuto sotto la lingua per 1 o 2 minuti e quindi deglutito, con successivo assorbimento a livello gastrico; (4) sublinguale da sputare, in cui il vaccino viene trattenuto all'interno della bocca per 1 o 2 minuti e poi sputato. Gli estratti vengono somministrati quotidianamente o a giorni alterni durante la fase di induzione e settimanalmente o due volte la settimana durante il trattamento di mantenimento.

L'accettazione dell'immunoterapia oromucosale è stata inoltre contrastata nel passato da sperimentazioni cliniche su scala ristretta, che hanno rivelato dei vizi metodologici [2-5]. La Risoluzione dell'Organizzazione Mondiale per la Sanità "Immunoterapia con allergeni: vaccini terapeutici per malattie allergiche" [6] pubblicata nel 1998 riscontrava che non esistevano dati indicanti l'efficacia dell'immunoterapia sublinguale da sputare [7]. Nel suddetto documento si riconosceva peraltro che un numero limitato di sperimentazioni cliniche in doppio cieco, controllate verso placebo, condotte nel modo appropriato, avevano fornito prove inconfutabili dell'efficacia clinica dell'immunoterapia sublinguale da deglutire costituita da vaccini anti-allergici per graminacee, parietaria ed acari [8-11]. Attualmente sono disponibili dei lavori di ricerca più recenti che dimostrano ulteriormente l'efficacia dell'immunoterapia sublinguale da deglutire nella rinite stagionale da polline di graminacee [12, 13] e parietaria [14].

Persistono alcune controversie riguardanti i dosaggi, ancorché le evidenze cliniche più convincenti sostengano l'impiego di regimi a dosi elevate. Probabilmente la dose ottimale è compresa tra 5 volte e 100 volte la dose somministrata nel corso di una ITS per via sottocutanea, mentre le terapie caratterizzate da un corso prolungato sembrano essere più efficaci rispetto a quelle brevi [13, 15-19].

L'immunoterapia oromucosale è relativamente sicura. Gli effetti collaterali più comunemente riportati sono dolore addominale e prurito a carico della regione orale o sublinguale [10, 20]. Non sono state riportate reazioni avverse gravi, il che conferisce a questa forma di immunoterapia un vantaggio sicuro rispetto alla terapia tradizionale per via sottocutanea [21, 22].

Le conoscenze in merito alla farmacocinetica degli allergeni per immunoterapia locale sono scarse. Le informazioni disponibili provengono per lo più da modelli animali e risultano spesso non conclusive. Bagnasco et al. hanno studiato la farmacocinetica dell'allergene principale della *Parietaria judaica* (Par j 1) in seguito a somministrazione sublinguale ed orale in volontari sani [23]. Nella somministrazione per via orale, l'allergene radiomarcato è stato rapidamente individuato nello stomaco e nell'intestino tenue. La scintigrafia non ha permesso di individuare tracce di accumulo di radioattività nei siti specifici corrispondenti ad una qualsiasi struttura linfatica definita.

La somministrazione per via sublinguale ha rivelato una distribuzione identica in seguito alla deglutizione, ma anche l'interessante permanenza di una quantità significativa di allergene radiomarcato a livello sublinguale per un periodo di tempo sino a 20 ore. Tale quantità rappresenta circa il 2% della dose ed ha continuato a persistere malgrado ripetuti risciacqui del cavo orale. In modo forse meno sorprendente, data la mancanza di efficacia riscontrata con l'immunoterapia sublinguale da sputare, è stata osservata l'assenza totale di assorbimento dell'allergene radiomarcato nel torrente circolatorio attraverso la mucosa sublinguale per un periodo di tempo sino a 30 minuti. Nella pratica clinica, l'allergene deve essere trattenuto sotto la lingua per un periodo di soli 1 o 2 minuti. Come prevedibile, la radioattività plasmatica è aumentata solo in seguito alla deglutizione. Pur tuttavia, è possibile che un modesto assorbimento ed una processazione dell'allergene trattenuto a livello locale avvenga tramite il sistema immunitario locale.

Le basi scientifiche della somministrazione locale di estratti allergenici sulla mucosa si fondano sul concetto di induzione di una tolleranza locale. Ancorché il meccanismo rimanga scarsamente comprensibile, si pensa che le cellule dendritiche, derivate dalla mucosa del tratto gastro-intestinale, possano agire in qualità di elementi cellulari recanti gli antigeni [24]. Inoltre esse producono IL-12, che promuove l'evoluzione delle cellule Th1 in Th2 [25-27]. Un certo numero di studi ha inoltre dimostrato un marcato aumento di IgG allergene-specifiche e di anticorpi IgG4 [28, 29] e, più di recente, anche un'ulteriore risposta negli anticorpi IgE [10-13, 30].

Nell'edizione di questo mese di *Clinical and Experimental Allergy*, Bagnasco et al. sviluppano ulteriormente il loro lavoro con un rapporto sulla farmacocinetica di un allergene e di un allergoide monomero [31]. L'allergoide monomero carbamitato, derivato dall'allergene principale della *Parietaria judaica* (Par. j.1) e l'allergene nativo sono stati radiomarcati con ¹²⁵I. Entrambi i preparati sono stati somministrati a soggetti allergici e, diversamente dallo studio precedente, la somministrazione è stata effettuata secondo la pratica clinica abituale, in cui il composto viene trattenuto sotto la lingua solo per 1 o 2 minuti prima di essere deglutito.

Come nello studio precedente, la radioattività plasmatica ha iniziato ad apparire solo in seguito alla deglutizione. Il picco plasmatico si è manifestato a 2 ore ed è risultato più elevato con il preparato costituito da allergoide in compresse rispetto all'allergene nativo. Questa piccola differenza nel profilo cinetico potrebbe essere spiegata da un'umentata resistenza dell'allergoide nei confronti della degradazione enzimatica gastrointestinale.

Gli autori ipotizzano che ciò potrebbe verificarsi come risultato della sostituzione della maggioranza dei residui $-H_2$, che sono necessari per l'azione idrolitica di molti enzimi. Il processo di modifica non sembra influenzare negativamente la capacità dell'allergoide di evocare una risposta degli anticorpi specifici contro l'allergene non modificato.

Questo è un riscontro importante, poiché uno dei principali motivi in base ai quali l'immunoterapia oromucosale non è stata accettata su vasta scala è la mancanza di potenza degli allergeni somministrati in questo modo. Come discusso in precedenza, al fine di ottenere sia una risposta serologica, sia una risposta clinica, le dosi di allergene somministrate per via orale hanno spesso superato di molte volte la dose cumulativa richiesta dalla somministrazione per via sottocutanea. Si riteneva che questo fatto dovesse dipendere dalla distruzione degli allergeni nello stomaco da parte degli acidi e della pepsina, ed alla successiva degradazione enzimatica a livello intestinale dell'allergene, che ridurrebbe ulteriormente la sua antigenicità. In futuro, i preparati a base di allergeni modificati potrebbero consentire il raggiungimento degli stessi benefici clinici a più basse dosi di antigene somministrate per via oromucosale.

Come già evidenziato nel precedente lavoro di Hagnasco, è stata osservata una certa persistenza tanto dell'allergene radiomarcato quanto dell'allergoide radiomarcato all'interno della bocca. In questo studio, il tracciante è stato individuato per un periodo di tempo sino a 2 ore mentre nello studio precedente la persistenza era più duratura. Probabilmente ciò è il risultato dei diversi preparati utilizzati e degli intervalli temporali differenti previsti per la ritenzione del preparato sotto la lingua. La riproducibilità della persistenza dell'allergene a livello locale solleva interessanti interrogativi a proposito del meccanismo di azione della ITS oromucosale, e potrebbe conferire un maggior peso all'ipotesi secondo la quale l'allergene avrebbe la capacità di penetrare nelle cellule del Langerhans presenti nella mucosa sublinguale.

Ciò che emerge chiaramente da questo studio è che, nell'immunoterapia sublinguale da deglutire, la principale via di assorbimento è costituita dal tratto gastrointestinale, e che il preparato a base di allergoide viene probabilmente assorbito in modo più efficace in confronto all'allergene nativo. Ulteriori studi sono ovviamente necessari per comprendere meglio la cinetica dell'immunoterapia oromucosale e per sviluppare metodi più sofisticati per il rilascio dell'allergene in questa via.

Farmacocinetica di un allergene e di un allergeide monomero per l'immunoterapia oromucosale in volontari allergici.

Bagnasco, Passalacqua, Villa, Augeri, Flamigni, Borini, Falagiani, Mistrello, Canonica, Mariani.

Clinical and Experimental Allergy 2001;31:54-60.

Nel precedente studio di cinetica in volontari sani (Bagnasco et al. *Assorbimento e cinetica distributiva dell'allergene maggiore di parietaria judaica somministrato per via non-iniettiva in soggetti sani. JACI* 1996;51:8-15) si era dimostrato che dopo somministrazione sublinguale dell'allergene di Parietaria radiomarcato:

- 1) l'assorbimento in circolo non si osserva quando l'allergene viene trattenuto in bocca senza deglutire;
- 2) che l'assorbimento in circolo parte quando l'allergene viene deglutito, è rilevabile già nel corso della prima ora ed ha il picco tra le 2 e le 3 ore;
- 3) che l'allergene viene captato dalla mucosa buccale per un periodo molto lungo, ove è visibile (con scintigrafia) fino a 24 ore, durata dell'esperimento.

Si noti che in quello studio: a) i soggetti erano sani e non allergici; b) l'allergene era un allergene nativo, cioè non allergeide; c) l'allergene era in forma liquida.

In questo studio si ripete sostanzialmente lo schema del precedente studio (marcatura con ¹²³Iodio, scintigrafie per evidenziare la persistenza a livello boccale, dosaggi plasmatici della radioattività) con tre sostanziali differenze:

- 1) gli esperimenti sono stati fatti su soggetti allergici (8 pazienti), ed un soggetto sano come controllo;
- 2) gli esperimenti sono stati fatti sia con l'allergene nativo che con l'allergeide monomero del LAIS;
- 3) l'allergene è stato somministrato sia in soluzione che nelle compresse oromucosali del LAIS, l'allergeide solo nelle compresse.

Quindi questo studio si può considerare una vera validazione in cinetica del prodotto LAIS.

RISULTATI E COMMENTI

- 1) All'esame scintigrafico si è osservata la permanenza dell'allergene (circa il 2% della dose somministrata) a livello della mucosa buccale per 2 ore, scarsamente visibile alla 3^a ora.

Non c'è differenza tra allergene e allergeide.

Non c'è differenza tra gli allergici ed il soggetto sano.

Nel precedente esperimento la permanenza in bocca era sensibilmente più prolungata. La spiegazione è molto probabilmente nel fatto che in questi esperimenti la quantità di proteina allergenica e del tracciante radioattivo era molto minore che nel precedente esperimento, circa la decima parte: ciò è dovuto al fatto che nel presente esperimento i volontari erano allergici, e quindi abbiamo dovuto limitare la quantità di allergene. Ciò ha certamente diminuito la sensibilità della misurazione scintigrafica. Possiamo quindi ritenere che la

permanenza mucosale sia stata anche qui molto prolungata (come nel primo esperimento) ma che sia stata visibile solo per 2-3 ore.

Si ribadisce che questa quota di allergene captata a livello mucosale ha un ruolo importante nel meccanismo d'azione, modulando la risposta immunitaria mucosale.

- 2) La cinetica della radioattività plasmatica è rappresentata dalla Figura 3 a (fino a 2 ore) e 3 b (fino a 18 ore). La radioattività comincia a salire dopo che l'allergene è stato ingoiato (non dalla permanenza nella bocca) e raggiunge il picco a circa 2 ore. Questo conferma che la proteina viene assorbita dal tratto gastrointestinale con poca o nessuna degradazione.

Non c'è differenza rilevante tra allergene in soluzione e allergene in compressa.

Invece c'è una differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) tra allergene e allergoide, nel senso che l'allergoide dà un picco molto più alto, di circa 3 volte alle 2 ore e di circa 2 volte alle 16 ore.

- 3) *Come interpretare l'esperimento di gel filtrazione (Figura 4):*
In gel filtrazione (che si esegue in piccole colonne riempite di resina Sephadex e collegate ad una pompa a lento flusso) le molecole vengono separate in funzione delle loro dimensioni molecolari. Più precisamente, escono prima dalla colonna le molecole di grosse dimensioni e poi via via quelle di più piccole dimensioni. Nell'asse orizzontale è rappresentato il flusso del liquido in ml, che va da sinistra a destra. Il picco che esce poco prima del 4° ml è quindi ad alto peso molecolare, mentre le frazioni che escono tra il 6° ed il 12° ml sono a peso molecolare sempre più piccolo.

Nei due pazienti che hanno ricevuto l'allergoide si osserva un picco poco prima del 4° ml, corrispondente all'allergene marcato (labelling mixture), poi alti picchi a più piccolo peso molecolare. Questo indica che l'allergoide passa in circolo, almeno in parte, intatto. Invece negli esperimenti precedenti condotti con l'allergene nativo (Bagnasco et al 1997) tutto l'allergene risultava parzialmente degradato.

Questa maggiore resistenza dell'allergoide viene attribuita nella Discussione alla modifica chimica stessa (carbamilazione in ambiente basico), che sostituendo gran parte dei gruppi aminici rende la molecola più resistente all'attacco proteolitico degli enzimi in ambiente gastro-intestinale.

CONCLUSIONI

- 1) Si conferma l'assorbimento sistemico dal tratto gastrointestinale
- 2) Si conferma la persistenza dell'allergene a livello della mucosa buccale.
- 3) L'allergoide viene assorbito in modo più efficiente dell'allergene nativo.

Editoriale

L'efficacia dell'immunoterapia oromucosale nell'allergia respiratoria.

Brown JL, Frew AJ

Clinical and Experimental Allergy 2001;31:8-10

Gli Editoriali sono dei contributi sostanzialmente diversi dagli articoli scientifici. Questi ultimi vengono inviati dall'autore alla rivista, che li accetta o li rifiuta sulla base dell'esame dei Referees, che di solito nel caso di accettazione ne chiedono delle modifiche migliorative. Invece gli Editoriali vengono preparati a cura dell'Editorial Board (comitato editoriale) che li commissiona ad un esperto, solitamente facente parte dell'Editorial Board stesso (in questo caso Anthony Frew), per commentare un articolo pubblicato sullo stesso numero della rivista, articolo considerato di particolare importanza. In ogni numero della rivista c'è un solo Editoriale. Pertanto il solo fatto che l'Editoriale di questo numero della rivista sia stato dedicato all'articolo di Bagnasco dimostra che esso è stato ritenuto di particolare importanza.

Innanzitutto si noti da parte di Frew l'uso del termine "oromucosale".

Nella parte introduttiva si ripercorrono le varie vie di somministrazione oromucosale: 1) orale con assorbimento gastrico di vaccini in gocce, compresse o capsule immediatamente ingerite; 2) orale con formulazioni gastroresistenti ad assorbimento intestinale, 3) *sublingual-swallow* con vaccini che vengono tenuti in sede sublinguale per 1-2 minuti e poi ingoiati con successivo assorbimento gastrico; 4) *sublingual-spit* con vaccini che vengono tenuti in bocca per 1-2 minuti e poi sputati. Gli schemi di somministrazione prevedono sempre somministrazioni quotidiane o a giorni alterni nella fase iniziale, seguita dalla fase di mantenimento con somministrazioni 1 o 2 volte alla settimana.

Gli autori ricordano poi che nel Position Paper WHO si afferma che non ci sono dati sufficienti per asserire l'efficacia dell'ITS sublinguale, ma che molti studi clinici positivi sono stati pubblicati dopo la stesura del documento.

Si rammenta la elevata sicurezza dell'ITS sublinguale, che provoca talvolta effetti collaterali intestinali od orali, ma mai gravi reazioni sistemiche, cosa che dà a questa forma di ITS un vantaggio definitivo su quella sottocutanea.

Gli autori ripercorrono poi gli aspetti salienti del primo studio di Bagnasco et al 1997: la prolungata persistenza a livello boccale di una quota dell'allergene (circa 2%), la comparsa in circolo dopo circa 30' a partire dalla deglutizione dell'allergene.

Affermano inoltre che la base scientifica della somministrazione mucosale di allergeni risiede nell'induzione di tolleranza locale. Le cellule dendritiche mucosali agiscono come cellule che presentano l'antigene (ai linfociti). Viene quindi prodotta Interleuchina-12 che potenzia lo sviluppo di Th1 rispetto ai Th2.

Venendo al commento dell'articolo di Bagnasco et al in questo numero della rivista, gli autori ne riassumono le schema sperimentale ed i risultati acquisiti. Si evidenzia che il picco plasmatico a 2 ore è più alto con le compresse con allergeoide di quelle con allergene nativo. Si segnala che ciò è dovuto alla reazione di carbamilazione per la preparazione dell'allergeoide, che porta alla sostituzione della maggioranza dei gruppi -NH₂ (aminici) e conseguentemente a maggiore resistenza all'azione degli enzimi proteolitici. Vi è poi una affermazione importante: che questo processo di modifica pare non intaccare la capacità dell'allergeoide di evocare una risposta anticorpale verso l'allergene non-modificato (cioè naturale). Questa è considerata una acquisizione

importante, perché uno dei motivi che limitavano la diffusione dell'immunoterapia orale era la perdita di attività degli allergeni somministrati per questa via. Per questo motivo in molti studi si è giunti a somministrare per via orale quantità di allergene molte volte superiori a quelle impiegate nella via iniettiva, in modo da compensare la distruzione, e quindi la perdita di antigenicità, nello stomaco ad opera degli acidi e della pepsina. Gli autori affermano che le preparazioni con allergeni modificati potranno in futuro rendere possibile il raggiungimento degli stessi benefici clinici con minori quantità di antigene somministrato per via oromucosale.

Gli autori si soffermano poi sull'importanza della persistenza boccale, che dà peso all'ipotesi che anche attraverso la via sublinguale gli allergeni raggiungano le cellule di Langerhans (dendritiche).

Si conclude con l'osservazione che le preparazioni con allergoidi sono più efficacemente assorbite di quelle con allergeni nativi.