

Immunizacja bierna w walce z chorobami zakaźnymi, w tym z COVID-19

Joanna Lasocka¹, Artur Bielawski², Elżbieta Lachert¹

¹Instytut Hematologii i Transfuzjologii w Warszawie

²„BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek S.A.

Artykuł jest tłumaczeniem pracy:

Lasocka J, Bielawski A, Lachert E. Passive immunization in the combat against infectious diseases (COVID-19 included). J Transf Med 2021; 14 (2): 50–57. DOI: 10.5603/JTM.2021.0004.

Należy cytować wersję pierwotną.

Streszczenie

Immunizacja bierna (odporność bierna, immunoterapia bierna, uodparnianie bierne) polega na podaniu specyficznych przeciwciał, których organizm nie posiada, w celu zapobiegania wystąpieniu lub leczenia choroby. Immunizacja bierna może być nabyta w sposób naturalny (przenoszenie przeciwciał matczynych przez łożysko do płodu) oraz sztuczny, gdy pacjentowi przetacza się wysokie miana przeciwciał uzyskanych od ludzi, zwierząt lub metodami inżynierii genetycznej (przeciwciała monoklonalne). Początki stosowania immunizacji biernej sięgają końca XIX wieku. Pionierem badań nad wykorzystaniem przeciwciał pochodzenia zwierzęcego w terapii błonicy i tężca był Emil Adolf von Behring. W Polsce, w powstałym w 1951 roku Zakładzie Produkcji Surowiec i Szczepionek z siedzibą w Lublinie, na skalę przemysłową wytwarzano surowice odpornościowe do walki z błonicą, płonicą, odrą, meningokokowym zapaleniem opon mózgowych czy przeciwko chorobie Heinego-Medina.

Uodparnianie bierne stosowane jest w celu zapobiegania chorobom, w leczeniu chorób związanych z niedoborem odporności (m.in. hipogammaglobulinemii) oraz ostrych infekcji i zatruc. Odporność wynikająca z biernej immunizacji utrzymuje się od kilku tygodni do około 4 miesięcy.

W związku z trwającą od grudnia 2019 roku pandemią COVID-19 w toku są liczne badania z randomizacją, mające określić skuteczność terapii osoczem ozdrowieńców w przypadku zakażenia wirusem SARS-CoV-2. W celu zminimalizowania działań niepożądanych po podaniu osocza ozdrowieńców podjęto próby wytworzenia hiperimmunizowanej globuliny anty-SARS-CoV-2 (hIVIg). Należy wspomnieć, że w fazie badań klinicznych jest między innymi koncentrat immunoglobuliny anty-SARS-CoV-2 opracowany przez polskich badaczy pod kierownictwem profesora Tomasiewicza we współpracy z Instytutem Hematologii i Transfuzjologii oraz z firmą BIOMED-LUBLIN (projekt nr 2020/ABM/COVID19/0036).

Słowa kluczowe: immunizacja bierna, osocze ozdrowieńców, SARS-CoV-2, COVID-19, immunoglobulina anty-SARS-CoV-2

J. Transf. Med. 2021; 14: 41–49

Adres do korespondencji: dr n. med. Joanna Lasocka, Zakład Transfuzjologii, Instytut Hematologii i Transfuzjologii, ul. Indiry Gandhi 14, 02–776 Warszawa; tel. (22) 34 96 386, e-mail: jlasocka@ihit.waw.pl

Artykuł jest dostępny bezpłatnie na podstawie licencji Creative Commons Attribution-Non-Commercial-No Derivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) umożliwiającej jego pobranie oraz udostępnianie pod warunkiem wskazania autorstwa i wydawcy. Niedopuszczalne jest wprowadzanie jakichkolwiek zmian lub wykorzystanie komercyjne bez zgody wydawcy.

Immunizacja bierna

Immunizacja bierna (odporność bierna, immunoterapia bierna, uodparnianie bierne) polega na podaniu specyficznych przeciwciał, których organizm nie posiada, w celu zapobiegania wystąpieniu lub leczenia choroby.

Immunizacja bierna może być nabyta:

- w sposób naturalny, w przypadku gdy przeciwciała matczyne są przenoszone do płodu przez łożysko;
- w sposób sztuczny, w przypadku gdy pacjentowi przetacza się wysokie miana przeciwciał specyficznych dla czynnika zakaźnego lub toksyny (uzyskanych od ludzi lub zwierząt).

Uodparnianie bierne stosuje się w sytuacji, gdy istnieje wysokie ryzyko infekcji i czas, aby organizm rozwinął własną odpowiedź immunologiczną, jest niewystarczający, lub po to, by zmniejszyć objawy chorób. Uodparnianie bierne można przeprowadzić, kiedy pacjenci nie mogą syntetyzować przeciwciał lub jeśli zostali narażeni na chorobę, na którą nie mają odporności.

Immunizacja bierna nabyta naturalnie

Naturalną formę biernej immunoterapii stanowią immunoglobuliny klasy G (IgG) matki, które przechodzą czynnie przez łożysko do krwiobiegu płodu. W procesie tym uczestniczą receptory dla fragmentu Fc IgG obecne na komórkach trofoblastu. Wraz z mlekiem matki dziecku dostarczane są także wydzielnicze przeciwciała IgA, których działanie związane jest głównie z obszarem błon śluzowych, w tym błon śluzowych przewodu pokarmowego [1]. Przeciwciała IgM zaczynają się pojawiać już w okresie płodowym, natomiast wytwarzanie przeciwciał IgG rozpoczyna się tuż po urodzeniu, aby po 12 miesiącach osiągnąć około 60% miana wykrywanego u osób dorosłych. Z upływem czasu poziom przeciwciał matczynych stopniowo się obniża, zanikając około 9. miesiąca życia dziecka. W około 2.–3. miesiącu życia miano przeciwciał IgG jest najniższe. Przeciwciała matczyne są bardzo skuteczne w ochronie noworodków i niemowląt przeciwko większości chorób zakaźnych. Najbardziej dobitnym tego przykładem są dzieci z ciężkim złożonym niedoborem odporności (SCID, *severe combined immunodeficiency*), u których kliniczne objawy choroby zwykle pojawiają się po 6. miesiącu życia, czyli w momencie, gdy miano matczynych przeciwciał osiąga najniższy poziom [2, 3].

Kolejnym dowodem na związek między odpornością matki a odpornością niemowlęcia jest fakt, że prevalencja przeciwciał przeciwko wirusom wśród nie-

nowłąt w wieku poniżej 1. miesiąca jest niezwykle podobna do obserwowanej u dorosłych w wieku 20–40 lat, czyli w grupie wiekowej matek [4].

Immunizacja bierna nabyta sztucznie

Podanie przeciwciał znajdujących się w osoczu krwi ludzkiej lub zwierzęcej, przeciwciał monoklonalnych (MAb, *monoclonal antibodies*), przeciwciał zawartych w produktach leczniczych krwiopochodnych, takich jak immunoglobulina ludzka do stosowania dożylnego (IVIg, *intravenous immunoglobulin*) lub domięśniowego (IMIg, *intramuscular immunoglobulin*), immunoglobulina specyficzna od dawców immunizowanych czy jako terapia osoczem ozdowieńców (CPT, *convalescent plasma therapy*), zapewnia krótkotrwałą immunizację bierną, nabytą w sposób sztuczny.

Uodparnianie bierne stosowane jest w celu zapobiegania chorobom, w leczeniu chorób związanych z niedoborem odporności (m.in. hipogammaglobulinemii) oraz ostrej infekcji i zatruc. Odporność wynikająca z biernej immunizacji utrzymuje się od kilku tygodni do około 4 miesięcy.

Rys historyczny i zastosowanie immunizacji biernej

Pierwsze skuteczne próby biernej immunizacji (badania na modelu zwierzęcym) w celu leczenia błonicy i tężca opublikowano w 1890 roku w „*Deutsche Medizinische Wochenschrift, German Medical Journal*” [5]. Metoda ta została dość szybko zmodyfikowana i przystosowana do użytku klinicznego. Już w połowie lat 90. XIX wieku w szpitalach z powodzeniem stosowano antytoksynę swoistą dla błonicy w celu zmniejszenia śmiertelności podczas wybuchów epidemii tej choroby. W 1901 roku Emil Adolf von Behring został laureatem pierwszej Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny za prace nad zastosowaniem seroterapii w walce z błonnicą (difterytem). Komitet Noblowski podkreślił znaczenie pracy von Behringa, dodając do uzasadnienia słowa: „dzięki pracy [von Behringa] otwarta została nowa droga dla medycyny, a lekarze otrzymali ważną broń w walce przeciw chorobie i śmierci”.

Tylko w Niemczech, jak oszacowano, co roku ratowano 45 000 chorych dzięki zastosowaniu immunoterapii (środków specyficznych dla błonicy). W latach 90. XIX wieku śmiertelność wśród chorych hospitalizowanych z powodu błonicy wynosiła 47–60%, a działania podejmowane przez Emila von Behringa i jego współpracownika, Shibasaburo Kitasato, stanowiły jedyną nadzieję dla chorych na błonnicę w erze przed antybiotykoterapią.

Podobne doświadczenia na modelu zwierzęcym von Behring i Kitasato przeprowadzili z bakterią *Clostridium tetani*. Krew królików immunizowana *C. tetani* całkowicie zabezpieczała myszy przed zwykle śmiertelną dawką wirulentnych bakterii oraz przed toksyną tężcową. Na podstawie wyników tych badań zaczęto produkować specyficzną immunoglobulinę antytężcową [5].

W pierwszych latach stosowania immunoterapii biernej, ze względu na fakt, że niemożliwe było pozyskanie przeciwciał ludzkich na szeroką skalę, próbowano uzyskiwać je od zwierząt. Na przykład immunoglobulinę przeciwko błonicy pozyskiwano od immunizowanych krów [6]. Wprawdzie obecnie technologia otrzymywania specyficznych immunoglobulin uległa znacznej modyfikacji, nadal jednak część specyficznych immunoglobulin jest pochodzenia zwierzęcego, np. Antivenin, firmy Merc & Co. — immunoglobulina pochodzenia końskiego, która neutralizuje neurotoksynę jadowitego pająka *Latrodectus mactans* (czarna wdowa) czy antytoksyna botulinowa Botulism Antitoxin Bivalent Types A and B — immunoglobulina końska firmy Sanofi Pasteur stosowana zapobiegawczo i leczniczo w przypadkach zatrucia jadem kielbasianym.

Klasyczne podejście do wytwarzania przeciwciał opiera się na immunizacji zwierzęcia określonym antygenem i izolacji specyficznych przeciwciał z krwi gospodarza. Jednak białka pochodzenia zwierzęcego pomimo zaawansowanych technik inżynierii mogą powodować szereg niepożądanych reakcji, które wynikają z ich immunogenności. Dlatego też immunoterapia bierna, w której stosowane są preparaty przeciwciał pochodzenia zwierzęcego, powinna być prowadzona wyłącznie pod ścisłym nadzorem medycznym.

Począwszy od lat 20. do lat 70. XX wieku, immunizację bierną stosowano na szeroką skalę w przypadku chorób takich jak szkarlatyna i krztusiec [7].

Preparaty zawierające immunoglobulinę ludzką są stosowane m.in. w leczeniu pierwotnego niedoboru odporności z upośledzeniem wytwarzania przeciwciał, błonicy, tężca, zapalenia wątroby typu A oraz B (HAV, *hepatitis A virus*; HBV, *hepatitis B virus*), wścieklizny, odry, ospy, pierwotnej małopłytkowości immunologicznej, w chorobie Kawasaki, w wirusowym zakażeniu dolnych dróg oddechowych oraz jako profilaktyka konfliktu matczyno-płodowego i w następstwie choroby hemolitycznej płodu i noworodka.

Profilaktyczne podawanie przeciwciał przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (WZW B)

zostało w dużej mierze wyparte przez wprowadzenie szczepionek, nadal jednak immunoprofilaktyka WZW B jest wskazana w sytuacji przypadkowego narażenia osób nieimmunizowanych (w tym takich, u których szczepienie nie zostało zakończone lub których status szczepienia jest nieznan), np.: u osób hospitalizowanych, szczególnie narażonych na zakażenie WZW B, u partnerów seksualnych osób chorych na ostre WZW B czy u personelu medycznego w przypadku zakłucia, skaleczenia, zanieczyszczenia rany krwią lub innymi płynami ustrojowymi pacjenta zakażonego WZW B. Immunoprofilaktykę WZW B stosuje się także u noworodków, których matki są nosicielkami HBV [8].

Preparaty immunoglobulin ludzkich powodują ograniczenie lub remisję objawów niektórych ogólnoustrojowych chorób zapalnych i autoimmunizacyjnych.

Fracjonowanie białek osocza krwi w celu otrzymania produktów leczniczych krwiopochodnych stało się możliwe dzięki opracowanej w latach 40. XX wieku i funkcjonującej do dziś (choć zmodyfikowanej) metodzie Cohna [9]. Źródłem osocza do frakcjonowania jest świeżo mrożone osocze (FFP, *fresh frozen plasma*), pobierane w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa (CKiK; w Polsce znajdują się 23 takie centra). Wprawdzie jednostki osocza przeznaczone do frakcjonowania są poddawane rygorystycznym procedurom ograniczającym ryzyko przeniesienia czynników zakaźnych, w tym badaniom markerów czynników zakaźnych [wirus zapalenia wątroby typu B (HBV), wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, *hepatitis C virus*), ludzki wirus niedoboru odporności (HIV, *human immunodeficiency virus*)], to jednak ryzyka związanego z przeniesieniem czynników zakaźnych nadal nie można całkowicie wyeliminować. Dlatego też zarówno osocze, jak i produkty lecznicze krwiopochodne otrzymywane ze zlewanego osocza od lat 80. XX wieku poddawane są metodom inaktywacji biologicznych czynników chorobotwórczych.

Używane do wytwarzania produktów leczniczych osocze zawierające immunoglobulinę ludzką różni się mianem poszczególnych przeciwciał specyficznych. Dobór osocza o określonym wskazaniu wynika z chęci osiągnięcia najbardziej optymalnego działania terapeutycznego w danej jednostce chorobowej. Jednym z takich preparatów, które bierze się pod uwagę, jest immunoglobulina dożylna (IVIg).

Wraz z rozwojem nowych technologii, zwłaszcza w zakresie otrzymywania MAb, pojawiły się metody, które ograniczyły zapotrzebowanie na przeciwciała pochodzenia zwierzęcego.

Alternatywnym sposobem otrzymywania przeciwciał okazała się technika prezentacji na fagu (*phage display*), która wykorzystuje techniki inżynierii genetycznej do modyfikacji genomu bakteriofagów i tworzenia bibliotek zawierających miliony wariantów rekombinowanych białek prezentowanych na ich powierzchni. Korzystanie z bibliotek fagowych umożliwia izolację funkcjonalnych i wysoce specyficznych fragmentów przeciwciał o praktycznie dowolnej swoistości. Metoda ta została po raz pierwszy opisana w 1985 roku przez Georga Smitha [10, 11].

Biblioteki fagowe są konstruowane w oparciu o najmniejsze funkcjonalne fragmenty przeciwciała odpowiedzialne za oddziaływanie z antygenem — fragmenty scFv (*single chain fragment variable*).

Biblioteki przeciwciał można pozyskać poprzez przygotowanie matrycy cDNA z komórek B nieimmunizowanych ludzkich dawców i amplifikację fragmentów V_H i V_L przeciwciał lub skonstruowanie przeciwciał na podstawie mutacji aminokwasowych wprowadzanych losowo w pętli CDR (*complementary determining regions*). W ten sposób generuje się pulę wariantów przeciwciał o różnych sekwencjach, które są prezentowane na powierzchni fagów. Podczas przeszukiwania bibliotek fagowych z puli fagów wybiera się te specyficznie oddziałujące z wybranym antygenem [12].

Warianty przeciwciał uzyskane metodą *phage display* mogą zostać dodatkowo poddane procesowi dojrzewania powinowactwa (*affinity maturation*). Technika ta naśladuje naturalnie zachodzący proces wytwarzania przeciwciał o coraz większym powinowactwie do antygeny. W laboratorium poprzez konstrukcję bibliotek II generacji można uzyskać podobny efekt, otrzymując na bazie wyizolowanego przeciwciała warianty o zwiększonej sile oddziaływania z antygenem [13].

Uzyskane w wyniku selekcji fragmenty przeciwciał są poddawane analizie przesiewowej [np. za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*)] oraz sekwencjonowaniu. Fragmenty przeciwciał wyprodukowane w systemach bakteryjnych są następnie oczyszczane na złożach chromatograficznych. Analiza właściwości wyselekcjonowanych przeciwciał pozwala na wyznaczenie dokładnych stałych kinetycznych oddziaływania przeciwciała z antygenem.

W opisany sposób produkuje się przeciwciała w formie scFv przeciwko haptenom, białkom, węglowodanom, receptorom, antygenom nowotworowym czy wirusom. Mogą one mieć zastosowanie terapeutyczne bądź być wykorzystywane w różnych zestawach diagnostycznych.

Do celów terapeutycznych przeciwciała mogą być dodatkowo koniugowane z cytostatykami lub izotopami promieniotwórczymi, aby umożliwić dostarczenie leku lub znacznika do ściśle określonych tkanek. Technologią *phage display* z powodzeniem wykorzystuje wiele firm farmaceutycznych poszukujących leków biologicznych. Przykładem dostępnych na rynku ludzkich przeciwciał terapeutycznych otrzymanych przy użyciu techniki *phage display* są: Humira (adalimumab) — przeciwciało skierowane przeciwko czynnikowi martwicy nowotworu α (TNF α , *tumor necrosis factor α*), stosowane m.in. w leczeniu reumatoidalnego zapalenia stawów, czy Benlysta (belimumab) — ludzkie przeciwciało IgG1 skierowane przeciwko stymulatorowi limfocytów B (BLyS, *B lymphocyte stimulator*), rozpuszczalnemu ligandowi z rodziny cytokin TNF, które są stosowane w leczeniu toczenia rumieniowatego układowego. W trakcie badań klinicznych znajdują się kolejne przeciwciała otrzymane z bibliotek fagowych [14].

Potwierdza to słuszność i skuteczność wykorzystywania techniki prezentacji na fagu do otrzymywania wysoce specyficznych ludzkich przeciwciał o potencjale terapeutycznym. Opracowano także inne technologie, oparte na chimerycznych MAb, w których przeciwciało mysie jest „uczułowiczone”. Polega to na zastąpieniu mysich genów immunoglobulin przez geny immunoglobuliny ludzkiej [15].

Profilaktyka swoista bierna w chorobach zakaźnych w Polsce

Pierwsze lata po wojnie pokazały, jak ogromne znaczenie w walce z rozwojem chorób zakaźnych ma immunoterapia bierna. W rezultacie działań wojennych na terenie Polski, migracji ludności oraz wojsk sytuacja epidemiczna była wręcz dramatyczna.

We współpracy z kadrą profesorów – naukowców z przedwojennych ośrodków uniwersyteckich we Lwowie, w Warszawie i Poznaniu – w 1944 roku powołano Państwowy Zakład Higieny (PZH) z siedzibą w Lublinie. Główne zadania PZH obejmowały przygotowanie, wdrożenie i nadzorowanie wszystkich działań z zakresu ochrony ludności przed rozprzestrzenianiem się chorób zakaźnych.

W 1951 roku będący jedną ze struktur PZH Zakład Produkcji Surowic i Szczepionek został przekształcony w Wytwórnę Surowic i Szczepionek, z której powstała działająca do dzisiaj spółka akcyjna „BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek. Był to pierwszy w Polsce zakład

farmaceutyczny o profilu biotechnologicznym. Opracowywane i wytwarzane tutaj immunopreparaty przez długie lata stanowiły kluczowy element narodowego systemu ochrony przed chorobami zakaźnymi.

To tu rozpoczęto produkcję na skalę przemysłową pierwszych w kraju i w Europie Środkowej surowic odpornościowych do walki z błonicą, surowicy meningokokowej (przeciw zapaleniu opon mózgowych), surowicy przeciw odrze oraz surowicy przeciw płonicy. Surowice przeciwężcowa, przeciwbłonicza, przeciwpłonicza i przeciwmeningokowa wytwarzane były na bazie krwi koni poddanych hiperimmunizacji. Surowica przeciwdrożdżycowa była wytwarzana na bazie krwi pobieranej od ludzi — ozdrowieńców.

Nie sposób przecenić ogromnego znaczenia wymienionych surowic w zwalczaniu tężca, błonicy, płonicy, odrzy czy choroby Heinego–Medina w Polsce. Obecnie te choroby są w naszym kraju opanowane, kontrolowane, a produkcja związanych z nimi immunoglobulin została zamknięta.

Immunoglobulina dożylna (IVIg) a immunoglobulina specyficzna w leczeniu COVID-19

W Stanach Zjednoczonych immunoglobulina dożylna została zatwierdzona do użytku klinicznego w 1980 roku. Stwierdzono, że jest skuteczna w profilaktyce zakażeń zagrażających życiu u pacjentów z pierwotnymi i wtórnymi niedoborami odporności. IVIg stosuje się w leczeniu przewlekłych zakażeń, takich m.in. jak zakażenie parwowirusem B19.

Doświadczenie dotyczące stosowania IVIg w leczeniu zakażenia koronawirusem 2 ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2, *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*) jest obecnie bardzo ograniczone. Uzasadnienie stosowania IVIg w zakażeniu SARS-CoV-2 stanowi przede wszystkim modulacja reakcji zapalnej. Stwierdzono bowiem, że IVIg zmniejsza odpowiedź zapalną w ciężkich zakażeniach SARS-CoV-2. W publikacjach z Chin poinformowano o stosowaniu IVIg u zakażonych SARS-CoV-2 pacjentów w ciężkim stanie, u których w efekcie stwierdzono normalizację temperatury i złagodzenie objawów ze strony układu oddechowego. Wyników tych nie można jednak uznawać za jednoznaczne, ponieważ chorzy otrzymywali także leki przeciwwirusowe i steroidy, które mogły zaburzyć ocenę wpływu samej immunoglobuliny [16]. Można zatem stwierdzić, że obecnie brakuje jednoznacznych dowodów popierających stosowanie IVIg w leczeniu chorób

wywołanych przez koronawirusy, takie jak SARS-CoV, SARS-CoV-2 i MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome coronavirus* — koronawirus bliskowschodniego zespołu niewydolności oddechowej).

Z kolei immunoglobulina specyficzna otrzymana z osocza dawców z wysokim mianem przeciwciał w stosunku do określonych czynników zakaźnych była z powodzeniem stosowana w leczeniu wielu infekcji, spowodowanych np. przez wirus cytomegalii (CMV, *cytomegalovirus*) lub wirus grypy (H1N1). Zaletą immunoglobuliny specyficznej jest możliwość jej otrzymywania z osocza dawców seropozytywnych w stosunku do specyficznego czynnika zakaźnego, w którym stwierdzono wystarczające do neutralizacji czynnika zakaźnego miano przeciwciał neutralizujących [17].

Skuteczność specyficznych immunoglobulin potwierdzono także podczas leczenia zakażeń spowodowanych innymi koronawirusami (SARS i MERS) [18]. W publikacjach na temat leczenia postępujących zakażeń SARS-CoV-2 potwierdzono szybszą poprawę parametrów klinicznych oraz znacząco niższą śmiertelność u chorych, którzy otrzymali osocze od ozdrowieńców [19]. Analiza badań prospektywnych z 2009 roku potwierdziła skuteczność osocza (o mianie $\geq 1:160$) pobranego od osób po przechorowaniu grypy wywołanej przez wirusa typu A (H1N1) i przetoczonego pacjentom z ciężkim zakażeniem H1N1 [20]. W jednym z badań porównywano także skuteczność immunoglobuliny otrzymanej z osocza pobranego od osób, które przebyły ciężkie zakażenie wirusem H1N1. U pacjentów tych stwierdzono zmniejszenie miana wirusa i wydłużenie czasu przeżycia. Badanie to wykazało przewagę immunoglobulin specyficznych nad IVIg [21].

Zastosowanie immunizacji biernej osoczem ozdrowieńców w leczeniu zakażeń wirusowych

Osocze od osób po przebytych infekcjach wirusowych (CP, *convalescent plasma*) jest wykorzystywane do celów klinicznych od końca XIX wieku. Skuteczne próby terapii osoczem ozdrowieńców podjęto podczas pandemii grypy hiszpanki w 1919 roku [22–24].

Osocze od ozdrowieńców stosowano m.in. w leczeniu odrzy, świnki, ospy wietrznej, infekcji CMV czy parwowirusem B19. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) rekomendowała także użycie osocza ozdrowieńców podczas epidemii gorączki krwotocznej wywołanej

zakażeniem wirusem Ebola [25]. W 2009 roku podczas pandemii grypy AH1N1 zaobserwowano znaczące obniżenie śmiertelności w grupie poddanej terapii osoczem ozdrowieńców w porównaniu z grupą kontrolną (20,0% vs. 54,8%; $p = 0,01$) [20]. Również w przypadku zastosowania osocza w leczeniu MERS oraz SARS zaobserwowano lepsze efekty terapeutyczne w porównaniu z grupą kontrolną [26, 27].

Na podstawie doniesień literaturowych można stwierdzić, że terapia osoczem ozdrowieńców w większości przypadków jest skuteczna i dobrze tolerowana. Rzadko obserwowane są poważne reakcje niepożądane. Szczególnie w przypadku zastosowania osocza ozdrowieńców w leczeniu różnych infekcji wirusowych można stwierdzić, że takie postępowanie zmniejsza śmiertelność, obniża wiremę, a w konsekwencji skraca czas hospitalizacji i przyspiesza rekonwalescencję chorych.

Za efekt leczniczy osocza ozdrowieńców odpowiadają przeciwciała neutralizujące, przy czym kluczowe jest ich odpowiednio wysokie miano. Za metodę referencyjną oznaczania miana przeciwciał neutralizujących uważa się wirusowe testy neutralizacji (VNT, *virus neutralisation test*). Klasyczny VNT polega na przygotowaniu hodowli komórek wrażliwych na zakażenie danym wirusem. Następnie przygotowuje się serię rozcieńczeń testowanej surowicy (lub roztworu zawierającego przeciwciała), miesza się ją z zawiesiną zawierającą określoną ilość cząstek zakaźnych wirusa i dodaje tak przygotowaną mieszaninę do założonej wcześniej hodowli. Po okresie inkubacji wynik otrzymuje się na podstawie zbadania każdej studzienki pod kątem obecności infekcji wirusowej, a właściwie dokonania oceny, czy i w jakim rozcieńczeniu surowicy infekcja wirusowa zostaje zahamowana. W przypadku niektórych wirusów przeprowadza się ocenę mikroskopową efektu cytopatycznego, który może obejmować zmianę morfologiczną zakażonych komórek lub ich lizę i pojawienie się w tym miejscu pustych przestrzeni, tzw. lysin (plaque). Ostateczny wynik badania, wyrażany jako miano przeciwciał neutralizujących w badanej próbce, oznacza ostatecznie rozcieńczenie surowicy skutecznie neutralizujące zakażoną hodowlę w odniesieniu do kontroli [28].

Testy neutralizacji są badaniami wysoce specjalistycznymi, pracochłonnymi, wymagającymi odpowiedniej klasy pomieszczeń laboratoryjnych. Są trudne do wystandaryzowania i wrażliwe na dojrzałość i typ komórek. Wykonuje się je tylko w nielicznych ośrodkach. Rutynowo do określenia przydatności osocza dawców do celów biernej im-

munizacji stosuje się testy serologiczne. W przypadku wirusa SARS-CoV-2 najlepiej skorelowane z mianem przeciwciał neutralizujących są testy oparte na antygenach białka kolca S1 czy domeny wiążącej receptor (RBD, *receptor-binding domain*).

Wiadomo już, że wiremę osiąga zwykle najwyższy poziom w ciągu 1. tygodnia trwania infekcji, natomiast pierwotna odpowiedź immunologiczna jest rozwijana pod koniec 2. tygodnia trwania zakażenia. Na tej podstawie można wnioskować, że zastosowanie osocza we wczesnym stadium choroby może pozwolić osiągnąć lepsze efekty terapeutyczne [29].

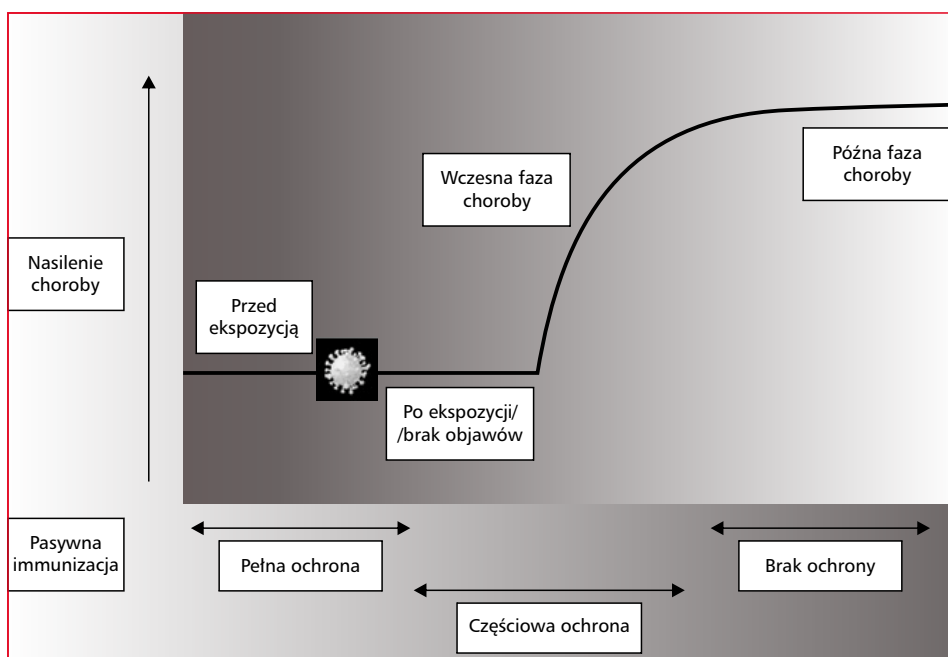
Efektywność biernej immunizacji zmniejsza się w miarę progresji zakażenia. Pełną ochronę przed wystąpieniem choroby objawowej można uzyskać poprzez profilaktyczne podanie immunoglobuliny przed ekspozycją na czynnik zakaźny. Bierna immunizacja może być wysoce skuteczna, gdy jest zastosowana bezpośrednio po ekspozycji, jeszcze przed wystąpieniem objawów. Terapia immunoglobulinami jest mało skuteczna, gdy zostaje zastosowana po wystąpieniu objawów choroby. Przy zastosowaniu terapii w późnym stadium choroby występują niewielkie korzyści kliniczne lub nie ma ich wcale (ryc. 1).

Bierna immunizacja a COVID-19

Pod koniec grudnia 2019 roku w mieście Wuhan (Chiny, prowincja Hubei) wykryto przypadek zapalenia płuc spowodowanego infekcją nieznanym dotąd koronawirusem, nazywanym początkowo 2019-nCoV. W lutym 2020 roku WHO zatwierdziła oficjalną nazwę wirusa — SARS-CoV-2 — i nazwę wywoływanej przez niego choroby — choroba koronawirusowa 2019 (COVID-1, *coronavirus disease 2019*). Koronawirusy są znanymi czynnikami zakaźnymi, które podzielono na cztery rodzaje: α - i β -koronawirusy (zakaźne dla ssaków) oraz γ - i δ -koronawirusy (wywołujące choroby u ptaków). Wirus SARS-CoV-2 (należący do β -koronawirusów) jest siódmym spośród poznanych koronawirusów mogących zainfekować człowieka. Swoją nazwę zawdzięcza wysokiemu podobieństwu do ludzkiego wirusa SARS (82%) oraz do występującego u nietoperzy SARS-like-CoVZXC21.

Raport WHO z dnia 18 kwietnia 2021 roku podaje, że na całym świecie od początku trwania pandemii odnotowano 140 322 903 przypadki COVID-19. W wyniku choroby wywołanej SARS-CoV-2 zmarły 3 003 794 osoby.

Pandemia COVID-19 spowodowana rozprzestrzenieniem się SARS-CoV-2 stanowi zarówno



Rycina 1. Efektywność biernej immunizacji w zależności od fazy zakażenia, w której zostanie zastosowana

bezprecedensowe wyzwanie dla klinicystów, jak i obciążenie systemu ochrony zdrowia ze względu na wysoki wskaźnik zakaźności i śmiertelności. Biorąc pod uwagę szybkie i katastrofalne rozprzestrzenianie się COVID-19, należało prześledzić istniejące opcje terapeutyczne mogące pomóc w zwalczaniu zakażenia SARS-CoV-2 do czasu pojawienia się szczepionki lub innego skutecznego leku. Duże nadzieje wiązano z osoczem pobranym od osób po przechorowaniu COVID-19 oraz z preparatami immunoglobulin.

W toku są liczne badania z randomizacją mające określić skuteczność terapii osoczem ozdrowieńców w przypadku zakażenia SARS-CoV-2 [30].

Amerykańska organizacja rządowa Narodowe Instytuty Zdrowia (NIH, *National Institutes of Health*), zajmująca się badaniami biomedycznymi i związanymi ze zdrowiem, w ostatnich rekomendacjach z dnia 9 października 2020 roku podaje, że pomimo niewystarczających jeszcze danych z dobrze kontrolowanych badań z randomizacją, wykazujących efektywność i bezpieczeństwo stosowania osocza ozdrowieńców w leczeniu COVID-19, już ponad 70 000 pacjentów w Stanach Zjednoczonych zostało poddanych takiej terapii w ramach programu kliniki Mayo — *Mayo Clinic's Expanded Access Program (EAP)*.

Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA, *Food and Drug Administration*) oraz *Mayo Clinic* przeprowadziły retrospektywne, pośrednie badania oceny skuteczności terapii osoczem

ozdrowieńców przy wykorzystaniu danych *Mayo Clinic EAP*, z których wynika, że u pacjentów, którzy otrzymali jednostki osocza z wyższymi mianami przeciwciał neutralizujących SARS-CoV-2, zaobserwowano lepsze efekty terapeutyczne niż u tych, którzy otrzymali osocze o niższych mianach przeciwciał. Potwierdziły to wyniki badaczy z *Mayo Clinic*, którzy wykazali mniejszą śmiertelność (22,3%) wśród pacjentów z grupy, która otrzymała osocze ozdrowieńców zawierające wysokie miano przeciwciał anti-SARS-CoV-2, w porównaniu z grupą, która otrzymała osocze o średnim i niskim mianie przeciwciał (odpowiednio 27,4% oraz 29,6%) [31]. Szczególnie dobrą odpowiedź na leczenie zaobserwowano w przypadku podania osocza w ciągu 72 godzin od rozpoznania COVID-19 [32]. Działania niepożądane w przypadku zastosowania osocza ozdrowieńców u chorych na COVID-19 są rzadkie i podobne jak w przypadku podania osocza z innych wskazań.

Opierając się na wszystkich dostępnych obecnie dowodach naukowych, można wnioskować, że prawdopodobne korzyści ze stosowania osocza ozdrowieńców w terapii COVID-19 przewyższają znane i potencjalne zagrożenia.

W celu zminimalizowania działań niepożądanych po podaniu osocza ozdrowieńców kilka ośrodków na świecie podjęło próbę wytworzenia hiperimmunizowanej globuliny anti-SARS-CoV-2 (*hIVIg, hyperimmune intravenous immunoglobulin*) [33]. Koncentrat immunoglobuliny pozwala na podanie

przeciwciał neutralizujących w mniejszej objętości, co powinno się przyczynić do zmniejszenia liczby reakcji niepożądanych związanych z przetoczeniem osocza. Stosuje się różne metody uzyskania koncentratu immunoglobuliny. Naukowcy pod kierownictwem Vandeburga zastosowali metodę chromatograficzną, dzięki której w koncentracie udało się osiągnąć około 10-krotnie wyższe stężenie specyficznych przeciwciał anty-SARS-CoV-2 w porównaniu ze stężeniem tych przeciwciał w puli osocza ozdrowieńców. Jednocześnie aktywność neutralizująca przeciwciał jest około 3-krotnie wyższa w produkcie końcowym w stosunku do puli osocza [34]. Oznacza to, że pacjent poddany terapii hIVIg otrzyma przeciwciała o wyższej aktywności neutralizującej w dawce stanowiącej ekwiwalent osocza ozdrowieńców. Końcowy produkt zawiera 100% IgG. Natomiast niepożądane białka, takie jak IgM, IgA, przeciwciała anty-A, anty-B, anty-D, zostały praktycznie wyeliminowane. Przeciwciała klasy IgM odpowiadające za wewnątrznaczyniową aktywność hemolityczną przeciwciał anty-A i anty-B zostały usunięte, co zapobiega hemolizie wewnątrznaczyniowej [35]. W związku z tym, w przeciwieństwie do stosowania osocza, nie jest konieczny dobór dawców zgodnych pod względem układu AB0.

Usunięcie IgA zapewnia korzyść terapeutyczną związaną ze stosowaniem hIVIg w porównaniu z osoczem ozdrowieńców u pacjentów z niedoborem IgA, którzy mogli być wcześniej leczeni produktami krwiopochodnymi i wytworzyli przeciwciała przeciwko IgA.

Potencjalną przewagę hIVIg nad bezpośrednim podawaniem osocza ozdrowieńców stanowi różnorodność przeciwciał uzyskanych z puli osocza ozdrowieńców, która może zapewnić szerszy zakres aktywności przeciwwirusowej [36]. Taka różnorodność może być istotna w związku z faktem pojawiania się nowych wariantów wirusa SARS-CoV-2. Zróżnicowanie przeciwciał może zapewnić szerszy zakres aktywności przeciwwirusowej poprzez atakowanie różnych epitopów wirusa i wykorzystywanie różnych mechanizmów komórkowych [32].

Należy się zatem spodziewać, że zastosowanie hIVIg może się okazać bardziej skuteczne niż zastosowanie świeżo mrożonego osocza, pobranego od osób po przechorowaniu COVID-19.

W trakcie badań klinicznych jest preparat otrzymany podczas prac prowadzonych pod kierunkiem Vandeburga. Badania te zapewne dostarczą wkrótce istotnych informacji na temat skuteczności i bezpieczeństwa stosowania hIVIg anty SARS-CoV-2 [37].

Należy wspomnieć, że prace polskich naukowców pod kierownictwem profesora Tomaszewicza, realizowane przy udziale firmy BIOMED-LUBLIN i Instytutu Hematologii i Transfuzjologii (projekt nr 2020/ABM/COVID19/0036), dotyczące stworzenia koncentratu immunoglobuliny anty-SARS-CoV-2, także są w fazie badań klinicznych.

Przyszłość immunizacji biernej

Znaczny postęp w zakresie technologii MAb i coraz większe uznanie dla roli przeciwciał w zwalczaniu chorób zakaźnych spowodowały, że nowe terapie oparte na immunizacji biernej będą prawdopodobnie nadal się rozwijać. Jednocześnie pojawiająca się coraz częściej antybiotykooporność istotnych klinicznie bakterii, takich m.in. jak *Staphylococcus aureus* lub *Salmonella typhi*, jest bardzo alarmująca, co dodatkowo motywuje do prowadzenia badań nad rozwojem terapii opartych na przeciwciałach. Jedno z ograniczeń biernej immunizacji stanowi krótki okres półtrwania przeciwciał *in vivo*, który często zapewnia tylko przejściową ochronę i wymaga powtórzenia terapii. Duże nadzieje budzą nowe technologie, które wydłużają okres półtrwania MAb. Jednym z takich przykładów jest mutacja regionu Fc MAb anty-RSV w celu zwiększenia jego wiązania z receptorem Fc, co skutkuje wzrostem farmakokinetyki przeciwciał w surowicy u ludzi z typowego 19–34-dniowego okresu półtrwania do 100-dniowego, przy jednoczesnym zachowaniu aktywności neutralizującej swoistej dla wirusa. Wprawdzie immunizacja bierna może być wystarczająca do ochrony lub leczenia choroby w fazie ostrej lub podczas jej remisji, jednak wydaje się, że immunizacja aktywna poprzez odpowiednio „zaprojektowaną” szczepionkę nadal jest potrzebna w celu utrzymania długoterminowego poziomu odporności ochronnej. Należy podkreślić, że skuteczne metody immunizacji biernej mogą stanowić bazę do opracowywania nowych i ulepszonych szczepionek.

Piśmiennictwo

1. Niewiesk S. Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies. *Front Immunol.* 2014; 5: 446, doi: [10.3389/fimmu.2014.00446](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00446), indexed in Pubmed: 25278941.
2. Fischer A. Severe combined immunodeficiencies (SCID). *Clin Exp Immunol.* 2000; 122(2): 143–149, doi: [10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2000.01359.x), indexed in Pubmed: 11091267.
3. Lederman HM, Winkelstein JA. X-linked agammaglobulinemia: an analysis of 96 patients. *Medicine (Baltimore).* 1985; 64(3): 145–156, indexed in Pubmed: 2581110.
4. Slifka M, Amanna I. Passive Immunization. *Plotkin's Vaccines.* 2018: 84–95.e10, doi: [10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0](https://doi.org/10.1016/b978-0-323-35761-6.00008-0).

5. Ueber das Zustandekommen der Diphtherie-Immunität und der Tetanus-Immunität bei Thieren. *DMW - Deutsche Medizinische Wochenschrift*. 2009; 16(49): 1113–1114, doi: [10.1055/s-0029-1207589](https://doi.org/10.1055/s-0029-1207589).
6. Winau F, Winau R. Emil von Behring and serum therapy. *Microbes Infect*. 2002; 4(2): 185–188, doi: [10.1016/s1286-4579\(01\)01526-x](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(01)01526-x), indexed in Pubmed: 11880051.
7. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Convalescent plasma: new evidence for an old therapeutic tool? *Blood Transfus*. 2016; 14(2): 152–157, doi: [10.2450/2015.0131-15](https://doi.org/10.2450/2015.0131-15), indexed in Pubmed: 26674811.
8. Charakterystyka produktu leczniczego Gamma anty-HBs 200, „BIOMED-LUBLIN” Wytwórnia Surowic i Szczepionek Spółka Akcyjna.
9. Cohn EJ, Strong LE. Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J Am Chem Soc*. 1946; 68: 459–475, doi: [10.1021/ja01207a034](https://doi.org/10.1021/ja01207a034), indexed in Pubmed: 21015743.
10. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228(4705): 1315–1317, doi: [10.1126/science.4001944](https://doi.org/10.1126/science.4001944), indexed in Pubmed: 4001944.
11. Alkan SS. Monoclonal antibodies: the story of a discovery that revolutionized science and medicine. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(2): 153–156, doi: [10.1038/nri1265](https://doi.org/10.1038/nri1265), indexed in Pubmed: 15040588.
12. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. 2012; 2012: 980250, doi: [10.1155/2012/980250](https://doi.org/10.1155/2012/980250), indexed in Pubmed: 22474489.
13. Steinwand M, Droste P, Frenzel A, et al. The influence of antibody fragment format on phage display based affinity maturation of IgG. *MAbs*. 2014; 6(1): 204–218, doi: [10.4161/mabs.27227](https://doi.org/10.4161/mabs.27227), indexed in Pubmed: 24262918.
14. Lu RM, Hwang YC, Liu IJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020; 27(1): 1, doi: [10.1186/s12929-019-0592-z](https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z), indexed in Pubmed: 31894001.
15. Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. *Nat Biotechnol*. 2007; 25(12): 1421–1434, doi: [10.1038/nbt1363](https://doi.org/10.1038/nbt1363), indexed in Pubmed: 18066039.
16. Cao W, Liu X, Bai T, et al. High-dose intravenous immunoglobulin as a therapeutic option for deteriorating patients with coronavirus disease 2019. *Open Forum Infect Dis*. 2020; 7(3): ofaa102, doi: [10.1093/ofid/ofaa102](https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa102), indexed in Pubmed: 32258207.
17. Jawhara S. Could intravenous immunoglobulin collected from recovered coronavirus patients protect against COVID-19 and strengthen the immune system of new patients? *Int J Mol Sci*. 2020; 21(7), doi: [10.3390/ijms21072272](https://doi.org/10.3390/ijms21072272), indexed in Pubmed: 32218340.
18. Who Mers-Cov Research Group. State of knowledge and data gaps of middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr*. 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: 24270606.
19. Shen C, Wang Z, Zhao F, et al. Treatment of 5 critically ill patients with COVID-19 with convalescent plasma. *JAMA*. 2020; 323(16): 1582–1589, doi: [10.1001/jama.2020.4783](https://doi.org/10.1001/jama.2020.4783), indexed in Pubmed: 32219428.
20. Hung IFN, To KKw, Lee CK, et al. Convalescent plasma treatment reduced mortality in patients with severe pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus infection. *Clin Infect Dis*. 2011; 52(4): 447–456, doi: [10.1093/cid/ciq106](https://doi.org/10.1093/cid/ciq106), indexed in Pubmed: 21248066.
21. Luke TC, Casadevall A, Watowich SJ, et al. Hark back: passive immunotherapy for influenza and other serious infections. *Crit Care Med*. 2010; 38(4 Suppl): e66–e73, doi: [10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e](https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181d44c1e), indexed in Pubmed: 20154602.
22. Gould EW. Human serum in the treatment of influenza bronchopneumonia *N Y Med J*. 1919; 109: 666–667.
23. Holst J. Convalescent serum in the treatment of influenza *Nor Mag Laegevidenskaben*. 1919; 80: 31–561.
24. Huff-Hewitt W. Human serum in influenza. *Br Med J*. 1919; 1: 575.
25. Griensven Jv, Edwards T, Lamballerie Xde, et al. Evaluation of convalescent plasma for Ebola virus disease in Guinea. *N Engl J Med*. 2016; 374(1): 33–42, doi: [10.1056/nejmoa1511812](https://doi.org/10.1056/nejmoa1511812), indexed in Pubmed: 26735992.
26. Who Mers-Cov Research Group. State of Knowledge and Data Gaps of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) in Humans. *PLoS Curr*. 2013; 5, doi: [10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.0bf719e352e7478f8ad85fa30127ddb8), indexed in Pubmed: 24270606.
27. Wong VWS, Dai D, Wu AKL, et al. Treatment of severe acute respiratory syndrome with convalescent plasma. *Hong Kong Med J*. 2003; 9(3): 199–201, indexed in Pubmed: 12777656.
28. <https://microbenotes.com/neutralization-test-introduction-and-types>.
29. Cheng Y, Wong R, Soo YOY, et al. Use of convalescent plasma therapy in SARS patients in Hong Kong. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2005; 24(1): 44–46, doi: [10.1007/s10096-004-1271-9](https://doi.org/10.1007/s10096-004-1271-9), indexed in Pubmed: 15616839.
30. Piechotta V, Iannizzi C, Chai KLI, et al. Convalescent plasma or hyperimmune immunoglobulin for people with COVID-19: a rapid review. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020; 5: CD013600, doi: [10.1002/14651858.CD013600](https://doi.org/10.1002/14651858.CD013600), indexed in Pubmed: 32406927.
31. Joyner MJ, Carter RE, Senefeld JW, et al. Convalescent plasma antibody levels and the risk of death from Covid-19. *N Engl J Med*. 2021; 384(11): 1015–1027, doi: [10.1056/NEJMoa2031893](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2031893), indexed in Pubmed: 33523609.
32. Food and Drug Administration. EUA 26382: emergency use authorization (EUA) request; 2020.
33. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-clinical-trial-testing-hyperimmune-intravenous-immunoglobulin-plus-remdesivir-treat-covid-19-begins>.
34. Vandeberg P, Cruz M, Diez JM. Production of anti-SARS-CoV-2 hyperimmune globulin from convalescent plasma *bioRxiv* 2020. 11; 18: 388991, doi: <https://doi.org/10.1101/2020.11.18.388991>.
35. Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion*. 2015; 55 Suppl 2: S47–S58, doi: [10.1111/trf.13147](https://doi.org/10.1111/trf.13147), indexed in Pubmed: 26174897.
36. Liu L, Wang P, Nair M, et al. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*. 2020; 584(7821): 450–456, doi: [10.1038/s41586-020-2571-7](https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7), indexed in Pubmed: 32698192.
37. Inpatient treatment with anti-coronavirus immunoglobulin (ITAC) [monograph on the internet]. *clinicaltrials.gov*; 2020. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04546581>.