

Immunoterapia peptydowa w leczeniu chorób alergicznych i autoimmunizacyjnych

Peptide immunotherapy for allergic and autoimmune diseases

Dr n. biol. Katarzyna Kołodziejska

Streszczenie: Immunoterapia peptydowa jest jedną z odmian swoistej terapii chorób alergicznych oraz autoimmunologicznych. Szczepionki peptydowe konstruowane są w oparciu o strukturę chemiczną wybranych epitopów komórek T, które wykazują duże znaczenie kliniczne. W zaprezentowanych badaniach klinicznych zastosowano kilka postaci szczepionek – formę podskórną, doustną, donosową oraz dożylną, z których wartość kliniczną wykazywała grupa preparatów iniekcyjnych. Tolerancję immunologiczną wykazano w przypadku chorób autoimmunologicznych (model zwierzęcego stwardnienia rozsianego – EAE, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca IDDM oraz miastenia), jak również chorób o podłożu alergicznym (alergia na roztocze kurzu domowego, pyłek brzozy, sierść kota oraz jad pszczoły).

Summary: Peptide-based immunotherapy has been developed in animal models and has been evaluated for human immunotherapy. Dominant T cell epitopes have been identified in both murine and human systems. Peptides based on these epitopes have been shown to prevent the induction of disease and to modulate ongoing disease in murine models of diseases following subcutaneous, oral, intranasal and intravenous administration. Peptide-induced tolerance has been demonstrated in models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), arthritis, diabetes (IDDM), myasthenia gravis, and more recently, in models of allergic sensitization with allergen sources including house dust mite, birch, bee venom and cat.

Słowa kluczowe: immunoterapia peptydowa, peptyd, choroby alergiczne, choroby autoimmunizacyjne.

Key words: peptide immunotherapy, peptide, tolerance, allergic disease, autoimmune disease

Swoista immunoterapia alergenowa jest jedyną metodą leczenia przyczynowego alergii. Jednak jej zastosowanie terapeutyczne nie ogranicza się jedynie do chorób alergicznych, wciąż poszukuje się dowodów skuteczności klinicznej w terapii niektórych chorób autoimmunizacyjnych. Do tej pory potwierdzona została skuteczność i bezpieczeństwo szczepionek będących roztworami wodnymi alergenów, ich formy depot oraz alergoidów wysoko i niskocząsteczkowych.

W ciągu ostatnich lat obserwuje się postęp w metodach standaryzacji materiału biologicznego zastosowanego w produkcji preparatów odczulających, zmierzający do obniżenia siły alergenowej szczepionki, a wzmocnienia jej efektu immunogenego [1].

Immunoterapia peptydowa jest jedną z odmian odczulania swoistego. Ten typ leczenia poddano ocenie w badaniach klinicznych uwzględniających przede wszystkim skuteczność i bezpieczeństwo terapii. Pierwszym etapem konstrukcji szczepionki

peptydowej jest identyfikacja epitopów dominujących komórek T. Na tej podstawie syntetyzuje się materiał, jakim są odpowiednie peptydy, które teoretycznie będą modulowały odpowiedź immunologiczną pacjenta [2].

W przeprowadzonych badaniach klinicznych zastosowano kilka postaci szczepionek peptydowych – formę doustną, podskórną, donosową oraz dożylną. Tolerancję immunologiczną jako efekt kliniczny wykazano w przypadku alergii na roztocze kurzu domowego, pyłek brzozy, sierść kota oraz chorób autoimmunologicznych, takich jak: stwardnienie rozsiane, reumatoidalne zapalenie stawów, cukrzyca IDDM oraz miastenia (*Myasthenia gravis*) [3–8].

Dyskusji wciąż poddaje się trafność badań wykonanych na modelach zwierzęcych, u których pierwotnie scharakteryzowano epitopy peptydów i ich elementy restrykcyjne. Wyniki tych prac potwierdzono w badaniach u ludzi, jednak nie w przypadku wszystkich ważnych determinant antygenowych.

Ważnym punktem w weryfikacji wyników prac badawczych jest problem wysokiego stopnia polimorfizmu ludzkiego kompleksu zgodności tkankowej MHC w odniesieniu do chorób alergicznych. Ten fakt pierwotnie skupił uwagę na aspektach zastosowania potencjalnej szczepionki, bowiem uważano, że nie będzie możliwe zastosowanie dużej liczby potencjalnych kombinacji epitop-MHC, biorących udział w patogenezie choroby (mało silnych związków z układem zgodności tkankowej).

Odmienną sytuację obserwuje się w przypadku chorób autoimmunizacyjnych takich, jak stwardnienie rozsiane, gdzie stwierdza się występowanie oczywistych zależności pomiędzy haplotypem HLA a chorobą. Identyfikacja immunodominujących epitopów peptydowych komórek T ograniczonych przez układ HLA-DR2 zaowocowała wieloma projektami badawczymi [9, 10].

Po zachęcających wynikach badań wstępnych z zastosowaniem syntetycznego peptydu opracowanego na bazie zasadowego białka mieliny MBP we fragmencie aminokwasowym 82–98, przeprowadzono kolejne fazy testów.

Po analizie wyników wykazano skuteczność leczenia, szczególnie podgrupy pacjentów z allelem HLA-DR2 i /lub -DR4. Jednakże nie zaobserwowano istotnych różnic w teście 22-metrowego spaceru.

Analiza progresji choroby w tej podgrupie pacjentów w piątym roku aktywnego leczenia wykazała istotną redukcję progresji choroby ze średnim czasem do pierwszego zaostrzenia – 78 miesięcy. W grupie placebo czas ten wynosił zaledwie 18 miesięcy. Ocenie klinicznej poddano również zmienioną formę tego samego immunodominującego epitopu MBP 83-99 (zmieniony ligand peptydowy; APL).

Stwierdzono, iż dawka do 50 mg peptydu na tydzień jest związana z najlepszymi wynikami terapii w stosunku do dawek dziesięciokrotnie niższych. Jednakże zaobserwowano liczne reakcje niepożądane, włączając w to zwiększoną liczbę uszkodzeń mózgu i reakcji nadwrażliwości na sam peptyd terapeutyczny, co prowadzi do nieprawidłowych odpowiedzi limfocytów T [10].

Zastosowanie immunoterapii peptydowej rozważano również w terapii chorób metabolicznych. Badaniom poddano pacjentów z cukrzycą typu I. Otrzymywali oni 3 podskórne iniekcje peptydu pochodzącego z białka szoku cieplnego hsp60 – p277 (APL) o stężeniu 1 mg. Po sześciu miesiącach badań w grupie pacjentów aktywnie leczonych, w przeciwieństwie do grupy pacjentów przyjmujących placebo, zaobserwowano podtrzymanie funkcji komórek wyspowych trzustki.

Stwierdzono, iż efekt terapeutyczny jest związany ze wzrostem syntezy cytokin – IL10 i IL13 [7, 8, 11].

Podobne wnioski wysunięto na podstawie innych badań przeprowadzonych u pacjentów ze stwierdzonym reumatoidalnym zapaleniem stawów. W leczeniu zastosowano inny peptyd hsp – dnaJ w formie szczepionki doustnej. Zaobserwowano wzrost indukcji syntezy IL10 i IL4 przez limfocyty T, a spadek poziomu cytokin prozapalnych – IFN γ i TNF α . Wykazano również zwiększoną ekspresję Fox p3 [5].

Skuteczność immunoterapii peptydowej oceniono również w leczeniu chorób alergicznych, szczególnie w przypadku alergii na sierść kota oraz alergii na jad pszczoły [12, 13].

W pierwszym przypadku zastosowano dwa duże peptydy zawierające determinanty antygenowe alergenu głównego kota – Fel d 1, nazwane przez badaczy IPC1 i IPC2.

Badaniem objęto 3 grupy pacjentów, którym podano 4 iniekcje preparatu peptydowego. Skuteczność kliniczną wykazano jedynie przy zastosowaniu najwyższej dawki peptydu (4 x 750 μ g). W toku dalszych badań zaobserwowano znaczną redukcję wytwarzania IL4 w komórkach T swoistych dla peptydów IPC1 i IPC2.

Wyniki tych prac potwierdzono w kolejnych badaniach przeprowadzonych z zastosowaniem wyizolowanych komórek PBMC pacjentów wcześniej poddanych immunoterapii peptydowej z wykorzystaniem IPC1 i IPC2. Stwierdzono istotną redukcję syntezy IL4 przez te komórki przy wysokich dawkach terapeutycznych szczepionki (1500–4500 mg).

Dyskusję na ten temat podtrzymują wyniki badań pochodzących z innych ośrodków naukowych. Autorzy nie stwierdzili zmian sposobu sekrecji cytokin przez PBMC przed i po kuracji peptydowej, ale zaobserwowano efekt późnego ujawniania się reakcji alergicznej podczas ekspozycji na alergeny sierści kota u osób poddanych immunoterapii peptydowej z użyciem IPC1/ IPC2 w dawce 4 x 250 mg [14, 15].

W innym wieloośrodkowym badaniu z udziałem 133 pacjentów jako efekt kliniczny opisano poprawę funkcji płuc (obniżony wskaźnik FEV1) u pacjentów aktywnie leczonych preparatem IPC1/IPC2 w schemacie 7 x 750 mg. Obserwowano również występowanie reakcji niepożądanych – reakcji nadwrażliwości typu późnego, jednakże ulegały one osłabieniu wraz z sukcesywnie wprowadzanymi dawkami peptydu, co sugerowało indukcję zmniejszenia wrażliwości odpowiedzi pacjenta [15].

Stosując mieszaninę peptydów o częściowo wspólnych sekwencjach (peptydy długości 16–17 ami-

nokwasów), obejmujących większość cząsteczki alergenu głównego kota Fel d 1, Oldfield i wsp. wykazali istotną redukcję reakcji skórnej późnej fazy na śródskórny bodziec, którym był ekstrakt alergenowy pełnej sierści kota. Po pojedynczej iniekcji mieszaniny 12 peptydów (5 mg każdego z nich) zaobserwowano w przybliżeniu 50% redukcję odpowiedzi skórnej późnej fazy. Stosując tę samą mieszaninę peptydów w randomizowanym badaniu, prowadzonym metodą podwójnie ślepej próby z kontrolą placebo, ci sami autorzy wykazali, że po serii iniekcji peptydów w coraz wyższym stężeniu odpowiedź skóry na pełny ekstrakt alergenowy była istotnie zmniejszona. Temu efektowi towarzyszyła obniżona odpowiedź ze strony PBMC. Co więcej, leczenie peptydem było związane z obniżeniem poziomu cytokin prozapalnych typu Th1 i Th2 oraz ze zwiększeniem wytwarzania cytokiny regulującej – IL10. Chociaż subiektywne miary wyników nie były w tym badaniu dokładnie analizowane, osoby aktywnie leczone wykazywały istotną poprawę pod względem zdolności tolerancji ekspozycyjnej podczas testów prowokacyjnych z użyciem żywych zwierząt [16, 17].

Podobne wnioski wysnuto na podstawie badań przeprowadzonych przez Alexandra i wsp. Wykazali oni, iż po terapii peptydowej zwiększa się poziom migracji limfocytów T CD25+ i CD4+ IFN γ + do miejsc w skórze poddanych ekspozycji na dany alergen. W tym badaniu nie zaobserwowano podwyższenia poziomu IL10, chociaż zanotowano istotny wzrost poziomu TGF β oraz redukcję nadwrażliwości oskrzelowej i późnej reakcji skórnej po ekspozycji na alergen [18].

Na podstawie wielu badań klinicznych przeprowadzonych z użyciem syntetycznych peptydów odzwierciedlających swą budową dany typ determinanty antygenowej odpowiedzialnej za indukcję lub progresję choroby, wysnuto koncepcję, zgodnie z którą immunoterapia peptydowa może indukować rozwój subpopulacji aktywnych, regulacyjnych limfocytów T, których fenotyp funkcjonalny wydaje się być związany z IL10, a w niektórych przypadkach z TGF β [19].

W przypadku alergii na jad owadów jako szczepionkę odczulającą zastosowano mieszaninę trzech fragmentów epitopowych fosfolipazy A₂ (PLA₂) jadu pszczoły. Badane peptydy były dobrze to-

lerowane. W badaniu Fellrath i wsp. zastosowano inny koktajl peptydowy – długie sekwencje aminokwasowe również będące fragmentami PLA₂. Wyniki tych prac świadczyły o pobudzeniu i zwiększonej odpowiedzi immunologicznej organizmu w postaci wzrostu syntezy i wydzielania IFN γ i IL10 oraz o podwyższeniu poziomu przeciwciał klasy IgG4 [2, 20].

Immunoterapia peptydowa wydaje się być skuteczną metodą terapii zarówno chorób o podłożu alergicznym, jak i autoimmunizacyjnym. Ważnym elementem w protokole odczulania jest zakres dawki antygenowej. Związane jest to prawdopodobnie z innymi mechanizmami regulatorowymi układu odpornościowego z przewagą apoptozy i anergii przy wyższych dawkach i indukcją adaptacyjnych, regulatorowych limfocytów T, która cechuje terapię z zastosowaniem niskich dawek peptydów. Wymienione mechanizmy jednakże w żaden sposób nie wykluczają się wzajemnie [21, 22].

Na podstawie wyników dotychczasowych badań wykazano, iż dawki tak niskie, jak 5 mg peptydu już indukują tolerancję immunologiczną. Wydaje się to być związane ze zwiększoną syntezą i aktywnością IL10, jak również TGF β . Zaobserwowano także swoistą odpowiedź o charakterze regulacyjnym w obrębie limfocytów populacji CD4+.

Warunkiem koniecznym do uzyskania opisanych efektów jest zastosowanie immunoterapii iniekcyjnej (śródskórna, podskórna i dożylna). Komponenty aktywne, czyli peptydy powinny być w formie wysoce rozpuszczalnej. Ważne jest zabezpieczenie w postaci eliminacji czynników indukujących przebieżność na drodze aktywacji receptorów Toll-like (TLR) i innych rodzin cząsteczek rozpoznających patogeny. Ponadto stwierdzono, iż prezentacja składników peptydowych przez spoczynkowe komórki prezentujące w stanie dynamicznej równowagi lub przez niewyspecjalizowane komórki prezentujące antygen, skutkuje odpowiedzią w postaci tolerancji, podobną do tej, która jest wywoływana przez same antygeny u osób zdrowych.

Immunoterapia peptydowa jest obiecującą metodą skutecznego leczenia przewlekłych chorób immunologicznych oraz bardzo użytecznym modelem do badania mechanizmów regulacji immunologicznej.

Piśmiennictwo:

1. Kowalski M.: *Immunoterapia alergenowa*. Mediton, Łódź 2003.
2. Larche M., Wraith D.C.: *Peptide-based therapeutic vaccines for allergic and autoimmune diseases*. *Nat Med* 2005; 11 (4 supl.):S69-S76.

3. Gaur A., Wiers B., Liu A., Rothbard J., Fathman C.G.: Amelioration of autoimmune encephalomyelitis by myelin basic protein synthetic peptide-induced anergy. *Science* 1992; 258(5087):1491-4.
4. Metzler B., Wraith D.C.: Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by inhalation but not oral administration of the encephalitogenic peptide: influence of MHC binding affinity. *Int Immunol* 1993; 5(9):11 59-65.
5. Prakken B., Wauben M., van Kooten P., Anderton S., van Der Z.R., Kuis W. et al.: Nasal administration of arthritis-related T cell epitopes of heat shock protein 60 as a promising way for immunotherapy in chronic arthritis. *Biotherapy* 1998; 10(3):205-
6. Tian J., Atkinson M.A., Clare-Salzler M., Herschenfeld A., Forsthuber T., Lehmann P.V. et al.: Nasal administration of glutamate decarboxylase (GAD65) peptides induces Th2 responses and prevents murine insulin-dependent diabetes. *J Exp Med* 1996; 183(4):1561-7.
7. Daniel D., Wegmann D.R.: Protection of nonobese diabetic mice from diabetes by intranasal or subcutaneous administration of insulin peptide B-(9-23). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(2):956-60.
8. Elias D., Meilin A., Ablamunits V., Birk O.S., Carmi P., Koenen-Waisman S. et al.: Hsp60 peptide therapy of NOD mouse diabetes induces a Th2 cytokine burst and downregulates autoimmunity to various beta-cell antigens. *Diabetes* 1997; 46(5):758-64.
9. Warren K.G., Catz I., Ferenczi L.Z., Krantz M.J.: Intravenous synthetic peptide MBP8298 delayed disease progression in an HLA Class II-defined cohort of patients with progressive multiple sclerosis: results of a 24-month double-blind placebo-controlled clinical trial and 5 years of follow-up treatment. *Eur J Neurol* 2006; 13(8):887-95.
10. Bielekova B., Goodwin B., Richert N., Cortese I., Kondo T., Afshar G. et al.: Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 2000; 6(10):11 67-75.
11. Raz I., Elias D., Avron A., Tamir M., Metzger M., Cohen I.R.: Beta-cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *Lancet* 2001; 358(9295):1749-53.
12. Briner T.J., Kuo M.C., Keating K.M., Rogers B.L., Greenstein J.L.: Peripheral T-cell tolerance induced in naive and primed mice by subcutaneous injection of peptides from the major cat allergen Fel d I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90(16).
13. Maguire P., Nicodemus C., Robinson D., Aaronson D., Umetsu D.T.: The safety and efficacy of ALLERVAX CAT in cat allergic patients. *Clin Immunol* 1999; 93(3):222-31.
14. Marcotte G.V., Braun C.M., Norman P.S., Nicodemus C.F., Kagey-Sobotka A., Lichtenstein L.M. et al.: Effects of peptide therapy on ex vivo T-cell responses. *J Allergy Clin Immunol* 1998; 101(4 Pt 1):506-13.
15. Maguire P., Nicodemus C., Robinson D., Aaronson D., Umetsu D.T.: The safety and efficacy of ALLERVAX CAT in cat allergic patients. *Clin Immunol* 1999; 93(3):222-31.
16. Oldfield W.L., Kay A.B., Larche M.: Allergen-derived T cell peptide-induced late asthmatic reactions precede the induction of antigen-specific hyporesponsiveness in atopic allergic asthmatic subjects. *J Immunol* 2001; 167(3):1734-9.
17. Oldfield W.L., Larche M., Kay A.B.: Effect of T-cell peptides derived from Fel d 1 on allergic reactions and cytokine production in patients sensitive to cats: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360(9326):47-53.
18. Alexander C., Ying S., Kay B., Larche M.: Fel d 1-derived T cell peptide therapy induces recruitment of CD4CD25⁺ CD4⁺ interferon-gamma T helper type 1 cells to sites of allergen-induced late-phase skin reactions in cat-allergic subjects. *Clin Exp Allergy* 2005; 35(1):52.
19. Fellrath J.M., Kettner A., Dufour N., Frigerio C., Schneeberger D., Leimgruber A. et al.: Allergen-specific T-cell tolerance induction with allergen-derived long synthetic peptides: results of a phase I trial. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 11 (4):854-
20. Tarzi M., Klunker S., Texier C., Verhoef A., Stapel S.O., Akdis C. et al.: Induction of interleukin-10 and suppressor of cytokine signaling-3 gene expression following peptide immunotherapy. *Clinical Experimental Allergy* 2006; 36(4):465-74.
21. Apostolou I., Von Boehmer H.: In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med* 2004; 199(10):1401-8.
22. Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., Khazaie K., Nussenzweig M.C., von B.H.: Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6(12):1219-27.

Adres autorki:

Dr n. biol. Katarzyna Kołodziejska

e-mail: katarzyna.kolodziejska@interia.pl