

RICERCA 2011: BANDO SCADUTO 23 NOVEMBRE 2011

Finanziamento di un progetto biennale dell'importo di 30.000 euro per ricercatori che alla data di scadenza del bando non avessero 45 anni: vincitore il dott. Racanelli di Bari

**PEPTIDI CHE MIMANO L'ANTIGENE CD20: POTENZIALITÀ
TERAPEUTICHE NEL LUPUS EITEMATOSO SISTEMICO**

Vito Racanelli, Elvira Favoino, Isabella E. Favia, Liboria Digiglio, Federico Perosa

Risultati ottenuti al termine del primo anno di lavoro**Background**

L'obiettivo del presente progetto di ricerca è sviluppare una strategia di vaccinoterapia in grado di prevenire ovvero ritardare la progressione del lupus eritematoso sistemico (LES).

Il LES è una malattia autoimmune caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi che possono essere potenzialmente diretti contro ogni organo o apparato, sebbene la cute, i reni, le sierose, i vasi ed il sistema nervoso sono i bersagli elettivi di tale autoaggressione. La malattia è ancora oggi associata ad un'elevata morbilità e mortalità. Pertanto, l'identificazione di nuovi e più efficaci approcci terapeutici è quanto mai necessaria.

Negli ultimi anni, l'attenzione degli immunologi si è incentrata sull'anticorpo monoclonale chimerico anti-CD20, denominato Rituximab, che ha mostrato interessanti risultati anche nel trattamento di patologie autoimmuni, tra le quali il LES (1) (2). Tuttavia, da numerosi studi è emerso che, per garantire la persistente remissione clinica alla malattia, sono necessarie periodiche infusioni di Rituximab, che espongono il paziente al rischio di reazioni di ipersensibilità e/o anafilassi. Pertanto, si sta valutando la possibilità di effettuare un approccio alternativo alla immunoterapia passiva con Rituximab, cercando di indurre nell'ospite una risposta anti-CD20 (immunoterapia attiva).

Infatti, da numerose ricerche è emerso che un vaccino costituito da un peptide che mima l'epitopo del dominio extracellulare di CD20 è in grado di indurre una risposta attiva, con effetti biologici simili a quelli osservati dopo somministrazione di anticorpi-anti CD20 (3). Il nostro gruppo ha recentemente caratterizzato 11 peptidi ciclici di 7 AA ciascuno, specifici per Rituximab. Tutti i peptidi esprimono il motif A/SNPS Rituximab-specifico. Tale motif è omologo alla porzione I70ANPS173 del dominio extracellulare del CD20 (4). In particolare, Rp15-C (uno degli undici peptidi) può indurre anticorpi anti-CD20 con specifici effetti citotossici, simili a quelli osservati con Rituximab (5). La disponibilità di un pannello di 11 peptidi specifici, dotati di stessa proprietà antigenica (tutti reattivi verso Rituximab) ma diversi per la sequenza amminoacidica che circonda il motif, rappresenta una opportunità unica per studiare i meccanismi molecolari della risposta immune indotta dagli stessi, nonché delle modalità con le quali le proprietà chimiche degli AA che fiancheggiano il motif possono influenzare il grado di specificità degli anticorpi verso A/SNPS. Partendo da tali osservazioni, il nostro obiettivo è quello di indurre una risposta immune anti-CD20 in modelli murini di malattia lupica (NZB/NZW) mediante la somministrazione di tali peptidi. Una volta identificato il/i peptidi più efficaci nello stimolare una risposta anti-CD20, si procederà alla sintesi del peptide mouse CD20 (mCD20) che esprime

il motif A/SNSS (la prolina del motif sarà sostituita con la serina), controparte murina dell'epitopo umano di CD20 riconosciuto da Rituximab.

Tuttavia, affinché un peptide risulti immunogenico, è necessario utilizzare degli adiuvanti che favoriscono l'attivazione del sistema immune contro il peptide. Vi sono evidenze che gli adiuvanti possono accelerare la malattia lupica (6). Shoenfeld ed Agmond-Levin hanno riscontrato in quattro condizioni morbose (siliconosi, malattia della guerra del Golfo, sindrome da miofascite macrofagica e fenomeni post-vaccinazioni) un minimo comune denominatore, rappresentato dalla recente esposizione ad adiuvanti, quali produttori di iperattività del sistema immune. A questa neodefinità entità sindromica è stato attribuito il nome 'ASIA' (autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvant)(7).

Per tale motivo, prima di iniziare la vaccinoterapia, abbiamo voluto valutare quale fosse l'adiuvante più appropriato in grado di non influire sul decorso della malattia lupica nei modelli animali utilizzati in questo progetto.

Fasi operative del progetto

1° anno: identificare l'adiuvante più idoneo da utilizzare nelle successive immunizzazioni con i peptidi che mimano l'antigene CD20.

2°anno: identificare il/i peptidi più efficaci nell'indurre una risposta anti-CD20.

1° anno:

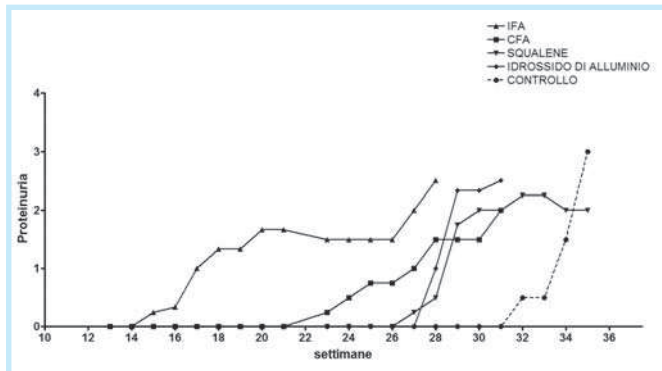
4 gruppi di topi NZB/NZW (4 topi per ciascun gruppo), topi che sviluppano una malattia lupica che ricorda quella umana, sono stati immunizzati con KHL (proteina carrier che rende i peptidi immunogenici) emulsionata con 4 tipi diversi di adiuvanti (adiuvante di Freund, IFA, squalene ed idrossido di alluminio), per valutare l'effetto di tali molecole sulla progressione della malattia. Sono stati considerati in questo studio gli adiuvanti comunemente usati per uso umano (tabella 1).

FORMULAZIONE DI VACCINO CONTENENTE L'ADIUVANTE	ADIUVANTE
Vaccini antiinfluenzali	SQUALENE
Vaccini sperimentali (vaccini anti-pandemici, vaccini anti-malarici)	
DTP (Anti Difterite-Tetano-Pertosse)	ALLUMINIO
H.i.B (Anti Haemophilus influenzae B)	
Epatite B	
Epatite A	
PCV (vaccino pneumococcico coniugato eptavalente)	
HPV (vaccino anti-Pappiloma Virus)	
Vaccino contro l'antrace	
Vaccino antirabbico	

Tabella 1: Formulazione di vaccini attualmente approvati per uso umano contenenti gli adiuvanti utilizzati nello studio.

Le immunizzazioni sono state effettuate mediante iniezioni intraperitoneali ripetute a distanza di 14 giorni (alla 9°, 11°, 13° e 15° settimana) fino alla comparsa dei sintomi di malattia conclamata (proteinuria maggiore di 300 mg/dl). Il decorso della malattia è stato monitorato continuamente, mediante l'analisi della proteinuria e mediante la valutazione del titolo degli anticorpi anti-DNA, e confrontato con i dati ottenuti dal gruppo di controllo (topi NZB/NZW non trattati con alcun adiuvante). Per tale scopo sono state raccolte e analizzate settimanalmente le urine e ogni quindici giorni i sieri e il sangue degli

animali immunizzati. L'analisi della proteinuria è stata effettuata mediante l'utilizzo di urine strip test; mentre il titolo degli anticorpi anti-DNA è stato valutato mediante test ELISA in piastre da microtitolazione sensibilizzate con DNA Calf Thymus. Dal sangue, invece, è stata raccolta e analizzata la popolazione linfocitaria (PBL) mediante analisi di immunofluorescenza diretta utilizzando anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi (citofluorimetria a flusso).



Proteinuria: 1=trace; 2=30mg; 3=100mg; 4=300 mg

Fig. 1: Livello di proteinuria dei relativi gruppi di topi. I dati sono espressi come media dei valori di proteinuria di ciascun gruppo.

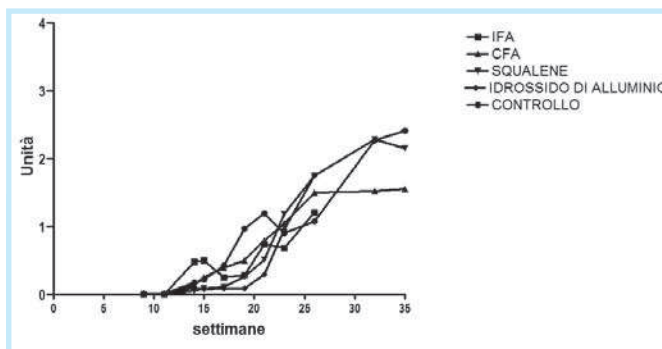


Fig. 2: Livello di anti-DNA dei relativi gruppi di topi. I dati sono espressi come media dei valori di unità del titolo degli anticorpi anti-DNA di ciascun gruppo.

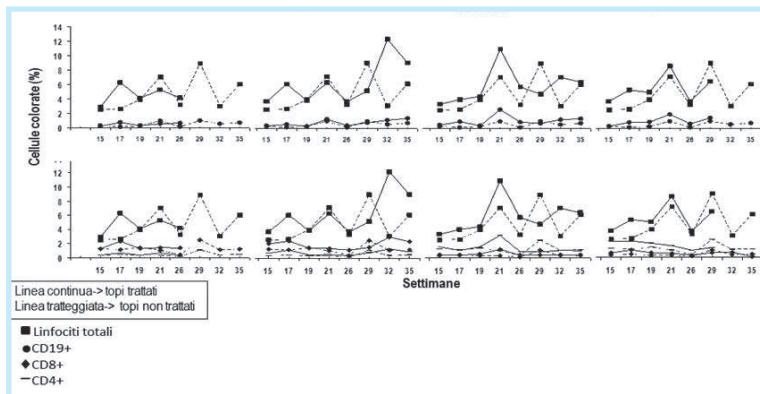


Fig. 3: Analisi della popolazione linfomonocitaria (PBL). I dati sono espressi come media dei valori delle popolazioni linfocitarie di ciascun gruppo.

Dai risultati ottenuti è emerso che l'IFA e il CFA accelerano in maniera significativa la malattia lupica, determinando un rapido aumento del livello di proteinuria (Fig. 1). L'IFA determina anche aumento del titolo degli anticorpi anti-DNA già a partire dalla 15° settimana (Fig. 2), mentre lo squalene e l'idrossido di alluminio hanno un'azione minore sulla progressione della malattia (il livello di proteinuria ed il titolo anticorpale iniziano ad aumentare solo a partire dalla 30° settimana).

L'analisi della popolazione linfocitaria, effettuata mediante immunofluorescenza, non ha, invece, mostrato alcuna variazione significativa tra i vari gruppi rispetto al gruppo controllo (Fig. 3).

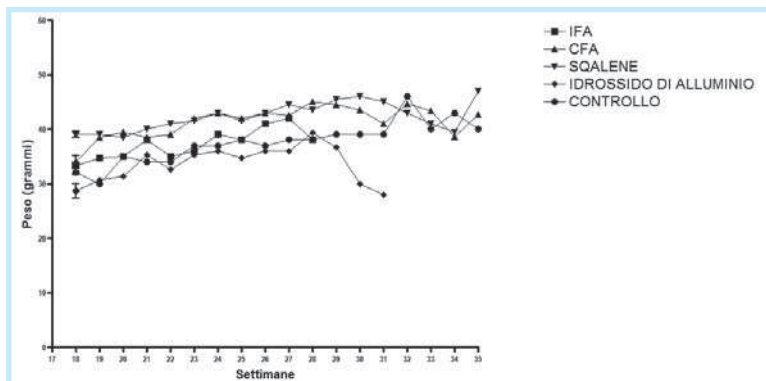


Fig.4: Variazioni del peso corporeo dei vari gruppi. I dati sono espressi come media dei valori di peso di ciascun gruppo.

Inoltre, è stata riscontrata una evidente variazione del peso corporeo del gruppo di topi immunizzati con l'idrossido di alluminio rispetto al gruppo di controllo (Fig.4): l'idrossido di alluminio, infatti, nonostante non accelera il decorso della malattia lupica, determina un calo ponderale consistente sino ad una condizione di cachessia degli animali trattati con tale adiuvante.

Pertanto, dai risultati ottenuti si evince che il miglior adiuvante da utilizzare nelle immunizzazioni con i peptidi è lo squalene, in quanto non interferisce in maniera significativa con la progressione della malattia e tanto meno determina un deperimento generale dell'animale. La fase successiva del nostro studio è la seguente:

Valutare l'efficacia dei peptidi che mimano l'antigene CD20 murino nel controllare la malattia simil-lupica in topi NZB/NZW.

Se portato a termine con successo, tale approccio potrà essere traslato al trattamento della patologia lupica umana, utilizzando il o i peptidi che esprimono il motif hCD20 A/SNPS.

BIBLIOGRAFIA

1. Weide R, Heymanns J, Pandorf A, Koppler H: Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy. *Lupus* 12:779, 2003.
2. Looney RJ, Anolik J, Sanz I: Treatment of SLE with anti-CD20 monoclonal antibody. *Curr Dir Autoimmun* 8:193, 2005.
3. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Prete M, Dammacco F: CD20: A target antigen for immunotherapy of autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 4:526, 2005.
4. Perosa F, Favoino E, Caragnano MA, Dammacco F: Generation of biologically active linear and cyclic peptides has revealed a unique fine specificity of rituximab and its possible crossreactivity with acid sphingomyelinase-like phosphodiesterase 3b precursor. *Blood* 107:1070, 2006.
5. Perosa F, Favoino E, Vicenti C, Merchionne F, Dammacco F: Identification of an antigenic and immunogenic motif expressed by two 7-mer rituximab-specific cyclic peptide mimotopes: implication for peptide-based active immunotherapy. *J Immunol* 179:7967, 2007.
6. Satoh M, Kuroda Y, Yoshida H, Behney K. M, Mizutani A, Akaogi J, Nacionales D.C, Lorenson T. D, Rosenbaur R. J, Reeves W. H: Induction of lupus autoantibodies by adjuvant. *Journal of Autoimmunity* 21:1-9, 2003.
7. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N.: 'ASIA'-autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J Autoimmunity* 36:4-8, 2011.