

University of Groningen

Subcutaneous and sublingual allergen specific immunotherapy in experimental models for allergic asthma

Hesse, Laura

DOI:
[10.33612/diss.158737284](https://doi.org/10.33612/diss.158737284)

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:
2021

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):
Hesse, L. (2021). *Subcutaneous and sublingual allergen specific immunotherapy in experimental models for allergic asthma*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen. <https://doi.org/10.33612/diss.158737284>

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 11

Nederlandse samenvatting



Parts of the Dutch Summary were published as:

Hesse L, Oude Elberink JNG, Nawijn MC. Allergeenspecifieke immunotherapie voor inhalatieallergenen: het belang van het verhogen van de effectiviteit. Ned. Tijdschrift Allergie & Astma 2014;14:62-8.

SUBCUTANE EN SUBLINGUALE ALLERGEEN SPECIFIEKE IMMUNOTHERAPIE VOOR INHALATIEALLERGENEN IN EEN PREKLINISCH MODEL VAN ALLERGISCH ASTMA

Allergisch astma

Hooikoorts is een allergische ziekte van de neus, oftewel van de bovenste luchtwegen. Allergisch astma is een aandoening van de lagere luchtwegen. Deze allergische luchtwegaandoeningen zijn chronische ontstekingsziekten met klachten zoals tranende ogen, niezen en benauwdheid. Deze klachten worden veroorzaakt door het inademen van een allergeen zoals bijvoorbeeld pollen van grassen of bomen, huisstofmijt of huidschilfers van katten. Bij mensen met een allergie heeft een eerdere blootstelling aan het allergeen geleid tot de productie van specifieke immuunglobuline E (IgE)-antilichamen. Deze IgE antilichamen binden vervolgens aan specifieke receptoren op mestcellen en basofiele granulocyten. Als er opnieuw blootstelling aan het allergeen plaatsvindt zal dit door de IgE antilichamen worden gebonden, wat leidt tot IgE cross-linking en degranulatie van mestcellen en basofielen. De vrijgekomen mediators, zoals histamine, prostaglandine D₂ en leukotriënen, induceren de acute allergische reactie. Deze acute allergische reactie vindt plaats binnen enkele minuten na blootstelling, en kan enkele uren duren. De acute allergische respons veroorzaakt bronchoconstrictie en mucusproductie in de luchtwegen, wat leidt tot benauwdheid. Tevens draagt de acute allergische respons bij aan zwelling doordat er vasodilatatie en verhoogde vasculaire permeabiliteit optreedt. Dit leidt tot influx van verschillende witte bloedcellen in het aangedane weefsel. De CD4⁺ T-helper 2 (Th2)-cellen activeren door productie van cytokines als IL-4, IL-5 en IL-13 de andere witte bloedcellen, zoals eosinofiele granulocyten, mestcellen en basofiele granulocyten. Dit veroorzaakt vervolgens de late allergische reactie, die ook weer tot bronchoconstrictie en benauwdheid kan leiden. Daarnaast veroorzaakt een langdurige blootstelling (bijvoorbeeld een geheel pollenseizoen) een chronische ontsteking van de luchtwegen, gekarakteriseerd door hyperreactiviteit, oedeem, huiderythem en grote aantallen eosinofiele granulocyten.

Niet alle mensen die zijn blootgesteld aan allergenen ontwikkelen een IgE-respons. Ook ontwikkelen niet alle individuen mét specifiek IgE ook daadwerkelijk klachten bij hernieuwde allergeen blootstelling. Dit wordt deels verklaard doordat de gevoeligheid voor het ontwikkelen van allergische rinoconjunctivitis of allergisch astma genetisch bepaald wordt. Op immunologisch niveau is dit het verschil tussen de inductie van Th2-gedreven immuniteit versus de inductie van tolerantie.

Allergeen specifieke immunotherapie

Gezien het grote ongemak voor patiënten, de wereldwijd stijgende prevalentie en het gebrek aan reële preventieve mogelijkheden is een therapie die allergische aandoeningen kan genezen hard nodig. Om een allergie werkelijk te genezen moet de ongewenste immunoreactie permanent worden omgebogen in een algehele tolerantie voor het allergeen. De huidige medicatie is echter gericht op het onderdrukken van de symptomen en is in geen van de gevallen genezend. Een mogelijke uitzondering hierop is de allergeen specifieke immunotherapie (AIT, hyposensibilisatie of allergeenvaccinatie genoemd), die ruim een eeuw geleden voor het eerst werd toegepast voor de behandeling van hooikoorts. Het principe van AIT is sindsdien niet echt veranderd: uit een ruwe

grondstof (bijvoorbeeld graspollen) wordt een extract gemaakt, het AIT-preparaat. Behandeling bestaat uit een opdoseer-fase van wekelijkse, onderhuidse injecties (subcutane immunotherapie, SCIT) met een toenemende dosis van het allergeen, tot een maximale dosis wordt bereikt na twee maanden. Hierna volgt een onderhoudsfase met maandelijks toedieningen op de hoogste dosering, gedurende drie tot vijf jaar. Ook toediening onder de tong in de vorm van druppels of tabletten (sublinguale immunotherapie, SLIT) wordt steeds meer toegepast, waarbij de opdoseer-fase korter is, er in de onderhoudsfase dagelijks een tablet of druppels worden gebruikt, en de totale duur van de behandeling ongewijzigd blijft. Na het stopzetten van de behandeling hebben patiënten met allergische rinoconjunctivitis of allergisch astma langdurige vermindering van de allergische klachten (tot meer dan tien jaar). Deze onderdrukking wordt veroorzaakt door de inductie van immunologische tolerantie tegen het allergeen. Daarnaast vermindert de AIT-behandeling de kans op het ontwikkelen van astma bij kinderen die al een allergie hebben en vermindert het de kans op (nieuwe) sensibilisaties voor andere allergenen. AIT kent echter ook belangrijke nadelen, zoals de variabele effectiviteit, zeker bij astma, de duur van de behandeling en de vereiste klinische monitoring tijdens de opdosering-fase om in te kunnen grijpen bij ernstige allergische reacties. Deze nadelen hebben ertoe geleid dat AIT nog steeds niet op grote schaal wordt toegepast voor hooikoorts en astma. AIT zou als profylaxe kunnen worden gebruikt, maar dat is tot op heden bij hoog-risico kinderen nog niet effectief gebleken. Om deze redenen is het erg belangrijk om AIT te verbeteren wat betreft effectiviteit, veiligheid én de duur van de behandeling, om deze behandeling effectief in te kunnen zetten bij meerdere allergische aandoeningen.

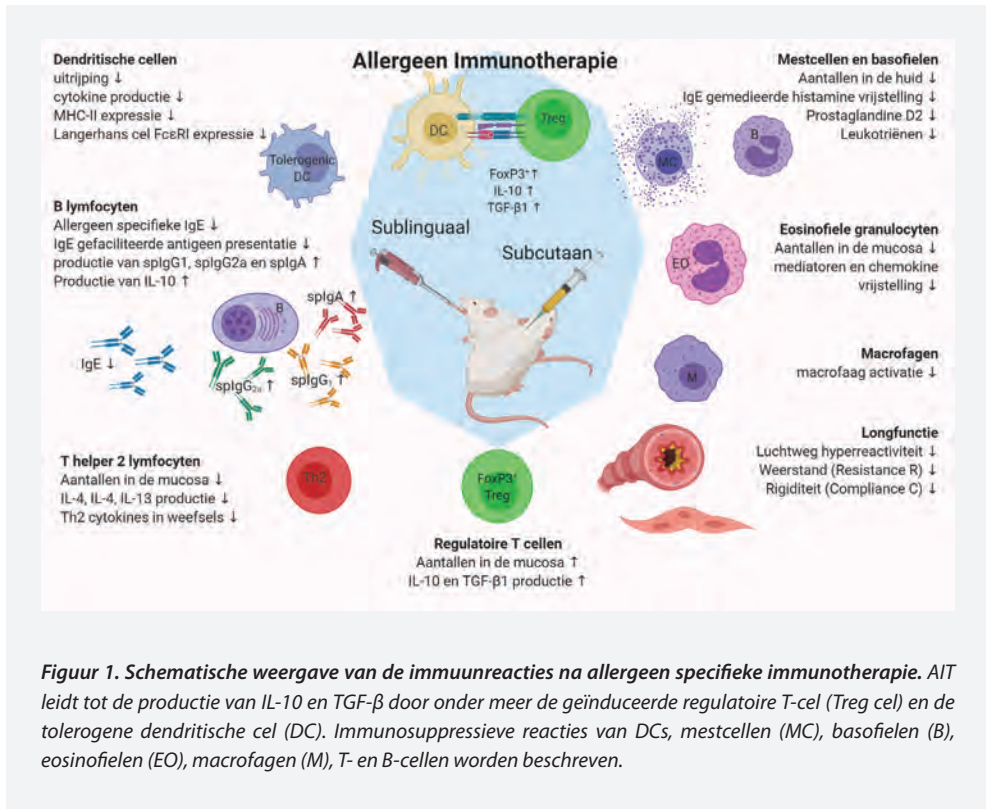
In dit promotieonderzoek zijn verschillende mogelijkheden getest om allergeen immunotherapie te verbeteren, waarbij ik gebruik maak van een gestandaardiseerd experimenteel model in muizen. Er wordt een overzicht gegeven van de nieuwe inzichten in de werking van AIT en de mogelijkheden voor verbetering van de werkzaamheid om de symptomen van allergisch astma en hooikoorts langdurig te kunnen onderdrukken. Tevens wordt kort ingegaan op de nieuwe inzichten met betrekking tot de verbeterde formuleringen van de preparaten om eveneens de werkzaamheid van sublinguale toepassingen te verbeteren.

Het werkingsmechanisme van AIT

Specifieke kennis over het werkingsmechanisme van AIT is tot op heden onvolledig. Echter, deze kennis is noodzakelijk voor het ontwerpen van verbeteringen, die leiden tot het verhogen van de efficiëntie van de behandeling. In de loop van de 20^e eeuw zijn de rol van blokkerende IgG-antilichamen, de inductie van T-celenergie, een verschuiving van een Th2-cytokinerespons naar een Th1-respons en de inductie van regulatoire T-cellen (Treg-cellen) nader onderzocht. Klinisch zijn de inductie van interleukine-10 (IL-10) producerende cellen, een toename van de fractie Treg-cellen in het bloed en een neutraliserende activiteit in het serum geassocieerd met succesvolle therapie. De meest gangbare hypothese voor het werkingsmechanisme van AIT is op dit moment dat de vereiste immunologische tolerantie wordt bewerkstelligd door de inductie van allergeen specifieke Treg-cellen, en het verlies van specifieke Th2 cel populaties. Daarnaast wordt er een belangrijke rol toegewezen aan neutraliserende antilichamen, waardoor het allergeen het IgE op de mestcellen niet meer kan activeren.

In klinische studies is het uitdaging om een correlatie aan te tonen tussen de AIT-geïnduceerde verbetering van klachten en veranderingen in deze specifieke immunologische parameters. Zo is het vinden van een toename in aantal of activiteit van allergeen specifieke Treg-cellen in het bloed technisch erg moeilijk door de lage frequentie van deze cellen. Echter, als er met immunohistochemische technieken direct in het weefsel van de mucosa van de neus of de mondholte wordt gekeken, wordt er wel degelijk een toename van de Treg-cellen gevonden bij AIT-behandelde patiënten en niet bij met placebo behandelde allergische patiënten die als controlegroep dienen in dit onderzoek. Hierbij is gekeken naar de fractie FoxP3⁺-cellen binnen de T-celpopulatie, wat een marker is voor regulatoire T-cellen. Deze resultaten lijken aan te geven dat de inductie van Treg-cellen inderdaad een belangrijke component is voor succesvolle therapie (Figuur 1). Deze cellen zijn echter maar gedeeltelijk verantwoordelijk voor de onderdrukking van de allergische verschijnselen na allergeenprovocatie. De dendritische cel (DC), die het allergeen presenteert ten tijde van de allergeenprovocaties, lijkt tevens een belangrijke rol te spelen bij het onderdrukken van de allergische verschijnselen als deze cellen een tolerantie-inducerend, of tolerogeen, fenotype hebben. Uit literatuur blijkt dat verbetering van de effectiviteit van AIT in de experimentele modellen vooral goed werkt met adjuvantia, die het tolerogene fenotype van de DC versterken of de costimulatoire interactie tussen de DC en de allergeen specifieke T-cel tijdens de behandeling voorkomen. Onderzoek naar verhoging van de therapeutische efficiëntie van AIT voor een bredere klinische toepassing van deze behandelingsmethode dient zich dus vooral te richten op het verkrijgen van een tolerogeen fenotype van de allergeen presenterende DC tijdens de behandeling. In dezelfde studies wordt eveneens een verhoging van neutraliserende activiteit (specifieke blokkerende antilichamen, IgG1) in het serum gevonden. Hiermee blijft het onduidelijk welke immunologische verandering nu essentieel is en of we de therapie veiliger, sneller en meer effectief kunnen maken (Figuur 1).

Om de werkingsmechanismen van AIT in detail te kunnen bestuderen en mogelijkheden te kunnen onderzoeken om de therapie te verbeteren, is een muismodel voor allergisch astma ontwikkeld waarin de verschillende astmatische verschijnselen door AIT onderdrukt konden worden. Als eerste stap worden muizen gesensibiliseerd tegen een allergeen. Hierbij vindt uitrijping van allergeen specifieke Th2-cellen en inductie van een specifieke IgE-respons plaats. De allergische sensitisatie wordt functioneel getest door een huidtest (intradermale allergeen injectie in het oor) waarbij de oorzwellings wordt gemeten. Vervolgens worden de luchtwegen herhaaldelijk blootgesteld aan het allergeen (de 'provocatie'). Bij gesensibiliseerde muizen die geen behandeling krijgen wordt na provocatie een sterke toename van specifiek IgE in het serum gemeten, verhoogde aantallen eosinofielen in de bronchoalveolaire lavagevloeistof en in de longen, alsmede verhoogde hyperreactiviteit van de luchtwegen, hetgeen een goede reflectie is van de verschijnselen van allergisch astma bij de mens. Bij muizen behandeld met SCIT of SLIT is er na provocatie geen inductie meer van specifiek IgE, een sterk verlaagde hoeveelheid eosinofielen en verminderde hyperreactiviteit van de longen. Door het toepassen van AIT bij gesensibiliseerde muizen is het mogelijk deze allergische verschijnselen na een volgende provocatie te onderdrukken. Met dit muismodel worden de mechanismen van AIT tot in detail bestudeerd (Figuur 1).



Figuur 1. Schematische weergave van de immunoreacties na allergene specifieke immunotherapie. AIT leidt tot de productie van IL-10 en TGF-β door onder meer de geïnduceerde regulatoire T-cel (Treg cel) en de tolerogene dendritische cel (DC). Immunosuppressieve reacties van DCs, mestcellen (MC), basofielen (B), eosinofielen (EO), macrofagen (M), T- en B-cellen worden beschreven.

LESSEN UIT EXPERIMENTELE MUISMODELLEN VOOR AIT

Lage concentraties allergenen in subcutane immunotherapie verhogen inflammatoire parameters in GP geïnduceerd allergisch astma in een muismodel

Het gebruik van diermodellen in het wetenschappelijk onderzoek wordt beschouwd als een waardevol preklinisch model om immunotherapie te verbeteren door mechanismen van allergene desensitisatie te ontrafelen. Hiervoor is veel gebruik gemaakt van het eiwit ovalbumine (OVA) als model allergeen. OVA heeft echter niet de eigenschappen van natuurlijke allergenen die bijdragen aan respiratoire allergie, en OVA induceert zelfs tolerantie bij inademing door naïeve muizen. Voor een translationeel model is het belangrijk gebruik te maken van echte aero-allergenen zoals huisstofmijt of graspollen. In **hoofdstuk 2** wordt daarom een reproduceerbaar preklinisch graspollen (GP) (*Phleum pratense* (Phl p)) muismodel van astma beschreven gebruik makend van BALBc/ByJ muizen. In dit model hebben we met lage doseringen GP subcutane immunotherapie (SCIT) uitgevoerd om een optimale werkzame dosis te vinden die parameters van allergische ontsteking kan verlagen. In de meer anafylaxie gevoelige stammen, zoals C57Bl/6J muizen, hebben we een SCIT-protocol geoptimaliseerd met een opdoseerschema van 7 injecties.

Door OVA te vervangen met een natuurlijk allergeen zijn de resultaten en optimalisaties in

deze modellen beter te vertalen naar de kliniek. Onze resultaten laten zien dat GP, een natuurlijk allergeenextract, kan worden gebruikt in onze experimentele muismodel van allergische luchtwegontsteking, waarin sensibilisatie en provocaties met GP leiden tot een verhoogde serologische IgE respons en sterkere oorzwellung na intradermale injectie met allergeen. Bovendien leiden provocaties met GP tot een aanmerkelijk verhoogde luchtwegweerstand, verminderde long rigiditeit en verhoogde aantallen eosinofiele granulocyten in zowel BALF als long cel-suspensies. Echter, bij lage allergeen doseringen is GP-SCIT niet in staat om parameters van allergische inflammatie te verlagen.

We vonden juist verergering van allergische symptomen door de lage-dosis GP-SCIT-behandeling, zoals een sterkere GP-specifieke IgE inductie, lagere GP-specifieke IgG concentraties, verhoogde zwelling van het oor, versterkte luchtwegweerstand en toegenomen eosinofiel aantallen in BALF en longen. De GP-SCIT-injecties in C57Bl/6J muizen werden tot een hogere dosis doorgevoerd en resulteerden wel in succesvolle desensitisatie na zeven injecties. Het leidde tot verlaging van allergische ontsteking en eosinofiele granulocyten na GP-provocaties, verhoogde concentraties van neutraliserende GP-specifieke IgGs, verlaagde concentraties specifiek IgE en verminderde zwelling in het oor na intradermale allergeen injecties. Ondanks de gevoeligheid van deze muizen om anafylaxie te ontwikkelen, hebben we een succesvol SCIT-protocol kunnen optimaliseren, dat stam-onafhankelijk reproduceerbare resultaten oplevert en daarmee bijdraagt aan toekomstige optimalisatiestudies binnen AIT voor allergische astma.

SCIT onderdrukt de Th2 gedreven inflammatie en induceert neutraliserende antilichamen, maar SLIT onderdrukt luchtweg hyperreactiviteit in een GP gedreven muismodel voor allergisch astma

Klinische studies waarin een directe vergelijking is gemaakt tussen SCIT en SLIT rapporteren een andere kinetiek en omvang van de immunologische veranderingen tijdens de behandeling. Vergelijkende onderzoeken naar de werkingsmechanismen van immunotherapie met verschillende toedieningsroutes in een gestandaardiseerd experimenteel model ontbreken. In **hoofdstuk 3** werd het muismodel voor allergisch astma daarom ingezet om een GP-SCIT en GP-SLIT-studie uit te voeren, dat directe vergelijking van de twee behandelingen mogelijk maakt, om de immunologische veranderingen en onderdrukking van klinisch relevante parameters te karakteriseren. In ons experimenteel muismodel blijkt dat GP-SLIT-behandeling allergeengeïnduceerde luchtweghyperreactiviteit kan onderdrukken, terwijl de behandeling niet geheel effectief blijkt voor het onderdrukken van de allergische ontsteking, zelfs niet bij de hoogste GP dosis. Daarentegen resulteert de GP-SCIT-behandeling in hogere concentraties van specifieke neutraliserende antilichamen, terwijl GP-SLIT superieur is in het induceren van een GP-specifieke IgG2a respons, die is geassocieerd met een verhoogde Th1 activiteit in longweefsel. Een interessante uitkomst is dat GP-SCIT eveneens in staat is Th2-type cytokineproductie te onderdrukken. Deze resultaten geven aan dat de twee toedieningsroutes werkzaam zijn via deels verschillende mechanismen van tolerantie-inductie.

Vitamine D3 als adjuvans in SCIT en SLIT verbetert de onderdrukking van GP-geïnduceerde allergisch astma

Naast het onderzoeken van de specifieke, immunologische werkingsmechanismen van AIT, kan het experimentele model ook gebruikt worden om de effectiviteit van AIT te verhogen, bijvoorbeeld door het toevoegen van adjuvans aan het allergeen. Klassiek worden de meeste vaccinaties, zoals een H1N1-influenzavaccin, gecombineerd met een adjuvans dat als doel heeft de gewenste sterke immuunreactie op te wekken tegen het antigeen dat wordt toegediend. De mogelijke voordelen van het gebruik van dergelijke adjuvantia werd al beschreven in 1927, met het gebruik van kaliumalun. Adjuvantia beïnvloeden het fenotype van de antigeen presenterende cel, en daarmee de aard van de T-celrespons die wordt geïnduceerd tegen het gebruikte antigeen.

Voor AIT is het nodig een adjuvans te kiezen dat een sterke tolerogene werking heeft: de gewenste T-celrespons is immers een regulatoire T-cel respons. Huidig onderzoek richt zich onder andere op het gebruik van 1,25-dihydroxyvitamine D3 (VitD3) als adjuvans voor AIT. Naast zijn vitale rol in het bot- en calciummetabolisme, staat VitD3 bekend om zijn immuun-regulerende eigenschappen. VitD3 werkt onder meer in op de DC en leidt tot verminderde expressie van costimulatoire moleculen als CD40, CD80 en CD86 en een verhoogde IL-10-productie. Het toevoegen van VitD3 aan AIT zou het therapeutisch effect kunnen versterken. In het klassieke experimentele OVA-muismodel is aangetoond dat het toevoegen van VitD3 tijdens de allergeeninjecties inderdaad de effectiviteit van de therapie sterk vergroot. Bij de mens zijn er eveneens sterke aanwijzingen dat de effectiviteit van AIT is gecorreleerd aan de serumwaarden van VitD3, alhoewel supplementatie van VitD3 tijdens AIT tot nu toe nog geen grote effecten geeft in klinische studies.

Hoofdstuk 4 beschrijft het eerste onderzoek waarin de adjuvans effecten van VitD3 met GP-SCIT en GP-SLIT-behandelingen in een experimenteel muismodel van allergische luchtwegaandoeningen zijn onderzocht. In tegenstelling tot eerdere resultaten met behulp van GP-SCIT en GP-SLIT zonder adjuvans (hoofdstuk 2 en 3), vinden we hier een prominente Treg activiteit in longweefsel na VitD3-GP-SCIT en GP-SLIT, zoals blijkt uit de verhoogde concentraties van IL-10 en in GP-SLIT van TGF- β 1. Dit gaat echter niet gepaard met een duidelijke onderdrukking van Th2 cytokine responsen bij lage doseringen VitD3 in GP-SCIT en GP-SLIT. Wel beschrijven we een selectieve reductie van eosinofielen in VitD3-GP-SCIT behandelde muizen, wat kan wijzen op een verhoogde Treg activiteit. In het experimentele muismodel kunnen we de effectiviteit van VitD3 als adjuvans in GP-SCIT en GP-SLIT onderling goed vergelijken. Lage doseringen VitD3 kunnen onderdrukking geven van de luchtwegontsteking in zowel SCIT als SLIT, maar van de hyperreactiviteit alleen in SLIT. Daarnaast hebben we een duidelijke onderdrukking van de oorzwellings- en luchtwegweerstand waargenomen in GP-SLIT met VitD3. De overige effecten van VitD3 in GP-SCIT en GP-SLIT zijn vergelijkbaar: inductie van blokkerende specifieke antilichamen (specifiek IgG2a) en onderdrukking van eosinofiele granulocyten. Deze bevindingen tonen aan dat het effect van VitD3 als adjuvans in subcutane zowel als sublinguale AIT zichtbaar is in het verbeteren van de manifestaties van allergisch astma.

In het vervolgonderzoek, zoals beschreven in **Hoofdstuk 5**, werd getracht de optimale VitD3-dosis te vinden in ons GP-SCIT-model met de beste onderdrukking van alle parameters van allergische luchtwegaandoeningen. Daarnaast hebben we getest of het gebruik van het synthetische lipide

SAINT in de mix van GP-SCIT-extract en VitD3, de onderdrukking van parameters van allergische ontsteking verder verbeterd in ons experimenteel muismodel van GP-SCIT. Hierin rapporteren we een duidelijk dosisafhankelijk effect van VitD3 in GP-SCIT met opmerkelijke effecten bij hooggedoseerde VitD3 in vergelijking met de niet-aangevulde GP-SCIT-groep: lagere totale en GP-splgE concentraties en een verbeterde GP-splgG1 respons resulterend in verhoogde neutraliserende activiteit, evenals onderdrukking van oorzwellingsreacties, verlaging van de luchtwegweerstand, Th2-cytokinen en eosinofiele granulocyten in BALF en longweefsel. Belangrijk is dat we een duidelijke correlatie hebben gevonden tussen de VitD3 dosering tijdens GP-SCIT en de effectieve dosis methacholine nodig om de luchtwegweerstand te doen stijgen. Deze uitkomsten identificeren luchtwegweerstand als een van de meest gevoelige parameters voor toenemende doseringen van VitD3. Toevoeging van het synthetische, biocompatibele lipide SAINT, als drager voor het lipofiele VitD3, versterkte de VitD3-afhankelijke onderdrukking van allergische manifestaties echter niet verder, zelfs niet bij suboptimale GP-doseringen. Deze onderzoeken geven aan dat het gebruik van VitD3 als adjuvans een interessante mogelijkheid is om de klinische werkzaamheid van AIT te verbeteren.

SCIT met gemodificeerde Phl p5a-afkomstige peptiden is effectief in het verbeteren van allergisch astma in een muismodel

Allergeen immunotherapie wordt klassiek gegeven door ruwe allergeenextracten te gebruiken. Het gebruik van natuurlijke allergenen in AIT kan soms leiden tot ernstige bijwerkingen, zoals anafylaxie, als gevolg van IgE-cross-linking op mestcellen of basofielen. Deze nadelige effecten kunnen worden voorkomen door de allergeniciteit (het vermogen om IgE te crosslinken en een allergische reactie te induceren) te verminderen. Hierbij is het uiteraard belangrijk dat de tolerogeniteit van de allergenen (het vermogen om tolerantie te induceren) behouden blijft. Het verlagen van de allergeniciteit kan worden bewerkstelligd door de ruwe extracten op te zuiveren tot zijn belangrijkste allergeen componenten of zelfs het produceren van recombinant allergenen, en deze gezuiverde preparaten vervolgens te bewerken om allergeniciteit te verminderen. Tevens kan gebruik worden gemaakt van korte synthetische peptiden, die dominante T-cel epitopen van een belangrijk allergeen vertegenwoordigen, maar de tertiaire structuur missen die nodig is om aan IgE te binden. Hierdoor hebben peptiden een beter veiligheidsprofiel dan het ruwe extract, en daarmee een sterk verlaagde allergeniciteit.

Peptiden moeten echter efficiënt door DCs worden opgenomen om aan T-cellen te worden gepresenteerd en hun vermeende tolerogene activiteit uit te oefenen. Het specifiek laten opnemen van deze peptiden door de DCs zou de werkzaamheid van peptide AIT kunnen verbeteren. DCs brengen sialzuur-bindende Ig-achtige lectines (siglecs) tot expressie. Via deze receptoren kunnen de DCs eiwitten, die sialzuur-groepen hebben, beter opnemen. Daarnaast verandert de opname van een eiwit via een Siglec receptor het fenotype van de DC, dat bij sommige Siglec receptoren leidt tot een tolerogeen fenotype. Bij muizen is aangetoond dat sialylering van antigenen opname via de Siglec-E receptor versterkt. Bovendien instrueert opname via de Siglec-E receptor de DC om een antigeen specifieke tolerogene toestand te induceren, wat de generatie en activatie van Treg-cellen verbetert, terwijl de inflammatoire functie van Th2-cellen juist wordt geremd.

In **hoofdstuk 6** is de volgende hypothese geformuleerd: 'Sialylering van allergeen-afgeleide peptiden kan de inductie van allergeenspecifieke Treg-cellen versterken en de werkzaamheid van peptide AIT verhogen in ons muismodel van allergisch astma.' Om deze hypothese te testen in een experimenteel proefdiermodel, hebben we geschikte peptide sequenties nodig waarvan we weten dat ze reactief zullen zijn in GP-gesensibiliseerde Balb/cByJ muizen. Daarom zijn we gestart met *in vitro* celkweken van DCs, beladen met (al dan niet) gesialyleerde peptiden afgeleid van het allergeen Phl p5a, dat aanwezig is in het ruwe extract GP. Deze beladen DCs zijn samen gekweekt met CD4⁺ T-cellen uit GP-gesensibiliseerde muizen. De mogelijke tolerogene functie van de DCs is onder meer uitgelezen als verhoogde FoxP3 expressie en TGFβ1 afgifte. Op basis van de resultaten van deze T cel kweken hebben we een selectie gemaakt van specifieke peptiden die we hebben geïncludeerd in ons SCIT-model. In het peptide SCIT model hebben we gesialyleerde en niet-gemodificeerde Phl p5a-afgeleide peptiden vergeleken met het gebruik van een GP-extract en met een placebobehandeling bij GP-gesensibiliseerde muizen.

Onze *in vivo* bevindingen geven aan dat het gebruik van een mix van twee peptiden van het belangrijkste allergeen Phl p5a in staat is om de meeste parameters van allergische luchtwegontsteking na GP-provocaties te verminderen, hoewel de onderdrukking van eosinofiele ontsteking niet zo prominent was als bij gebruik van het volledige, ruwe GP-extract. Een directe vergelijking tussen niet-gemodificeerde en gesialyleerde peptiden die voor SCIT werden gebruikt, onthulde een significant verhoogde inductie van FoxP3⁺ Treg-cellen, en een verminderd aantal GATA3⁺ Th2-cellen bij gebruik van gesialyleerde peptiden. Dit effect was geassocieerd met een verhoogde onderdrukking van eosinofilie in zowel BALF als longweefsel door de gesialyleerde peptidemix, vergeleken met het niet-gemodificeerde peptide-SCIT. In hoofdstuk 6 hebben we dus aangetoond dat sialylering van Phl p5a-afgeleide peptiden de werkzaamheid van peptide-SCIT verbetert in een GP-gedreven muismodel van allergisch astma.

SCIT met natuurlijk gezuiverde huisstofmijtallergenen Der p1 en p2 onderdrukken Type 2 immuniteit in een muismodel met allergisch astma

Gelijkaardig met GP-allergische patiënten, omvatten behandelingsopties voor huisstofmijt (HDM)-allergie het zoveel mogelijk vermijden van inhalatie van de allergenen, of het onderdrukken van de symptomen van de allergie. Ruwe extracten, zoals HDM (*Dermatophagoides pteronissinus* (Der p)), bevatten het volledige scala van belangrijke allergenen, wat de kans op therapeutische werkzaamheid bij gebruik van een ruw extract voor HDM-SCIT bij patiënten vergroot. HDM-extracten zijn echter variabel in het gehalte aan allergenen en hebben een zeer beperkte stabiliteit. Bovendien bevatten de ruwe allergeen extracten tal van vervuilingen zoals chitinen, β-glucanen en endotoxinen, die alle het tolerantie-opwekkende vermogen van de DCs kunnen verstoren, terwijl dat juist nodig is voor een succesvolle therapie. Het gebruik van gezuiverde eiwitten maakt behandeling met specifieke allergenen mogelijk zonder de vervuilingen die in de ruwe extracten aanwezig zijn. Meer dan 95% van de HDM-allergische personen zijn gesensibiliseerd voor Der p1 en/of Der p2. Daarom zou het gebruik van gezuiverd Der p1 en Der p2 een aantrekkelijkere therapeutische benadering kunnen zijn, dan het gebruik van ruwe HDM-extracten.

In **hoofdstuk 7** hebben we de hypothese getest dat behandeling met gezuiverd Der p1 en p2 een effectieve behandeling is bij het induceren van een beschermende neutraliserende antilichaamrespons en bij het onderdrukken van allergische ontsteking in een HDM-gedreven muismodel voor allergisch astma. In een directe vergelijking van Der-p1/p2-SCIT met HDM-extracten laten we zien dat het Der-p1/p2-vaccin resulteert in een duidelijke onderdrukking van type-2 cytokines in de longweefsel en BALF, en verhoogde Der p1-splgG-responsen. De concentraties van Der p1-splgG1 na SCIT waren negatief gecorreleerd met pro-inflammatoire cytokines na HDM-provocaties, dat wijst op een beschermende rol voor deze neutraliserende antilichaamrespons in ons muismodel. Hoewel deze immunologische parameters pleiten voor Der-p1/p2-SCIT, zien we geen verschillen met HDM-SCIT in de meer translationele parameters van luchtwegweerstand, oorzwellings testen en eosinofilie, waarbij beide behandelingen een vergelijkbare werkzaamheid hebben bij het onderdrukken van de allergische reacties. Daarom concluderen we dat Der-p1/p2-SCIT minstens even effectief is in het onderdrukken van de door HDM-geïnduceerde adaptieve respons als HDM-extracten.

Daarnaast hebben we de toepassing van Der-p1/p2 gepatenteerd in een Nederlandse Octrooiaanvraag: *“Allergie specifieke immunotherapie-samenstellingen voor gebruik bij de behandeling van huisstofmijtallergie”*. Deze uitvinding heeft betrekking op een samenstelling die gezuiverde natuurlijke Der p1 en p2 allergenen of gezuiverde natuurlijke (*Dermatophagoides farinae*) Der f1 en f2 allergenen omvat voor gebruik bij de behandeling van huisstofmijtallergie bij zoogdieren, zoals mensen. De uitvinding heeft verder betrekking op farmaceutische samenstellingen voor AIT. In het bijzonder beschrijft de uitvinding een verminderde respons op daaropvolgende blootstelling aan huisstofmijtallergeen na behandeling met een farmaceutische samenstelling die gezuiverd natuurlijk Der p1 en p2 omvat, gekenmerkt door onder meer vermindering van Th2-celactiviteit.

Deze gegevens geven voldoende onderbouwing om de veiligheid en werkzaamheid nader te onderzoeken, door het gebruik van deze gezuiverde natuurlijke allergenen in klinische studies te testen als een nieuw vaccin voor door HDM-geïnduceerde allergische aandoeningen, waaronder rhinitis en allergische astma.

Experimentele muismodellen met allergisch astma zijn reproduceerbaar en bruikbaar voor de verbetering van subcutane en sublinguale immunotherapie

Om het gebruik van het diermodel van allergisch astma goed te evalueren, reproduceren en optimaliseren, presenteren we in **hoofdstuk 8** een boekhoofdstuk waarin gedetailleerde methoden staan omschreven om het SCIT en SLIT-muismodel van allergisch astma goed uit te voeren. In dit model worden alle muizen tweemaal intraperitoneaal gesensibiliseerd met aluin-geadsorbeerde allergenen, gevolgd door driemaal SCIT of 40X SLIT-toedieningen met allergeenextracten en als laatste krijgen de muizen drie allergeen (of controle) provocaties. Dit hoofdstuk beschrijft de protocollen en de belangrijkste parameters voor de metingen van invasieve longfunctie, serum immunoglobulinewaarden, isolatie van BALF en cytospin preparaten van objectglasjes. Bovendien beschrijven we in detail hoe de *ex vivo* long cel restimulaties en flow cytometrische metingen worden uitgevoerd ter identificatie van relevante cel-populaties in het immuunsysteem.

Tot slot beschrijven we de uitvoering van allergeen specifieke enzyme-linked immunosorbent essays (ELISAs) en cytokine metingen met behulp van multiplex bepalingen in bronchoalveolaire lavagevloeistof en longweefsel. In de C57Bl/6J muizen worden tevens het gedetailleerde doseer schema, temperatuur controles, en een score voor de ernst van de directe immunologische respons (anafylaxie) uiteengezet. Dit gepubliceerde boekhoofdstuk beschrijft in groot detail het experimenteel muismodel van allergisch astma, waardoor er allergeen-onafhankelijke vergelijking tussen experimenten mogelijk gemaakt wordt en optimalisatie van de formuleringen kan worden getest ter verbetering van de behandelingen.

CONCLUSIE

Klinische experimenten zijn van nature observationeel en de cellulaire en immunologische mechanismen van AIT zijn veelal onderzocht met behulp van experimentele muismodellen van allergische aandoeningen. Diermodellen van allergisch astma moeten zo goed mogelijk aansluiten bij de pathofysiologie van allergische luchtwegaandoeningen in de patiënt, zodat mechanistische inzichten verkregen in de experimentele modellen gemakkelijk kunnen worden vertaald naar de menselijke situatie. Dit proefschrift beschrijft bevindingen gebaseerd op een wetenschappelijk gedetailleerd proefdiermodel met hoge translationele waarde. Niet alleen zijn we in staat om de uitleesparameters van inflammatie, luchtwegweerstand en serologische responsen juist te interpreteren gebruikmakend van ruwe allergeenextracten, maar te induceren in twee muismodellen voor allergisch astma. We kunnen de toedieningsvormen vergelijken, het gebruik van adjuvantia testen, peptide-AIT optimaliseren, en het model volledig allergeen-onafhankelijk inzetten om eveneens gezuiverde allergeenen te testen. Het boekhoofdstuk geeft ook andere onderzoekers de mogelijkheid om dit model in te zetten voor onderzoeksdoeleinden. Ondanks de inzichten die in dit proefschrift beschreven zijn, kunnen er in de wetenschap additionele vraagstellingen worden geformuleerd ter verbetering van de behandelingsefficiëntie van allergeen immunotherapie voor allergische aandoeningen.

