

1.2. FINANZIAMENTO DI UN PROGETTO DI RICERCA SCIENTIFICA SUI DIVERSI ASPETTI DELLA MALATTIA LUPICA dell'importo di 30.000 euro - Ricercatori italiani che non abbiano ancora compiuto 45 anni alla data di scadenza

[BANDO](#) - SCADENZA 23/11/11 - [verbale commissione giudicatrice](#) | [progetto vincitore](#) | [relazione 1° anno](#) | [su ICARO 69](#) | [preprint del lavoro accettato su Clinical Experimental Immunology](#)

PEPTIDI CHE MIMANO L'ANTIGENE CD20: POTENZIALITA' TERAPEUTICHE NEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO

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

Risultati ottenuti al termine del secondo e ultimo anno di lavoro

Background

Il Lupus eritematoso sistemico (LES) è la malattia autoimmune per eccellenza ed è caratterizzata dalla presenza di autoanticorpi potenzialmente diretti contro ogni organo o apparato, sebbene la cute, i reni, le sierose, i vasi ed il sistema nervoso centrale siano i bersagli elettivi di tale autoaggressione. Il decorso della malattia è spesso imprevedibile e sebbene diversi farmaci siano utilizzati per il trattamento, nessuno di essi è in grado di curare il LES. Pertanto, l'identificazione di nuove e più efficaci forme di terapia rappresenta un traguardo di ovvia importanza ed altamente auspicabile.

L'obiettivo del progetto di ricerca è stato quello di sviluppare una strategia di vaccinoterapia in grado di prevenire o almeno ritardare la progressione del LES.

Negli ultimi anni, l'attenzione degli immunologi si è incentrata sull'anticorpo monoclonale chimerico anti-CD20, denominato Rituximab, che ha mostrato interessanti risultati nel trattamento di patologie autoimmuni, tra le quali il LES (1) (2). Tuttavia, da diversi studi è emerso che per garantire una remissione completa di malattia, sono necessarie periodiche infusioni di Rituximab, che espongono il paziente a rischi di reazioni di ipersensibilità e/o anafilassi.

Un approccio alternativo alla immunoterapia passiva con Rituximab è l'immunoterapia attiva, basata sulla stimolazione diretta del sistema immune del paziente inducendolo a sviluppare una risposta anti-CD20. È evidente come un vaccino contenente un peptide che mima l'epitopo del dominio extracellulare del CD20 sia in grado di indurre una risposta attiva con effetti biologici simili a quelli osservati dopo somministrazione passiva di anticorpi anti-CD20 (3).

Robert et al. (4) hanno dimostrato che è possibile contrastare la tolleranza verso il CD20 usando peptidi di 42 aminoacidi (AA), coniugati con keyhole limpet hemocyanin (KLH), corrispondenti al dominio extracellulare di CD20 murino e umano (AA 142-182). Tuttavia, tale strategia è stata limitata dall'abnorme lunghezza del peptide usato, che può verosimilmente assumere una configurazione tridimensionale diversa da quella che assume la proteina nativa, con conseguente mascheramento o esposizione di nuovi epitopi. Tuttavia, i sieri ottenuti da topi immunizzati legavano debolmente il CD20 nativo, nonostante fossero molto reattivi verso il peptide usato per l'immunizzazione. L'eterogeneità della specificità della popolazione anticorpale era anche supportata dalla reattività crociata degli anticorpi anti-CD20 umano con il peptide derivato dal CD20 murino. A simili conclusioni sono giunti Hung (5) e collaboratori con i risultati ottenuti nei topi. Questi autori hanno usato una proteina di fusione contenente tutto il dominio extracellulare del CD20 murino unito al frammento Fc di immunoglobulina (Ig) di specie diversa.

Partendo da queste osservazioni, il nostro gruppo ha caratterizzato 11 peptidi ciclici di 7 AA ciascuno, specifici per Rituximab. Infatti tutti i peptidi esprimono il motif A/SNP Rituximab specifico. Tale motif è

omologo alla porzione 170ANPS173 del dominio extracellulare del CD20 (6). In particolare, Rp15-C (uno degli 11 peptidi) può indurre anticorpi anti-CD20 con specifici effetti citotossici, simili a quelli osservati con Rituximab (6). Tuttavia, anche usando un peptide più piccolo, come in questo caso, si osservava che il titolo di anticorpi anti-peptide era molto più elevato del titolo degli anticorpi anti-CD20, suggerendo che solo una piccola parte di anticorpi anti-peptide reagiva con il CD20. Una successiva caratterizzazione della fine specificità degli anticorpi anti-Rp15-C ha infatti dimostrato che solo una piccola parte di tali anticorpi anti-peptide riconosceva il motif ANPS (CD20), mentre i rimanenti anticorpi erano specifici per gli AA fiancheggianti il motif antigenico (7).

La disponibilità di un pannello di 11 peptidi specifici, dotati di stesse proprietà antigeniche (tutti reattivi verso Rituximab) ma diversi per sequenza amminoacidica che circonda il motif, rappresenta una buona opportunità per studiare i dettagli biologici e molecolari della risposta immune indotta dagli stessi.

Il nostro obiettivo è quindi quello di indurre una risposta immune anti-CD20 in modelli murini di malattia lupica mediante somministrazione di peptidiche esprimono il motif A/SNSS, controparte murina dell'epitopo umano di CD20 riconosciuto da Rituximab.

Per favorire l'attivazione del sistema immune contro il peptide, è necessario utilizzare degli adiuvanti. Tuttavia, vi sono evidenze che gli adiuvanti possano accelerare la malattia lupica. Infatti, Shoenfeld ed Agmond-Levin hanno dimostrato come l'esposizione ad adiuvanti sia causa di iperattività del sistema immune in quattro condizioni morbose quali la siliconosi, la malattia della guerra del Golfo, la sindrome da miofascite macrofagica ed i fenomeni post-vaccinazioni. Da qui la definizione di una nuova entità sindromica a cui è stato attribuito il nome, "ASIA" (autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvant), in quanto provocata dall'esposizione di adiuvanti.

Sulla base di tali osservazioni, prima di iniziare la vaccinoterapia, in una prima fase dello studio si è voluto valutare quale fosse l'adiuvante più appropriato in grado di non influire sul decorso della malattia lupica nei modelli murini utilizzati in questo progetto. Gli adiuvanti da noi utilizzati sono stati i seguenti: adiuvante completo di Freund (CFA), adiuvante incompleto di Freund (IFA), squalene ed idrossido di alluminio.

Dai risultati ottenuti, durante il primo anno di lavoro, è emerso che l'IFA e il CFA accelerano in maniera significativa la malattia lupica nei topi NZBxNZW, determinando un rapido aumento sia del livello di proteinuria che del titolo degli anticorpi anti-DNA, mentre l'idrossido di alluminio, pur non avendo influenza sulla progressione della proteinuria, determinava un consistente calo ponderale che portava gli animali così trattati a morte per cachessia.

Pertanto, dai risultati ottenuti si evince che l'adiuvante più appropriato da utilizzare nelle immunizzazioni con i peptidi è sicuramente lo squalene, in quanto non interferisce in maniera significativa con la progressione della malattia e tanto meno non determina un deperimento generale nell'animale (8).

Partendo da tale osservazione si è deciso di passare alla seconda fase del progetto di ricerca che ha impegnato il secondo anno.

Fasi operative del progetto

Due gruppi di topi NZB/NZW (10 topi per gruppo), sono stati immunizzati rispettivamente con KLH (proteina carriers che rende i peptidi immunogenici) emulsionata con lo squalene (gruppo di controllo) ovvero KLH più una miscela di peptidi emulsionati a squalene. Le immunizzazioni sono state eseguite inizialmente a distanza di una settimana, a partire dalla 12° settimana fino alla 14°, con un ultimo richiamo alla 20° settimana.

Il decorso della malattia è stato seguito mediante l'analisi della proteinuria, del titolo anticorpale anti-DNA e anti-ribonucleoproteine (anti-RNP/Sm) e del peso corporeo, e confrontato con i dati ottenuti dal gruppo di controllo. Per tale motivo sono state raccolte e analizzate settimanalmente le urine e ogni 21 giorni i sieri degli animali immunizzati. Inoltre, anche il peso corporeo è stato monitorato settimanalmente. Solo di alcuni topi sono stati prelevati il rene, la milza ed il polmone per l'eventuale analisi istologica atta a validare l'eventuale effetto protettivo della terapia con peptidi. L'analisi della proteinuria è stata effettuata mediante l'utilizzo di urine strip test; mentre il titolo degli anticorpi anti-DNA e anti-RNP/Sm è stato valutato mediante test ELISA in piastre da microtitolazione sensibilizzate rispettivamente con DNA (ottenuto da calf thymus) e con RNP/Sm.

Risultati

Dai risultati ottenuti è emerso che non vi sono state particolari differenze sia nei livelli di proteinuria che nel titolo degli anticorpi anti-DNA e anti-RNP/Sm tra il gruppo trattato con peptidi ed il gruppo di controllo. Infatti, in entrambi i gruppi si registrava un'iniziale aumento del livello di proteinuria e del titolo

degli anticorpi anti-DNA (sia double che single strand) già a partire dalla 27° settimana. Mentre solo intorno alla 36° settimana si osserva un aumento del titolo degli anticorpi anti-RNP/Sm in entrambi i gruppi.

L'analisi delle variazioni del peso corporeo ha messo invece in evidenza un consistente calo ponderale nei topi appartenenti al gruppo di controllo già a partire dalla 32° settimana rispetto al gruppo di topi trattati con i peptidi, nei quali si è registrato una diminuzione del peso corporeo solo intorno alla 37° settimana.

A fronte di tali risultati, l'analisi della sopravvivenza dimostrava una maggiore mortalità nel gruppo di controllo con una sopravvivenza media di 38 settimane a fronte di 47 settimane di sopravvivenza dei topi trattati ($p < 0.002$; $\chi^2 = 9.333$) nel gruppo trattato. Infine, la risposta immune indotta da tali peptidi induceva effetti biologici simili a quelli ottenuti con la somministrazione passiva di anticorpo anti-CD20, poiché si osservava una marcata deplezione delle cellule CD20+ (numero medio di linfociti CD19+= $2.190 \times 10^3/\mu\text{l}$) nel gruppo di topi trattato alla 29° settimana rispetto allo stesso gruppo alla 47° settimana (numero medio di linfociti CD19+= $0.615 \times 10^3/\mu\text{l}$) ($p < 0.006$).

Conclusione

Benché la mix dei peptidi inoculati nei tempi indicati non sembri interferire con la progressione di malattia in termini di proteinuria, sviluppo di anti-DNA e di anticorpi anti RNP/Sm, tre aspetti positivi sono stati evidenziati: 1) il vaccino non ha mostrato segni di tossicità; 2) è stata osservato un allungamento statisticamente significativo della sopravvivenza nel gruppo di animali trattato rispetto al controllo. 3) il vaccino determina una deplezione di linfociti CD20⁺, inducendo effetti biologici simile a quelli ottenuti con la somministrazione dell'anticorpo monoclonale anti-CD20.

Si prevede in un auspicabile studio futuro di immunizzare gli animali in una fase più precoce della loro vita per valutare e se è possibile controllare efficacemente l'insorgenza di proteiunuria e prolungare più a lungo la sopravvivenza .

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. Huang J, Sheu JJ, Wu SC, Chang TW: Down regulation of B cells by immunization with a fusion protein of a self CD20 peptide and a foreign IgG Fc fragment. *Immunol Lett* 81:49, 2002.
5. Roberts WK, Livingston PO, Agus DB, Pinilla-Ibarz J, Zelenetz A, Scheinberg DA: Vaccination with CD20 peptides induces a biologically active, specific immune response in mice. *Blood* 99:3748, 2002.
6. 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.
7. 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.
8. Favoino E, Favia E.I, Digiglio L, Racanelli V, Shoenfeld Y, Perosa F: Effects of adjuvants for human use in systemic lupus erythematosus (SLE) prone (NZB/NZW) F1 mice, *Clinical Experimental Immunology*, 2013.

Lavori che recano la citazione del grant:

- Favoino E, Favia E.I, Digiglio L, Racanelli V, Shoenfeld Y, Perosa F: Effects of adjuvants for human use in systemic lupus erythematosus (SLE) prone (NZB/NZW) F1 mice, *Clin. Exp. Immunol., Clin Exp Immunol.* 2014 Jan;175(1):32-40. 2014.

- Prete M¹, Fatone MC, Vacca A, Racanelli V, Perosa F.. Severe pulmonary hypertension as the initial manifestation of systemic lupus erythematosus: a case report and review of the literature. *Clin Exp Rheumatol*. 2014 Mar-Apr;32(2):267-274.
- Favoino E, Favia IE, Racanelli V, Perosa F: Vaccination with a CD20 mimotope peptide prolongs survival in NZBxNZW mouse model of human systemic lupus erythematosus. Manuscript in preparation.