

## **PROGETTO DI RICERCA (Coordinatore scientifico: dr.ssa Mariele Gatto)**

### **Probabilità di risposta alla terapia di induzione in pazienti con nefrite lupica in base a un nuovo panel di marcatori dell'immunità innata: studio multicentrico di sintesi e validazione prospettica**

**Background.** Ad oggi, la prognosi della glomerulonefrite lupica (LN) è ancora poco soddisfacente, dal momento che una bassa proporzione di pazienti risponde alla terapia di induzione e meno del 50% mantiene una risposta nel lungo termine (*Doria A, et al. 2006; Dooley M, et al. 2011*). Le terapie attualmente disponibili comprendono immunosoppressori dotati di un'azione ad ampio spettro, mentre le terapie mirate sono ancora limitate dalle lacune nella caratterizzazione precisa dei meccanismi patogenetici della LN.

A questo riguardo, un ruolo emergente viene attribuito all'immunità innata (*Davidson A, 2016*) nei processi che conducono a una LN manifesta. In particolare, i neutrofili sembrano essere coinvolti nella predisposizione di un setting infiammatorio a livello glomerulare e successivamente, di concerto ad altre cellule, nella progressione da una nefrite mesangiale a una nefrite proliferativa, mediante la secrezione di citochine come interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), metalloproteasi e prodotti di degranulazione con funzione citotossica e flogogena. Tra essi, la pentrassina 3 (PTX3) riveste un ruolo proinfiammatorio a livello glomerulare e tubulointerstiziale, dinamicamente controbilanciato da una risposta immune anti-PTX3 recentemente osservata nei pazienti con LES e caratterizzata in vivo (*Bassi N, et al., 2015; Gatto M, et al. 2016; Gatto M, et al. 2019; Gatto M, manuscript in preparation*).

Nonostante le nuove acquisizioni conoscitive, nessun nuovo biomarcatore, tra quelli emergenti, viene oggi diffusamente utilizzato nella pratica clinica dopo opportuna validazione. Inoltre, non è attualmente possibile stratificare con ragionevole sicurezza i pazienti al momento della diagnosi di LN in base alla probabilità di risposta alla terapia di induzione nel breve termine (6-9 mesi), che rappresenta un momento fondamentale per la prognosi, dal momento che una risposta tardiva alla terapia iniziale si

associa a una perdita di funzione d'organo fino all'insufficienza renale terminale nel medio-lungo termine.

**Obiettivi.** L'obiettivo principale del progetto è quindi di mettere a punto un pannello di marcatori clinici, bioumorali e tissutali, facilmente misurabili nella pratica clinica, che consentano di valutare a priori la probabilità di risposta alla terapia di induzione ovvero il rischio di progressione di malattia di pazienti con LN, secondo il principio della stratificazione in base al rischio.

L'obiettivo della risposta alla terapia di induzione (6-9 mesi dall'inizio del trattamento) è basato su dati scientifici attestanti come la risposta precoce (entro l'anno) alla terapia di induzione sia il maggiore predittore di buona prognosi nel lungo termine di pazienti con LN e di preservazione della funzionalità d'organo (*Houssiau F, et al, 2004; Bertsias G, et al. 2012; Moroni G, Gatto M, manuscript in preparation*).

Il pannello di biomarcatori che presentiamo si differenzia da quelli sin qui proposti per il fatto di considerare marcatori precoci di LN che includono i prodotti dei neutrofili, avendo come razionale il riconosciuto valore di queste cellule nella predisposizione a sviluppare LN e i dati di letteratura a supporto di un ruolo dei neutrofili nella LN refrattaria.

L'utilità clinica di un pannello innovativo, e che verrebbe validato su diverse coorti grazie alla natura multicentrica dello studio, è quella di assicurare una caratterizzazione migliore della LN nel singolo paziente con ricadute dal punto di vista prognostico e di implementazione della terapia immunosoppressiva in termini in base a un profilo di rischio personalizzato.

***Obiettivi specifici e definizione dei parametri che compongono il pannello in esame:***

1. Valutazione della correlazione tra rapporto neutrofili/linfociti (NLR) e risposta alla terapia di induzione (a 6-9 mesi) in pazienti con LN all'esordio;
2. Valutazione della correlazione dei livelli sierici di IL-37, con funzione anti-infiammatoria, e risposta alla terapia di induzione (a 6-9 mesi) in pazienti con LN all'esordio;

3. Valutazione della correlazione tra entità dell'infiltrato neutrofilico e dell'espressione di IL-37, IFN- $\gamma$  e PTX3 su biopsia renale (eseguita a fini diagnostici) con la risposta alla terapia di induzione (valutata a 6-9 mesi).

4. Definizione finale del pannello con il massimo valore predittivo per la risposta alla terapia di induzione.

***Il pannello in esame sarà quindi composto dai seguenti parametri:***

Biomorali:

- NLR
- Livelli sierici di IL-37

Istologico:

- Infiltrato neutrofilico e deposizione glomerulare e tubulare di IFN- $\gamma$ , IL-37 e PTX3 (quantificata secondo score semiquantitativi).

**Obiettivi secondari**

- Valutazione dell'espressione di geni dei neutrofili (neutrophil signature) o sotto il controllo dell'interferon di tipo I (interferon signature) su PBMC da sangue periferico e su biopsia renale (eseguita a fini diagnostici), e sua correlazione con la risposta alla terapia di induzione.

***Future directions***

1. Validazione del pannello nel lungo termine (>2 anni) come strumento di monitoraggio clinico per correlazione con eventuali riacutizzazioni di LN ovvero preservazione della funzionalità renale nel lungo periodo;

2. Screening al momento della prima diagnosi di LES e durante il follow-up mediante dosaggio di NLR e livelli di IL-37, allo scopo di verificare il valore predittivo per lo sviluppo di LN in pazienti che esordiscono con manifestazioni extra-renali.

**Metodi.** La valutazione dei parametri del pannello sopra descritti avverrà, previa raccolta di consenso informato da parte dei pazienti, al momento della diagnosi di LN (basale), e a timepoints successivi durante il follow-up, incluse eventuali riacutizzazioni di LN, in modo da valutare la associazione e la presenza di correlazione con l'evoluzione della LN nei mesi successivi alla diagnosi.

Al fine di aumentare la numerosità campionaria e di rendere quindi più generalizzabili i risultati, a questo progetto lavoreranno insieme l'UOC di Reumatologia dell'Università di Padova, dove verranno condotte le analisi su siero e tessuti, l'UOC di Nefrologia dell'Ospedale Maggiore di Milano e la UOC di Nefrologia dell'Ospedale San Gerardo (Monza).

Sarà inoltre possibile valutare retrospettivamente e in forma totalmente anonima per i pazienti, dati prospetticamente raccolti nel passato e disponibili presso gli archivi delle unità partecipanti: sieroteca per la rianalisi dei sieri, sistema informatico per i dati clinici e di laboratorio, campioni bioptici conservati per la rianalisi delle biopsie renali. Questo tipo di analisi, sebbene non assimilata a uno studio prospettico, consentirebbe di poter condurre un'analisi esplorativa su una vasta mole di dati, prima dell'attuazione del protocollo prospettico principale.

La durata globale dello studio potrebbe quindi concettualmente variare con il decorso della fase prospettica, tuttavia è ragionevole quantificare in **n. 2 anni** la durata utile a definire l'impatto del pannello di biomarcatori in esame sull'outcome dei pazienti con LN.

Le metodiche utilizzate per ogni parametro sono di seguito elencate:

- NLR: calcolo automatizzato del rapporto tra la conta dei neutrofili e dei linfociti su sangue periferico;
- Livelli di IL-37: dosaggio di tale citochina su siero mediante tecnica ELISA (Enzyme-linked Immunoassay), avvalendosi del kit commerciale Abcam ab213798;
- Quantificazione dell'infiltrato neutrofilico e della deposizione glomerulare e tubulare di IFN- $\gamma$ , IL-37 e PTX3 mediante immunofluorescenza indiretta condotta su una porzione di tessuto

bioptico renale, già prelevato a fini diagnostici, preparato dopo taglio al criostato mediante passaggi successivi di fissazione in paraformaldeide 2%, permeabilizzazione e staining (colorazione). Lo staining avverrà in due step successivi con aggiunta dapprima di anticorpi primari (anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL37, anti-PTX3 e marker di superficie per neutrofili) e successivamente degli anticorpi secondari necessari per l'ottenimento del segnale luminoso, acquisito poi mediante microscopia a immersione (microscopio Leica DMI6000CS fluorescence (Leica Microsystems). L'intensità del segnale luminoso proveniente dal tessuto renale verrà quindi tradotta in uno score semiquantitativo per successive analisi statistiche.

Il monitoraggio successivo dei pazienti (2 anni per la durata del progetto e prosecuzione secondo buona pratica clinica nei centri coinvolti) consentirà inoltre di valutare l'efficienza del pannello bioumorale (NLR e IL-37) anche nel follow-up della LN. Per quanto riguarda i marker tissutali, essi verranno confrontati con i reperti istologici normalmente considerati rilevanti nella progressione di malattia renale (lesioni acute proliferative e lesioni croniche).

**Statistica.** I dati ottenuti da queste misurazioni verranno testati in termini di sensibilità, specificità, valore predittivo positivo (VPP) e negativo (VPN) per risposta (e non risposta) alla terapia di induzione entro 6-9 mesi tramite creazione di curva ROC (valutando l'area sotto la curva [AUC] come indicatore di accuratezza diagnostica). Essi verranno inoltre confrontati con i dati di sensibilità, specificità, VPP e VPN dei parametri tradizionali utilizzati nel monitoraggio dei pazienti con LN, ossia anticorpi anti-DNA, C3, C4, proteinuria e livelli sierici di creatinina, tramite confronto tra le curve ROC. Infine, verrà testato un modello finale includente i marcatori nuovi da noi proposti e i marcatori tradizionali succitati, al fine di ottenere l'indice per valutare il miglioramento della predittività.

Le analisi statistiche verranno condotte con SPSS software (version 25.0, Chicago, IL).

**Risultati attesi:** ci attendiamo che a questo studio possano partecipare globalmente circa 200 pazienti con LN seguiti presso le nostre unità operative, dei quali una parte (stimabile intorno a 30 pazienti) sarà

rappresentata da pazienti neodiagnosticati e seguiti prospetticamente nel corso dei due anni di svolgimento del progetto, mentre per gli altri si procederà all'analisi retrospettiva di dati prospettici.

Confidiamo di poter caratterizzare e validare un pannello di marcatori bioumorali e tissutali basati su nuovi meccanismi patogenetici di LN, che consenta di stabilire ragionevolmente, al momento della diagnosi, quanto elevata è la probabilità di risposta alla terapia di induzione e, corrispondentemente, quanto elevato è invece il rischio di riacutizzazione. Le ricadute cliniche sarebbero quindi importanti in termini di strettezza del follow-up e di intensificazione della terapia in base alla stratificazione iniziale del rischio, quando la funzionalità d'organo è ancora intatta.

Successivamente, in base alla attendibilità del pannello, lo stesso potrà essere utilizzato come strumento di screening al momento della diagnosi di LES, per stimare il rischio di sviluppare (e quanto precocemente) l'impegno renale nel corso della malattia.

Va inoltre sottolineato che le metodiche proposte sono di semplice reperibilità e utilizzo presso laboratori anche non altamente specializzati, offrendo quindi la possibilità di un utilizzo su larga scala.

Il risultato che maggiormente auspichiamo è quello di anticipare gli sviluppi della malattia secondo un modello verosimile che conduca a una terapia più mirata e potenziata laddove realmente necessario per conferire un beneficio incrementale in termini di preservazione di funzionalità renale, prognosi e qualità di vita del singolo paziente.

**Conflitto di interessi:** Tutti i partecipanti allo studio dichiarano di **non** avere conflitti di interessi o legami di parentela con membri del Consiglio direttivo del Gruppo LES Italiano.

## **Bibliografia**

Bassi N, Del Prete D, Ghirardello A, Gatto M, Ceol M, Zen M, Bettio S, Mantovani A, Iaccarino L, Punzi L, Doria A. PTX3, Anti-PTX3, and Anti-C1q Autoantibodies in Lupus Glomerulonephritis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2015 Oct;49(2):217-26.

Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis.* 2012;71(11):1771–1782.

Davidson A. What is damaging the kidney in lupus nephritis?. *Nat Rev Rheumatol.* 2016;12(3):143–153.

Doria A, Iaccarino L, Ghirardello A, et al. Long-term prognosis and causes of death in systemic lupus erythematosus. *Am J Med.* 2006;119(8):700–706.

Dooley MA, Jayne D, Ginzler EM, et al. Mycophenolate versus azathioprine as maintenance therapy for lupus nephritis. *N Engl J Med.* 2011;365(20):1886–1895.

Gatto M, Ghirardello A, Luisetto R, Bassi N, Fedrigo M, Valente M, Valentino S, Del Prete D, Punzi L, Doria A. Immunization with pentraxin 3 (PTX3) leads to anti-PTX3 antibody production and delayed lupus-like nephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Autoimmun.* 2016 Nov;74:208-216

Gatto M, Wiedemann A, Nomovi N, Reiter K, Schrezenmeier E, Rose T, Szelinski F, Lino AC, Valentino S, Ghirardello A, Dörner T, Doria A. Circulating Pentraxin3-Specific B Cells Are Decreased in Lupus Nephritis. *Front Immunol.* 2019 Jan 25;10:29.

Houssiau FA, Vasconcelos C, D'Cruz D, et al. Early response to immunosuppressive therapy predicts good renal outcome in lupus nephritis: lessons from long-term followup of patients in the Euro-Lupus Nephritis Trial. *Arthritis Rheum.* 2004;50(12):3934–3940.

## Stima del Budget

Materiali di consumo (IVA non inclusa)	Costo unitario (euro)	Unità richieste	Costo complessivo (euro)
<b>Kit antiIL37 ABCAM ab213798-1x96test</b>	539 (96 test)	4	2156
<b>Neutrophil antibody panel Abcam ab254016</b>	539	4	2156
Anticorpo primario anti PTX3 (Genetex GTX45054)	590	3	1770
<b>Anticorpi primari anti- IFN-γ</b>	In base a tipo e ditta	In base alla quantità contenuta in un package	Costo mediano ca. 1600 euro
<b>Anticorpi secondari (varie ditte)</b>	In base al tipo e ditta (circa 200 euro stimato sul costo mediano degli anticorpi secondari utilizzati da questo gruppo per esperimenti precedenti (es. ab72465-100ug)	Da definire	Calcolato sul costo mediano degli anticorpi secondari utilizzati da questo gruppo per esperimenti precedenti (es. ab72465-100ug): tra 500 e 1500 euro per tipo per congrue quantità
<b>Altri costi</b>			
Spese di spedizione materiali+IVA 22%		Ca. 1600 euro	
Spedizione centralizzata di materiale biologico/biopsie renali		Ca. 500 euro	
Test di laboratorio per settaggio protocollo (consumo preliminare di materiale che va poi riacquistato)		Ca. 1000 euro	
Acquisto piastre ELISA		Ca. 400 euro	
<i>Primer e reagenti per polymerase chain reaction (obiettivi secondari espressione gene signature)</i>		Ca. 3000	

**costo totale stimato: euro 14.500-15.000**

### Timetable di svolgimento del progetto

	Mesi																	
	0-2 (Diagnosi LN)				6			9			12				18			24
Follow-up dei pazienti																		
Prelievi ematici serati e preparazione dei sieri																		
Dosaggio di IL-37 e IFN gamma																		
Calcolo NLR																		
Analisi IF delle biopsie renali*																		
Elaborazione dati e analisi statistica																		
Elaborazione del report finale																		
Presentazione dei risultati																		

\*Le analisi verranno ripetute in caso di rebiopsia (riacutizzazione)