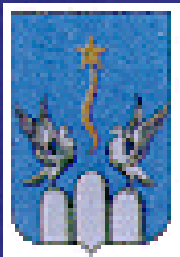


# La Malattia di Crohn è una malattia autoinfiammatoria ?

**Angelo Zelante**

Unità Operativa Complessa di Gastroenterologia  
ed Endoscopia Digestiva  
Azienda Ospedaliero-Universitaria  
di Ferrara



# Aspetti gastroenterologici delle principali malattie autoinfiammatorie

## Manifestazioni sistemiche:

- Nausea- vomito
- Dolore addominale lieve-moderato
- Addome acuto (sierositi → peritonite asettica)
- Amiloidosi AA (8-10%)
  - Insufficienza epatica da deposito di amiloide

# Aspetti gastroenterologici delle principali malattie autoinfiammatorie

- Febbre mediterranea familiare
- TRAPS
  - 95% dolore addominale
  - Dolore lieve- addome acuto
    - Localizzato – diffuso
  - Amiloidosi (insufficienza d'organo)

# Aspetti gastroenterologici delle principali malattie autoinfiammatorie

- **Sindrome da iper-immunoglobuline D (HIDS)/Cryopiryrinopatie**
  - Dolore addominale
  - Dolore lieve- addome acuto
  - Splenomegalia
  - Vomito/diarrea

# Clinical Classification of Selected Autoinflammatory Diseases

- Hereditary Recurrent Fevers
- Idiopathic Febrile Syndromes
- Pyogenic Disorders
- **Granulomatous Diseases**
- Autoinflammatory Disorders of Skin and Bone
- Metabolic Disorders
- Complement Disorders
- Vasculitis
- Storage Diseases
- Fibrosing Diseases

Aksentijevich, and Goldbach-Mansky  
Autoinflammatory Disease Reloaded: A Clinical  
Perspective  
*Cell 2010*

# Clinical Classification of Selected Autoinflammatory Diseases

## *Granulomatous Diseases*

- ***Blau syndrome: Chronic granulomatous synovitis with uveitis and cranial neuropathy***
  - *NOD2/CARD15*
  - *NF- $\kappa$ B activation disorder*
- ***Crohn's disease***
  - *Complex (NOD2, ATG16L1, IRGM)*
  - *NF- $\kappa$ B activation disorder*

# Blau Syndrome

- ▶ Granulomatosi familiare sistemica giovanile
- ▶ Autosomica dominante
- ▶ Gene responsabile: NOD2/CARD15
- ▶ La mutazione del dominio LRR dello stesso gene è associata alla Malattia di **Crohn**

*J Clin Immunol 2008*

## Mutazioni dell'inflammasoma associate con le malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD)

- NOD2 e NLRP3 appartengono alla stessa famiglia dei NLR
- NOD2 e NLRP3 sono piattaforme molecolari del **sistema immune innato** e funzionano come difesa da attacchi microbici e patogeni
- In entrambi i sistemi l'inadeguata risposta agli stimoli microbici è associata all'infiammazione intestinale cronica

## Mutazioni dell'inflammasoma associate con le malattie infiammatorie croniche intestinali

- ▶ Studi genome-wide
- ▶ SNPs in NLRP3 → esistono link con lo sviluppo della malattia di Crohn
- ▶ Conferma con polimorfismi di NLRP3 e CARD8 ad alto rischio di sviluppare il Crohn
- ▶ Studi sulle mutazioni di IL-18 e IL-18R

## **Mutazioni dell'inflammasoma associate con le malattie infiammatorie croniche intestinali**

Maggiore probabilità di sviluppare la  
Malattia di Crohn

- Ipofunzionalità dell'inflammasoma
- Mutazione NOD2/CARD15 con perdita di funzione

Inflammasomes in inflammatory bowel diseases  
The Scientific World Journal 2011



# IBD e inflammasoma

- ▶ Inadeguata risposta immune contro il microbiota commensale del lume intestinale
- ▶ Infiammazione intestinale con coinvolgimento del sistema immune innato e del sistema immune adattativo

# IBD e inflammasoma

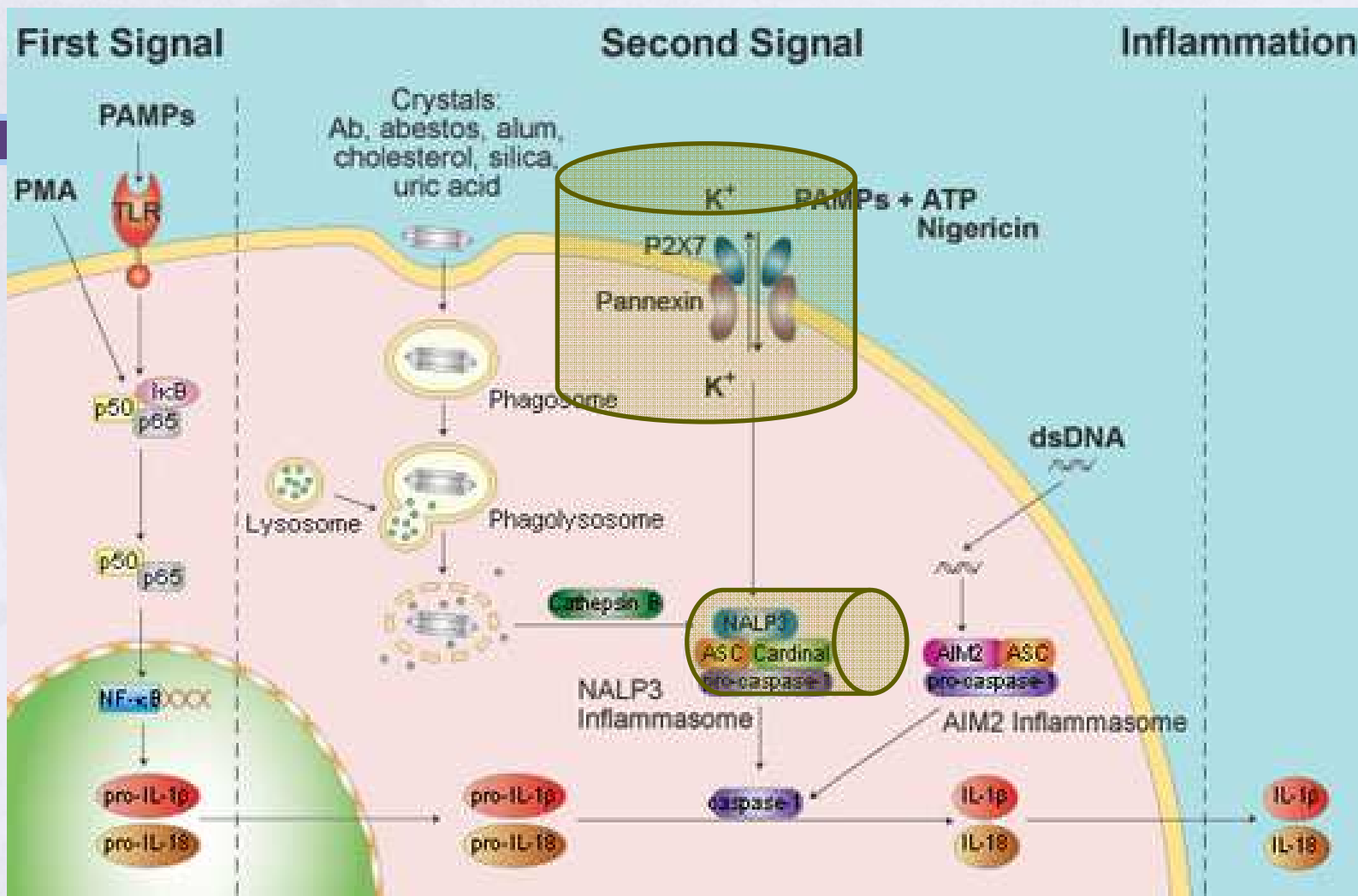
## IL-1 $\beta$ e IL-18

- ▶ IL-1 $\beta$  e IL-18 sono aumentate nella mucosa intestinale con IBD
- ▶ Aumentano nei macrofagi, nelle cellule dendritiche ma anche nelle cellule epiteliali intestinali
- ▶ IL-1 $\beta$  e IL-18 causano alterazioni nella permeabilità (alterando le tight-junction) e permettono il passaggio di materiale batterico

# Autoinfiammazione-Autoimmunità

- ▶ Il Crohn è un malattia poligenica con una componente autoinfiammatoria definita geneticamente
- ▶ La mutazione associata alla malattia avviene in una proteina del sistema immune innato (NOD2)
- ▶ NOD2 è espresso sui monociti ma anche sulle cellule epiteliali dell'intestino
- ▶ La doppia mutazione di NOD2 è associata con la malattia ileale stenosante

**Attivazione  
dell'inflammasoma  
P2X<sub>7</sub> mediata  
nella malattia di Crohn**



# Obiettivi dello studio

- ▶ Analisi dell'espressione e della funzione di NALP3-inflammasoma nella Malattia di Crohn e individuazione di eventuali anomalie funzionali del *pathway* di secrezione di IL-1 $\beta$ , valutate mediante stimolazione *in vitro* di PBMCs
- ▶ Definizione delle diverse espressioni delle proteine dell'inflammasoma in rapporto alle caratteristiche della malattia e dei pazienti
- ▶ Conferma del coinvolgimento di P2X<sub>7</sub> come recettore principale per la stimolazione dell'inflammasoma
- ▶ Caratterizzazione del ruolo di IL-1 $\beta$  nel meccanismo patogenetico della Malattia di Crohn

# Selezione pazienti

- ▶ 62 pazienti con Malattia di Crohn
- ▶ età media 53.7 ( $\pm 12.5$  anni)
- ▶ Criteri diagnostici ECCO 2010  
(European Crohn's and Colitis Organization)
- ▶ 58 soggetti sani  
(donatori di emocomponenti)

# Attivazione Inflammasoma

	(Mediana) <b>CROHN</b>	(Mediana ) CONTROLLI	p-value (IC 95%)
IL-1 $\beta$ BASALE	14.6	10.0	0.1752
IL-1 $\beta$ LPS	129	135	0.8111
<b>IL-1<math>\beta</math> LPS<sub>30</sub></b>	<b>802.1</b>	<b>456.8</b>	<b>0.0012</b>
IL-1 $\beta$ LPS <sub>100</sub>	1170.0	1287.0	0.3432
<b>ASC</b>	<b>1.10</b>	<b>1.00</b>	<b>0.0166</b>
<b>P2X<sub>7</sub></b>	<b>8.55</b>	<b>4.76</b>	<b>0.00006</b>
<b>NALP3</b>	<b>3.20</b>	<b>1.72</b>	<b>0.0082</b>

Test di Kolmogorov-Smirnov  
Test di Wilcoxon-Mann-Whitney

# Caratteristiche del Crohn che influenzano l'inflammasoma

## Confronto all'interno della coorte di pazienti con Crohn

Variabile	Parametro	p-value
		IC 95%
IL-1 $\beta$ basale	Localizzazione ileale	0.02795
ASC	Fumo	0.0386
P2X <sub>7</sub>	Proteina C reattiva	0.0231

Multivariata	ANOVA	p-value
	Parametri significativi	IC 95%
IL-1 $\beta$ (LPS <sub>30</sub> )	Localizzazione ileale	0.03127 *
IL-1 $\beta$ (LPS <sub>30</sub> )	Terapia non immunosoppressiva	0.00351 **
ASC	Fumo	0.0297 *
P2X <sub>7</sub>	PCR	0.0225 *

Test di Wilcoxon-Man-Witney  
 Test di Kruskal-Wallis  
 Test F (ANOVA)

# Terapie nel Crohn vs gruppo di controllo

Crohn in terapia non immunosoppressiva -- soggetti sani

	CROHN (Mediane)	CONTROLLI (Mediane)	p-value IC 95%
IL-1 $\beta$ BASALE	20,9	10,0	0.00986
ASC	1,1	1,0	0.04344
P <sub>2</sub> X <sub>7</sub>	10,3	4,8	0.00005
NALP <sub>3</sub>	4,0	1,7	0.06156

Crohn in terapia immunosoppressiva soggetti sani

	CROHN (Mediane)	CONTROLLI (Mediane)	p-value IC 95%
IL-1 $\beta$ (LPS <sub>30</sub> )	973,9	456,8	0.0002
ASC	1,1	1,0	0.0537
P <sub>2</sub> X <sub>7</sub>	7,6	4,8	0.0020
NALP <sub>3</sub>	3,0	1,7	0.0544

Test Wilcoxon-  
Mann-Whitney

# Conclusioni (1)

- ▶ Nella Malattia di Crohn vi è una maggiore attivazione dei componenti dell'inflammasoma
- ▶ IL-1 $\beta$  è significativamente aumentata nel Crohn non in modo costitutivo ma soltanto dopo stimolo infiammatorio
- ▶ La localizzazione ileale presenta aumento dei valori di IL-1 $\beta$  e di ASC , ovvero pattern citochinico ed infiammatorio differente rispetto alle altre presentazioni fenotipiche (dati analoghi per NOD2)

# Conclusioni (2)

- ▶ L'attività di malattia (HBI) non modifica l'attivazione dell'inflammasoma
- ▶ La terapia immunosoppressiva sembra ridurre l'espressione delle proteine dell'inflammasoma
- ▶ P2X<sub>7</sub> potrebbe ricoprire un ruolo cruciale anche per la Malattia di Crohn
- ▶ Sono in corso trial clinici con farmaci antagonisti recettoriali

# Obiettivi futuri

- ▶ Confermare i dati con numerosità più elevate
- ▶ Ricercare su biopsie ed estrazione di RNA la presenza di maggiore attivazione dell'asse P2X<sub>7</sub>-mediato dell'inflammasoma
- ▶ Trials terapeutici con inibitori di IL-1 $\beta$

# Ringraziamenti

*Prof. F. Di Virgilio*

*Dott.ssa S. Falzoni*

DIPARTIMENTO DI MEDICINA  
SPERIMENTALE E DIAGNOSTICA  
SEZIONE DI PATOLOGIA GENERALE

Università di Ferrara

# TERAPIA DELLA MALATTIA DI CROHN

---

# Drug therapy for Crohn's disease

## First line therapy

5-ASA

balsalazide

budesonide

antibiotics

(metronidazole,

Cipro, rifaximin,

amoxicillin,

minocycline,

tetracycline)

## Nutritional therapy

elemental diet

TPN

## Immunomodulators/ Second line therapy

corticosteroids

budesonide

azathioprine/6-MP

methotrexate

## Investigational

### Immunomodulators

mycophenolate mofetil

leflunamide

FK 506

thioguanine

stem cell transplant

## Biologic Therapy

infliximab

adalimumab

certolizumab pegol

natalizumab

## Biologics - in development

mesenchymal stem cells

abatacept

thalidomide

anti IL-12 (ABT-874)

*Trichuris suis*

probiotic therapy

visilizumab (anti-CD3)

Adacolumn (leukocytapheresis)

golimumab

fontalizumab

# Clinical Evidence of Increased TNF Expression in Crohn's Disease

Clinical Evidence	Location/Cell Type	Correlation
↑ TNF- $\alpha$ levels <sup>1,2</sup>	Stool (children)	Disease activity
↑ TNF- $\alpha$ secretion <sup>1</sup>	Lamina propria mononuclear cells	Mucosal involvement
↑ Density / frequency of TNF- $\alpha$ -positive cells <sup>3</sup>	Lamina propria cells	—
↑ TNF- $\alpha$ mRNA expression <sup>4</sup>	Colonoscopic biopsies	—

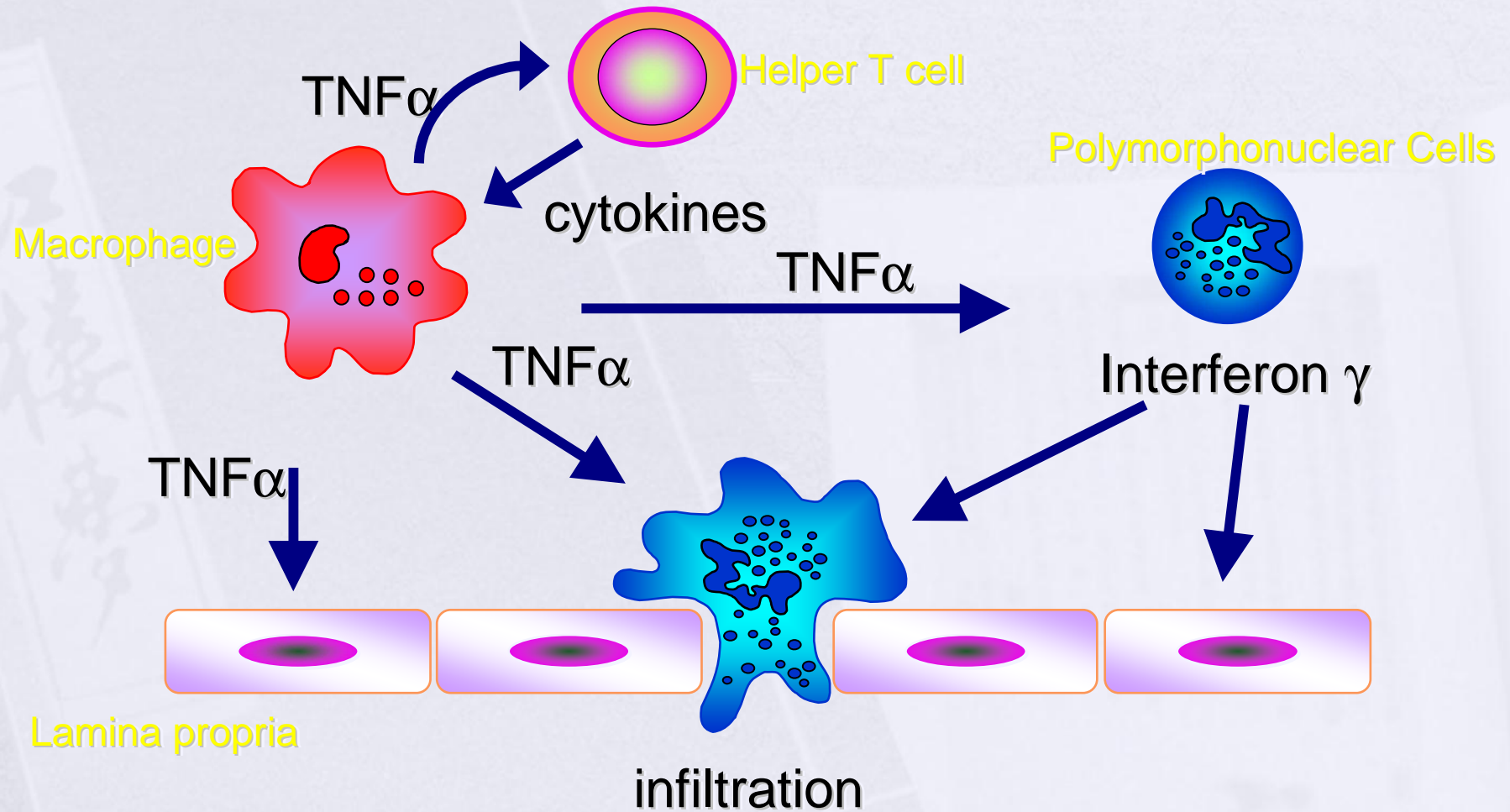
Braegger CP, et al. *Lancet*. 1992;339:89-91.

Murch SH, et al. *Gut*. 1993;34:1705-1709.

MacDonald TT, et al. *Clin Exp Immunol*. 1990;81: 301-305.

Cappello M, et al. *Gut*. 1992;33:1214-1219.

# Role of TNF in Crohn's Inflammation



Podolsky DK. *N Eng J Med.* 2002;347(6):417-429

Nedim M, et al. *Surg Clin N Am.* 2007;87:681-696

# TNF $\alpha$

- TNF is a naturally occurring cytokine that is involved in normal inflammatory and immune responses
- TNF plays an important role in pathologic inflammation and joint destruction
  - Elevated levels of TNF- $\alpha$  are found in synovial fluid of RA, PsA, AS, and JIA patients
  - Increased levels of TNF- $\alpha$  are also found in psoriasis plaques and lamina propria cells in Crohn's disease

# Terapia Biologica anti-TNF nella malattia di Crohn

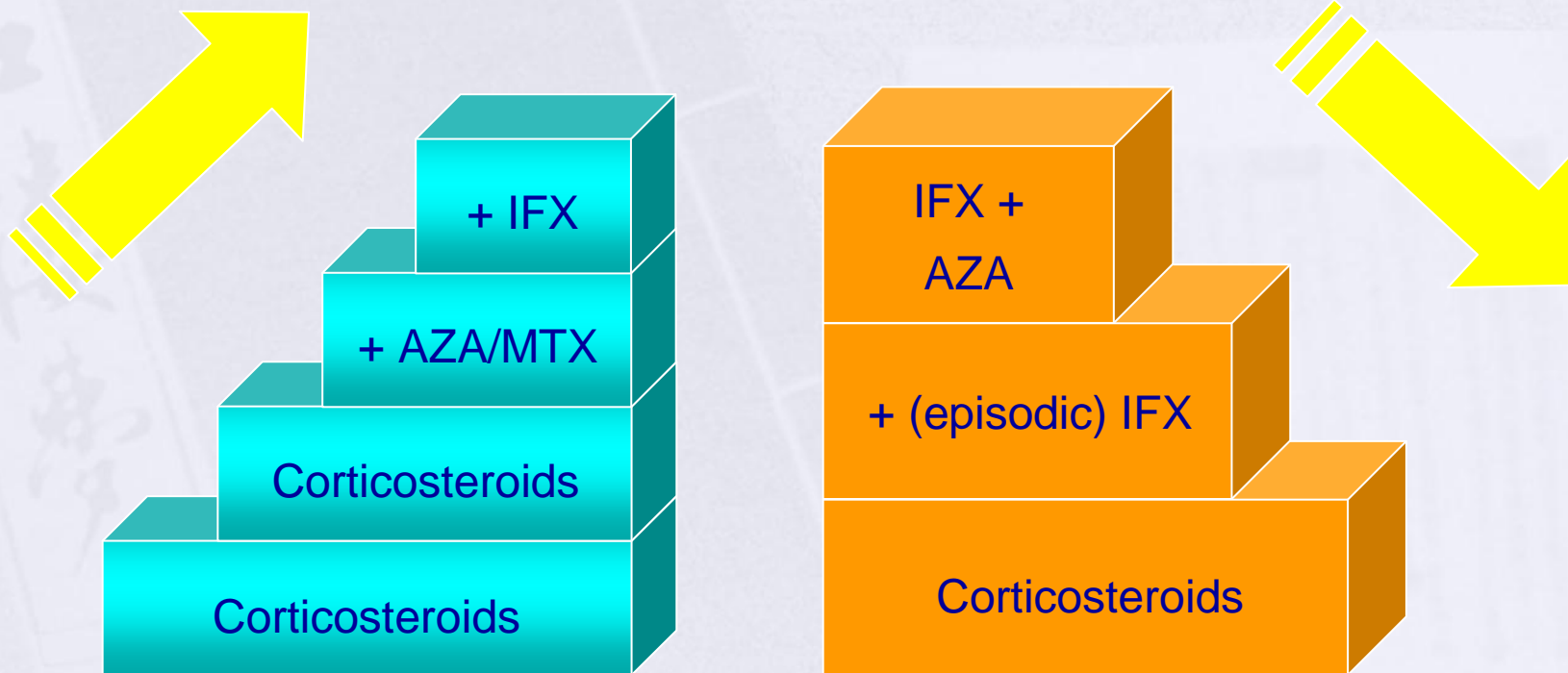
Adalimumab  
Infliximab  
Certolizumab

# Indicazioni alla terapia biologica

- ▶ Steroido-dipendenza/resistenza
- ▶ Fallimento/intolleranza terapia con immunosoppressori
- ▶ Malattia di Crohn fistolizzante
- ▶ Complicanze extraintestinali

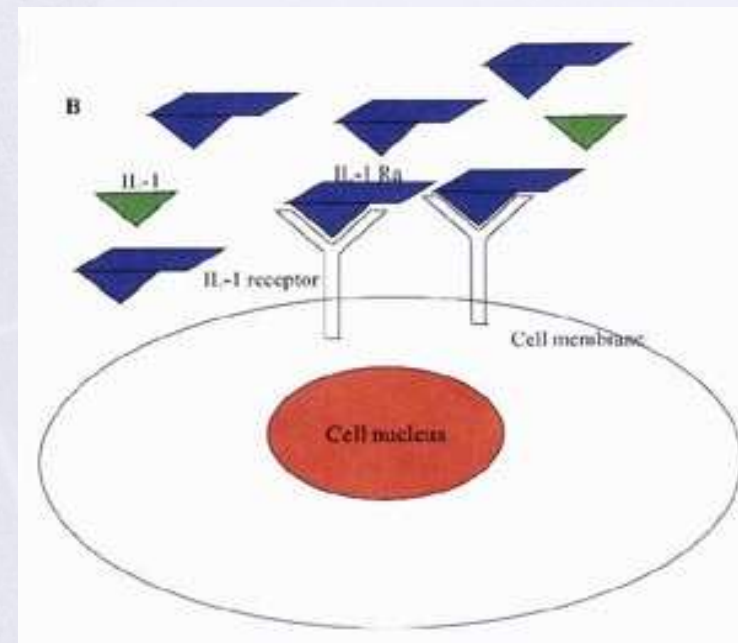
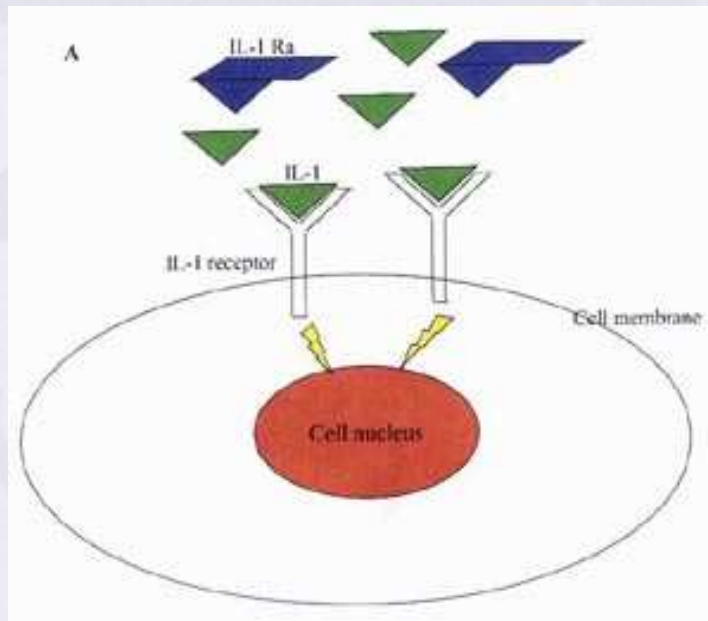
Criteri diagnostici ECCO 2010  
(European Crohn's and Colitis Organization)

## New Approaches to Therapeutic Intervention in Crohn's Disease? The "Step-up" vs "Top-down" Trial



AZA, azathioprine; IFX, infliximab; MTX, methotrexate.

# ANTI-IL1ra - ANAKINRA



# Kineret (anakinra)

- ▶ Recombinant human IL-1 receptor antagonist
- ▶ Expressed in *E. coli*
- ▶ Amino acid sequence is identical to native human IL-1ra except for the addition of an N-terminal methionine residue
- ▶ Molecular weight = 17.3 kDa

# Kineret (anakinra)

- ▶ Inhibits the action of IL-1 by competitively blocking the binding of IL-1 to IL-1 receptors on IL-1 responsive target cells
- ▶ PK studies showed that the terminal half-life of anakinra following SC administration ranges from 3 to 6 hours
- ▶ No evidence of drug accumulation in RA patients after daily dosing for up to 24 weeks

# Trial con Anakinra

- ▶ **A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial with the interleukin-1 receptor antagonist anakinra in patients with systemic-onset juvenile idiopathic arthritis (ANAJIS trial) *Ann Rheum Dis* 2011;**70**:747-754 doi:10.1136/ard.2010.13425**

Grazie per l'attenzione



红楼