

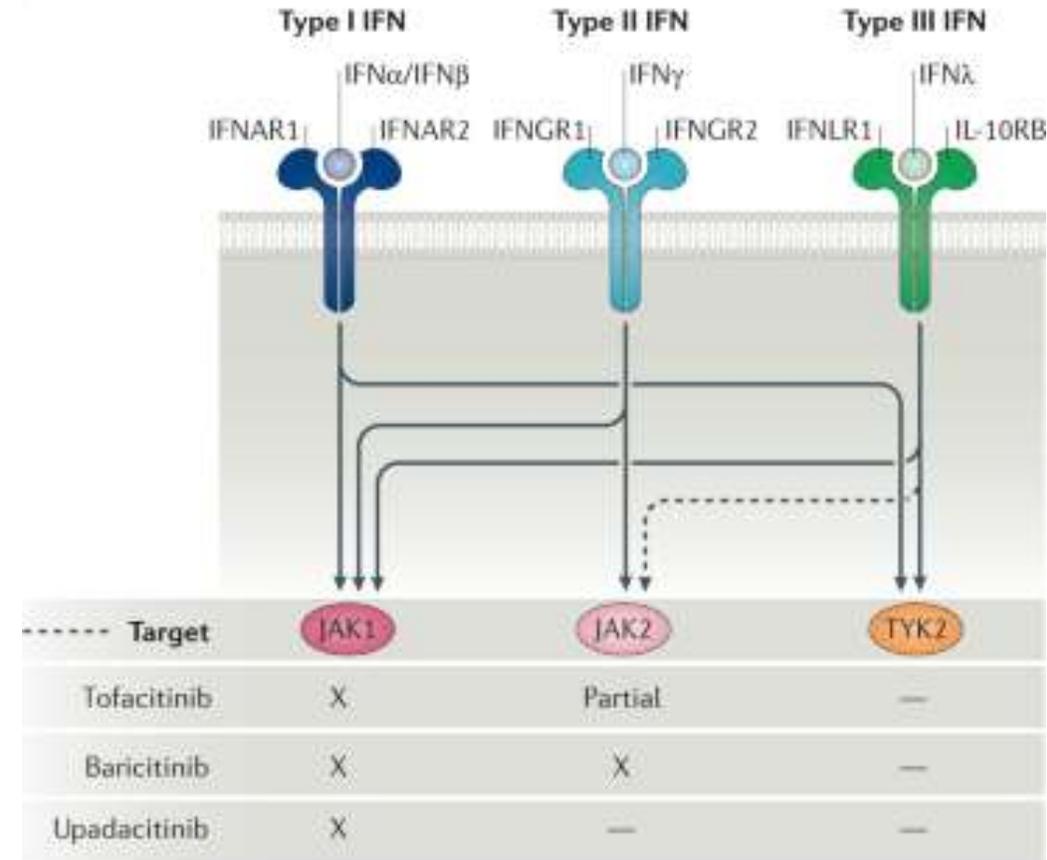
Type I interferon blockade with anifrolumab in patients with systemic lupus erythematosus modulates key immunopathological pathways in a gene expression and proteomic analysis of two phase 3 trials

Tina Baker,¹ Hoda Sharifian,² Paul J Newcombe,¹ Patrick G Gavin,³ Mark N Lazarus,¹ Madhu Ramaswamy,³ Wendy I White,⁴ Nicola Ferrari,¹ Daniel Muthas,² Raj Tummala,⁵ Eric F Morand ,⁶ Richard A Furie,⁷ Edward M Vital ,⁸ Chris Chamberlain,¹ Adam Platt,¹ Hussein Al-Mossawi,⁵ Philip Z Brohawn,³ Eszter Csomor¹

[Baker T, et al. Ann Rheum Dis. 2024 May 18:ard-2023-225445. Online ahead of print.]

Introduction

- SLEでは, type I IFNが活性化している.
- Anifrolumab (ANI: IFNAR1 blocking抗体) は IFNAR1に結合し, IFN gene signature (IFNGS)発現を強く抑制する.
- ANIがtype I IFN pathway下流に与える影響は不明だった.
- 今回, TULIP-1, 2試験のTranscriptome解析とProteomics解析を縦断的に行い, ANIの免疫調節メカニズムを調査した.



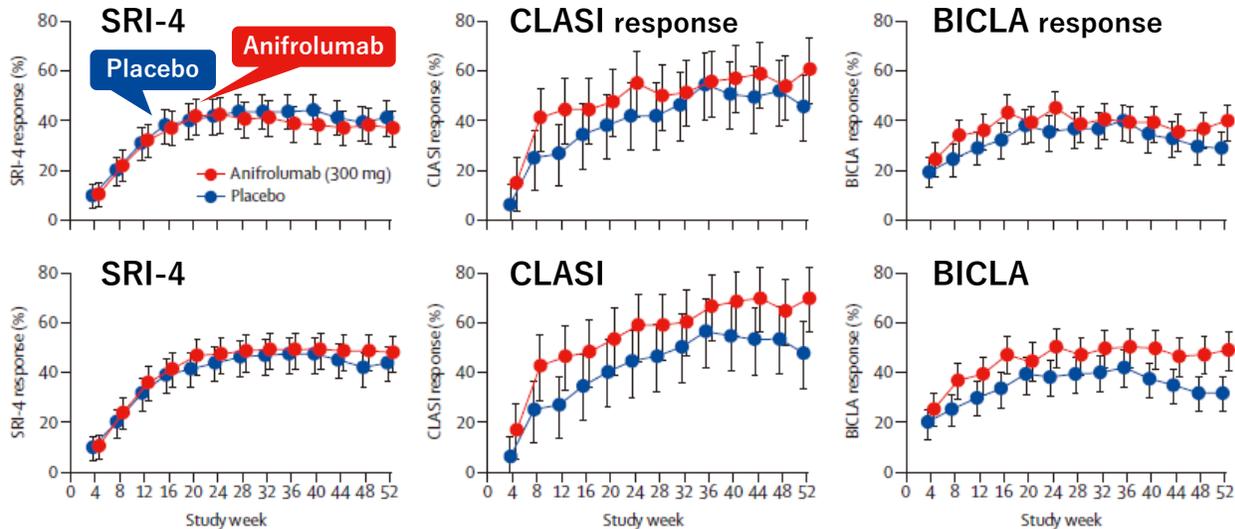
[Nat Rev Rheumatol. 2021;17(6):349-362.]

Type I interferon inhibitor anifrolumab in active systemic lupus erythematosus (TULIP-1): a randomised, controlled, phase 3 trial

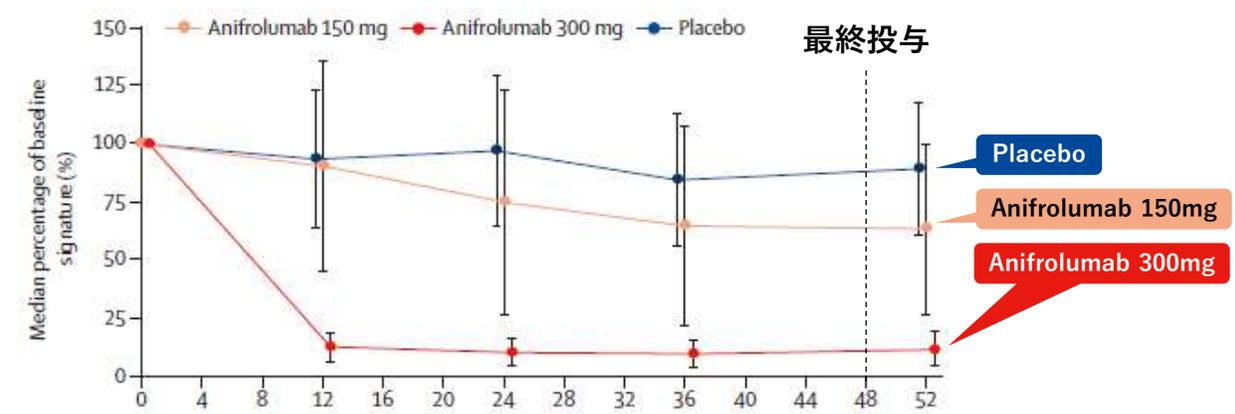
Richard A Furie, Eric F Morand, Ian N Bruce, Susan Manzi, Kenneth C Kalunian, Edward M Vital, Theresa Lawrence Ford, Ramesh Gupta, Falk Hiepe, Mittermayer Santiago, Philip Z Brohawn, Anna Berglund, Raj Tummala, on behalf of the TULIP-1 study investigators*

TULIP-1 (2019)

[Lancet Rheumatol. 2019; 1(4): e208-e219.]



Primary outcome (SRI-4)とsecondary outcome. 下段は投薬で調整後.



IFNGS (21 gene) 高い患者 (HCのFold change>2) のbaselineからの変化. Anifrolumab 300mg投与12wで12.6%まで低下し, 52wでも抑制持続する.

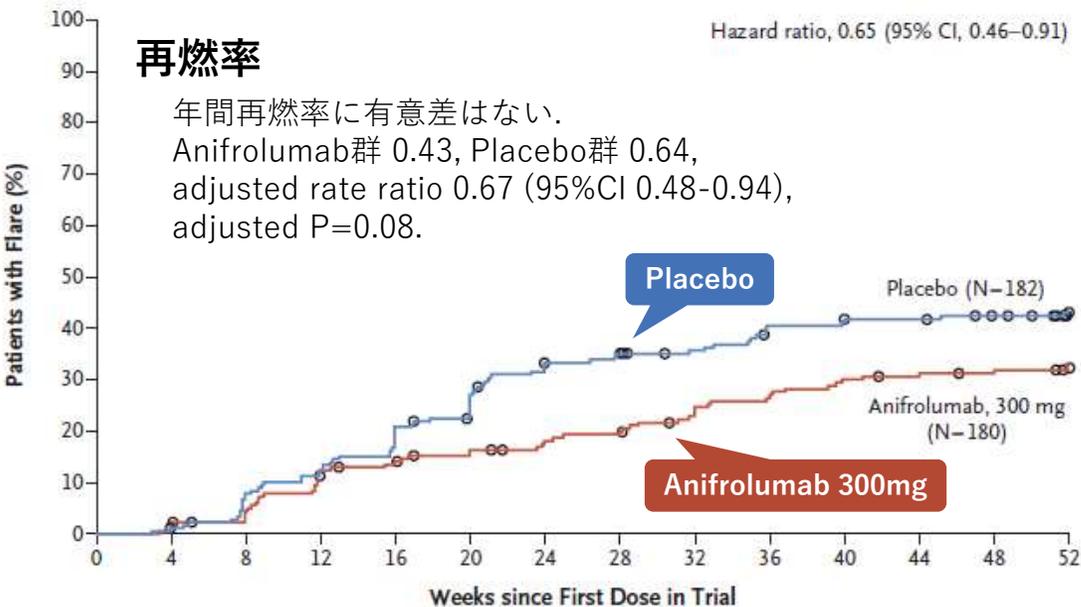
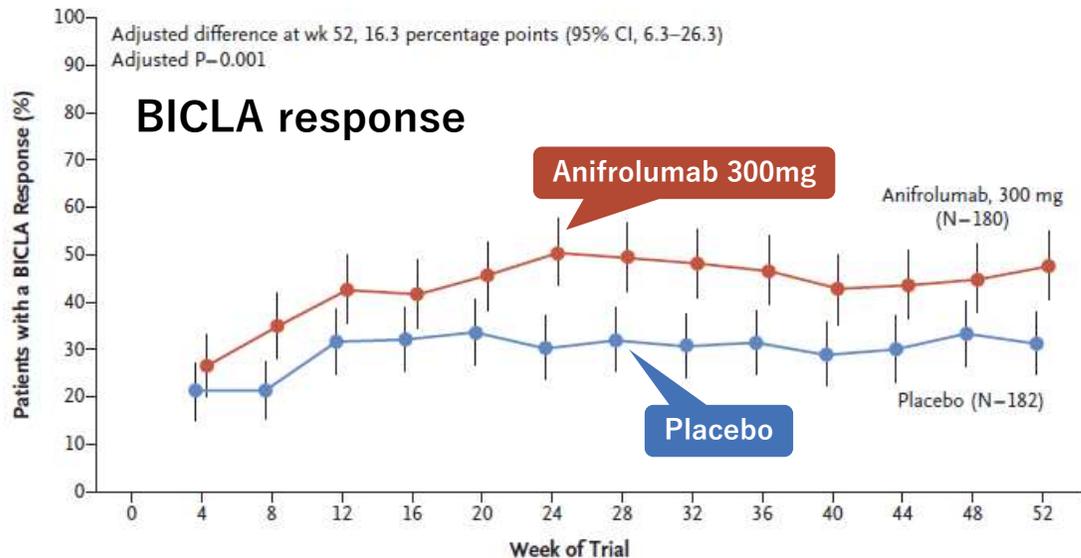
- Double-blind, multicenter, 52w phase3 RCT
- 中等度～重症成人SLE 457人 (SLEDAI-2K ≥ 6) を2:1:2
 - PC (n180), ANI 150mg/4w (n93), ANI 300mg/4w (n180)
 - 48w投与. SOCは継続 (poGCは強制的に減量).
- 1次outcome: 52週のSRI-4 [anifrolumab 300mg vs PB]
- 2次outcome: IFNGS-high内のSRI4, GC<7.5mg率, CLASI<50%率, 24wのSRI4, 再燃率, BICLA
- 結果: 1次outcome (52wのSRI4) 達成せず [ANI 300mg 36%, PC 40% (p=0.41)]
- 2次: 24wのSRI4, 52wのIFNGS^{high}のSRI4 有意差なし.
- 有意差あり
 - GC<7.5mg率 [ANI 300mg 41%, PC 32%]
 - CLASI<50% [ANI 300mg 42%, PC 25%]
 - BICLA response [ANI 300mg 37%, PC 27%]
- 結論: 1次outcome達成せず. 2次数項目は有意差あり (GC減量, CLASI反応, BICLA反応). 潜在的な有用性は示唆される (1年以上のphase3 追加情報が必要).

Trial of Anifrolumab in Active Systemic Lupus Erythematosus

E.F. Morand, R. Furie, Y. Tanaka, I.N. Bruce, A.D. Askanase, C. Richez, S.-C. Bae, P.Z. Brohawn, L. Pineda, A. Berglind, and R. Tummala, for the TULIP-2 Trial Investigators*

TULIP-2 (2020)

[N Engl J Med. 2020; 382(3): 211-221.]



- Double-blind, multicenter, 52w phase3 RCT
- 中等度～重症のSLE 362人(日本人43人)を1:1. 背景は標準治療(SOC)
 - ANI群 (n=180): Anifrolumab 300mg/4w* 12回+ SOC.
 - Placebo群 (n=182): PC+ SOC.
- 1次end point: 52週のBICLA response (BILAG index悪化なし, SLEDAI悪化なし, 医師PGA悪化<0.3)
- 2次end point: IFNGS-high内のBICLA response, GC減量率, CLASI<50%, 関節所見, 年間再燃率
- 結果: 1次 end point達成 [ANI 47.8%, PC 31.5% (p=0.001)]
- IFNGS^{high} 群 BICLA [ANI 48.0%, PC 30.7% (p=0.002)]
- IFNGS^{low} 群 BICLA [ANI 46.7%, PC 35.5%]
- GC減量, CLASIに有効, 関節所見と再燃率は差なし
- CLASI達成 12週で49%と早めに効く (MUSE試験も)
- 帯状疱疹多い [ANI 7.2%, PC 1.1%]. ANI肺炎1名死亡
- 結論: TULIP-1とprimary end pointを離れた本試験で, SLEに対する有効性が示された.

方法：全血RNA-seq

- ANI 300mg 244人, Placebo 258人より3回 (BL, 24週, 52週)
- 全血サンプルをPAXgene tubeに採取し-80°C保存
- Illumina TruSeq Stranded Total RNAでサンプル調整
- Paired-end sequencing (100 bp reads), 40M reads/sample
- 外れ値サンプル (n=13) 除去：ClossDiscovery (R package)
- Volcano plot：EnhancedVolcano (R package)
- GSEA：clusterProfiler (R package)
- In silico deconvolution：SVR (granulator:R)で13細胞量を推測

方法：Plasma Proteomics

- ANI 300mg 124人, Placebo 132人より3回 (BL, 12週, 52週)
- EDTA tubeに採取し血漿 (plasma) を-80°C保存
- Olink panelで蛋白定量
- Simoa panelで低濃度蛋白5つ (IFN- λ 1, IL-1 β , IFN- α , IL-17A, IL-21)を定量
- QCを通過した蛋白169個を評価

患者情報

Table 1 Demographics and baseline characteristics of patients with moderate to severe SLE who participated in the TULIP-1 or TULIP-2 trials and had available transcriptomics or proteomics data

		Transcriptomic dataset		Proteomic dataset*	
		Anifrolumab 300 mg	Placebo	Anifrolumab 300 mg	Placebo
Patients	n	244	258	124	132
Age, years	Median (range)	44.0 (18–69)	42.5 (18–68)	40.0 (18–68)	42.0 (18–68)
Sex, n (%)	Female	224 (91.8)	239 (92.6)	113 (91.1)	124 (93.9)
	Male	20 (8.2)	19 (7.4)	11 (8.9)	8 (6.1)
Race, n (%)†	American Indian/Alaska Native	4 (1.7)	1 (0.4)	0	0
	Asian	12 (5.0)	16 (6.3)	8 (6.5)	4 (3.0)
	Black/African American	29 (12.0)	35 (13.8)	16 (12.9)	17 (12.9)
	Other	20 (8.3)	22 (8.7)	1 (0.8)	2 (1.5)
	White	176 (73.0)	179 (70.8)	99 (79.8)	109 (82.6)
GCs dosage, n (%)‡§	<10 mg/day	119 (48.8)	132 (51.2)	54 (44.3)	58 (43.9)
	≥10 mg/day	125 (51.2)	126 (48.8)	68 (55.7)	74 (56.1)
SLEDAI-2K score, categorical, n (%)‡	0–10	119 (48.8)	132 (51.2)	36 (29.0)	38 (28.8)
	≥10	125 (51.2)	126 (48.8)	88 (71.0)	94 (71.2)
IFN 4-gene test status¶ , n (%)	High	199 (81.6)	211 (81.8)	95 (77.9)	103 (78.0)
	Low	45 (18.4)	47 (18.2)	27 (22.1)	29 (22.0)

*The proteomics dataset comprised patients from TULIP-1 only.

†Race group was reported by the patients.

‡The baseline characteristics presented here were stratification factors used for randomisation of patients at the start of the TULIP-1 and TULIP-2 trials.

§Oral prednisone or equivalent.

¶||IFNGS test status at screening.

GCs, glucocorticoids; IFN, interferon; n, number of patients; SLE, systemic lupus erythematosus; SLEDAI-2K, SLE Disease Activity Index 2000.

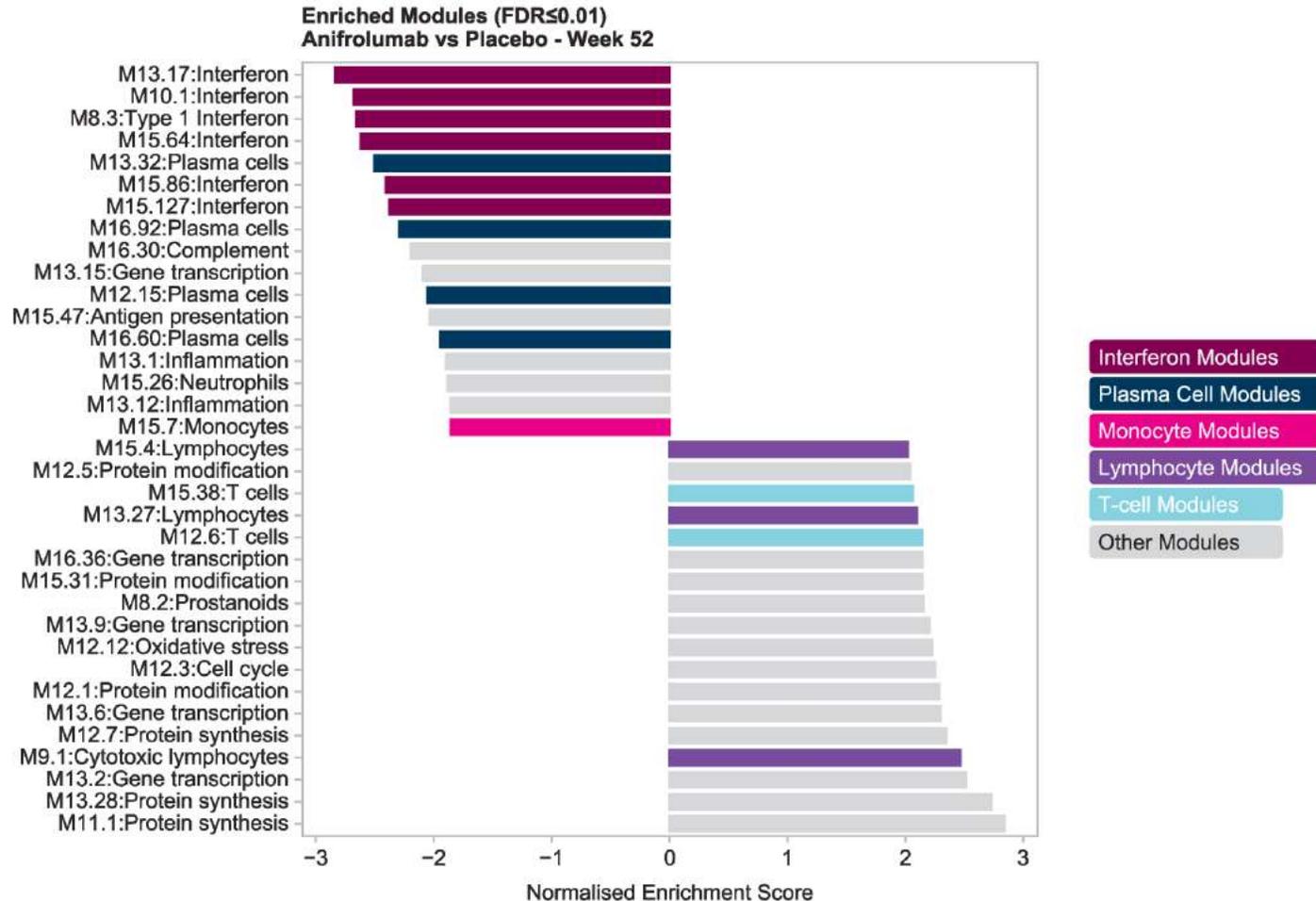
- Transcriptome 502人
(ANI 300mg 244人, PC 258人)
- Proteomics 256人
(ANI 300mg 124人, PC 132人)
[TULIP-1のみ]
- 各群はTULIP全体と一致。
- 90%以上が女性, 患者の大部分は白人。
- SLEDAI-2K ≥ 10 (Baseline):
Transcriptome 50%
Proteomics 71%
- IFNGS高値 (Screening) :
Transcriptome 82%
Proteomics 78%
- GC ≥ 10 mg/日 (Baseline) :
Transcriptome 50%
Proteomics 56%

Pathway解析 (GSEA)



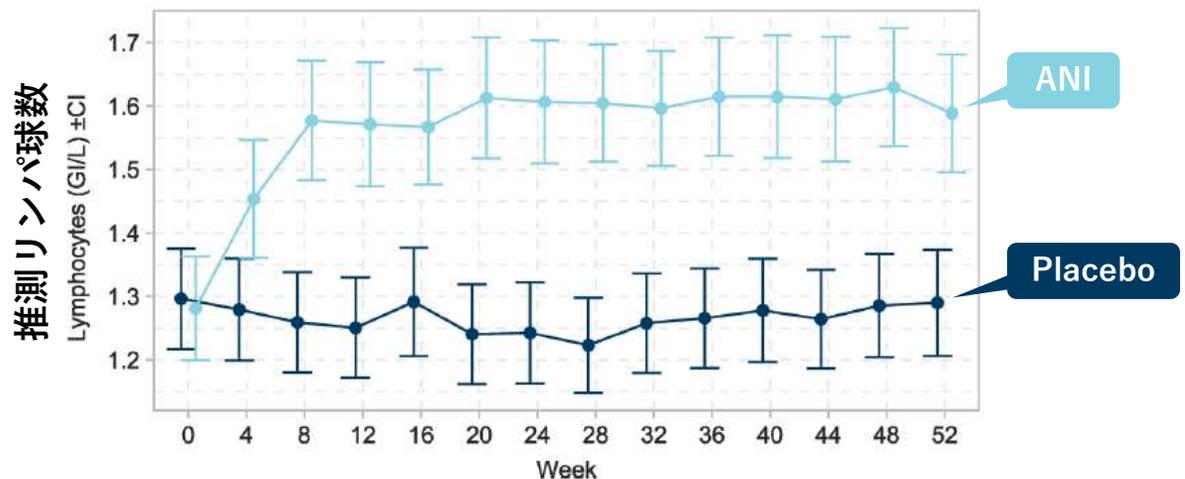
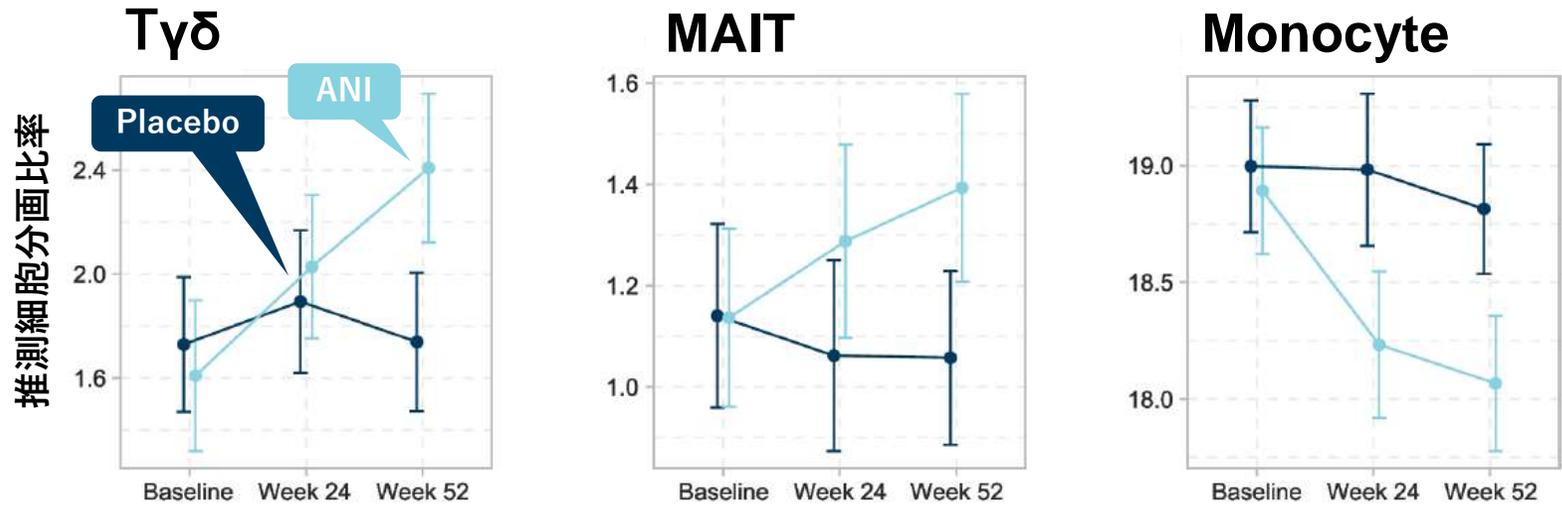
- ANI(52w)をPlaceboと比較
- 上位25経路 ($P_{FDR} \leq 0.001$)
- IFN- α /- β 下流pathway 抑制 (JAK/STAT, NF- κ B, MAPK)
- IFN- γ 関連 apoptosis/増殖 pathway も抑制
- NETosis pathway も抑制

Module解析 (GSEA)



- ANI (52w)をPlaceboと比較
Module enrichment解析
- 有意に変動するmoduleを
免疫経路によって分類し、
NESに従い整列 ($P_{FDR} \leq 0.01$)
- ANIが抑制：**IFN, Plasma cell, Monocyte module.**
- ANIが亢進：**Lymphocyte, T-cell module.**

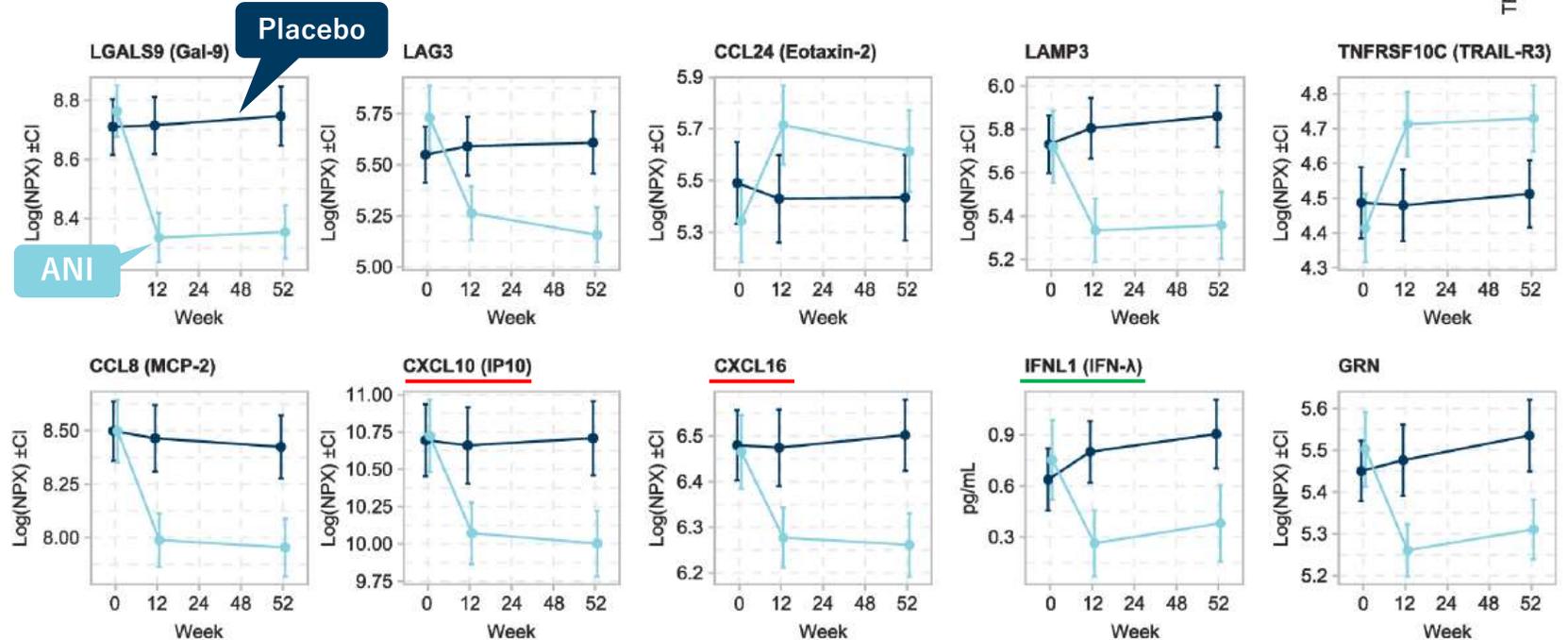
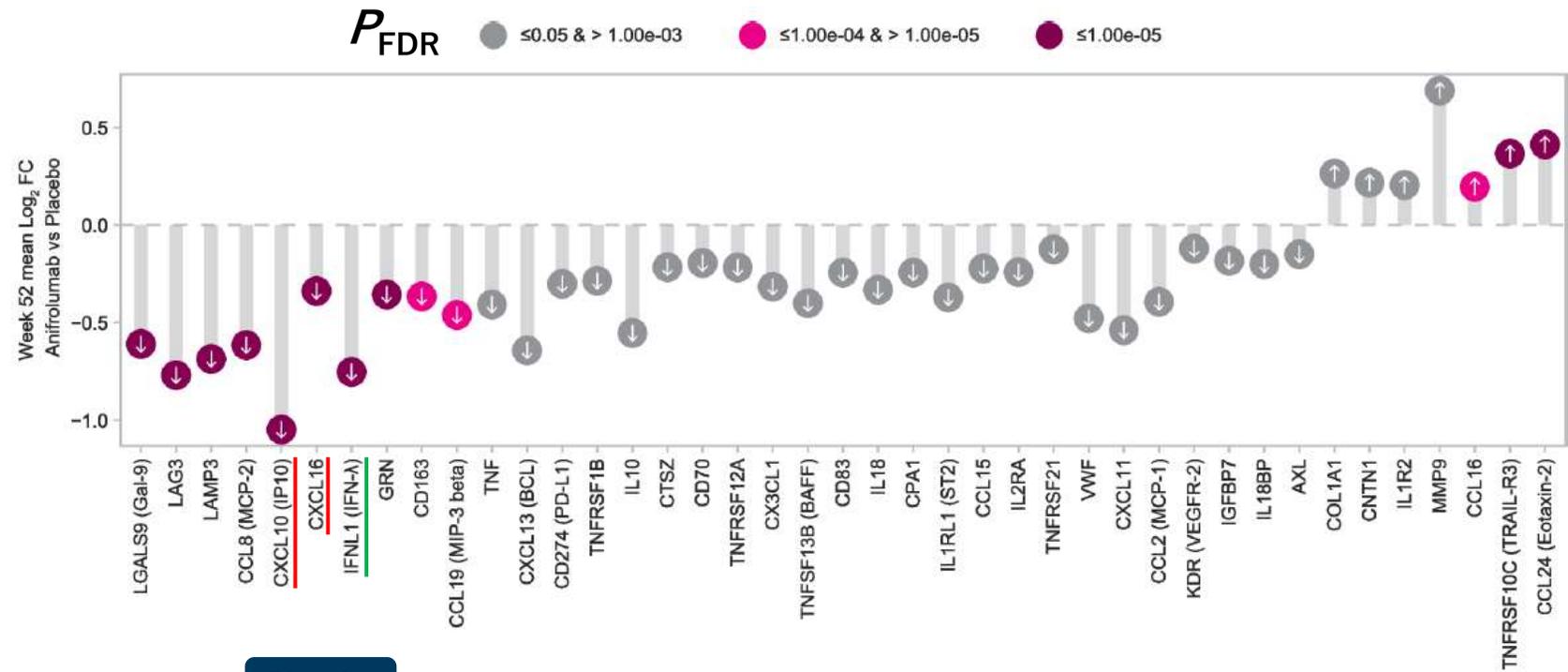
In silico deconvolutionによる細胞比率の推移



- 健常人の13免疫細胞 signature matrixより予測した細胞数比率推移
- **T $\gamma\delta$, MAIT** (mucosal-associated invariant T)はANIによって増加する.
- **Monocyte**はANIによって低下する.
- 全血球数から推測した**リンパ球数**は, ANIによって増加した.
 - Moduleの結果と一致
 - B, pDC, Neu等は有意差なし

Proteomics

- ANI (52w)とPC比較, 閾値を超えた169蛋白
- Y軸: Log_2FC , 色: P_{FDR}
- ANIで低下: 34蛋白
 - IFN- λ
 - IFN- γ 誘導因子 (**CXCL10, CXCL16**)
 - Monocyte制御/遊走 (**MCP-2, MCP-1, CCL2**)
 - BAFF, TNF
 - Galectin-9, LAG3
 - IFN- α (IFNA1/IFNA3)はANI投与に影響されない

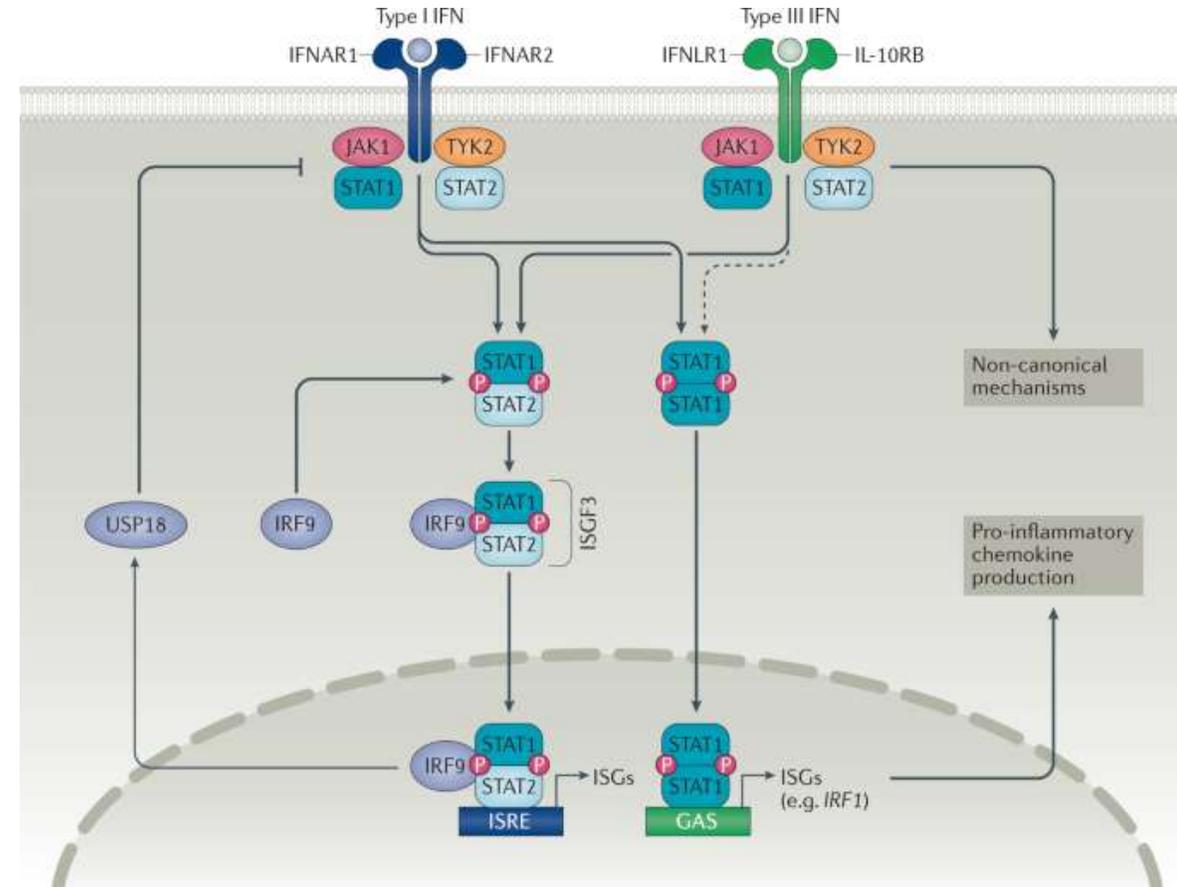


まとめ

- ANIによるIFNAR1阻害は, IGS以外に下記をdownregulateする：
 - Type II IFN (IFN- γ) 誘導遺伝子, pathway, module
 - Type III IFN (IFN- λ) 関連pathway, IFN- λ 蛋白
 - アポトーシス関連pathway・NETosis関連pathway
 - Monocyte 活性化ケモカイン/受容体
 - 炎症誘発性サイトカイン
 - B細胞活性化サイトカイン
- In silico deconvolutionにより, ANI治療後のMAIT, T γ δ 細胞の増加と単球の減少が示された.

Discussion

- ANIは、Type II, Type III IFNのtargetにも抑制的に影響する(STATを含む多くの要素が重複する).
- Type II IFNは発症や再燃と, Type III IFNは組織炎症と関連するとされ, ANIの効果の一部を説明しうる.
- ANIはNETosis とIFN- γ -induced apoptosis経路を抑制し, SLEでの dysregulated cell deathを改善させる可能性が示唆された.
- MAIT cell/ $\gamma\delta$ TはIFN- α で活性化され, active SLEの血中で減少する. ANIは, これらを正常に戻す可能性が示された.



[Nat Rev Rheumatol. 2021;17(6):349-362.]

Discussion

- ANIは, B細胞, T細胞に関わる分子も抑制する.
 - BAFF : B細胞活性化因子で, SLEで発現が亢進している.
 - CXCL13 : B cell chemoattractantで, LNで腎へのB細胞浸潤を促進する.
 - LAG3 : 活性化CD4⁺ T細胞の抑制性分子で, TとpDCの相互作用を活性化する.
- 本論文のLimitation
 - Deconvolutionで無視した細胞がある, 統計的評価ができていない.
 - RNA-seqとProteomicsの結果の生物学的validationは取れていない.
 - GC内服が遺伝子発現に影響を与えた可能性がある.