

Efficacia e utilità del monitoraggio terapeutico di autoanticorpi e farmaci inibitori del Tumor Necrosis Factor alpha in pazienti in trattamento per patologie autoimmuni

Valentina Pecoraro¹, Tommaso Trenti¹, Chiara Bonaguri², Alessandra Melegari¹, Elena De Santis¹, Bruna Lo Sasso³, Umberto Basile⁴ per il Gruppo di Studio SIBioC Autoimmunità e Immunologia Clinica

¹Medicina di Laboratorio - Dipartimento Interaziendale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica", Ospedale Civile S. Agostino Estense, Modena

²Laboratorio di Chimica Clinica e Ematologia, Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma, Parma

³Biochimica Clinica, Dipartimento di Biopatologia e Biotecnologie Mediche, Università di Palermo, Palermo

⁴Dipartimento di Medicina di Laboratorio Università Cattolica del Sacro Cuore Roma

ABSTRACT

Therapeutic monitoring of autoantibodies Tumor Necrosis Factor α inhibitor drugs: efficacy and benefit for patients with autoimmune diseases. Tumor necrosis factor alpha (TNF α) is a proinflammatory cytokine involved in the pathogenesis of chronic inflammatory disease, such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, ankylosing spondylitis, Chron's disease and ulcerative colitis. TNF α inhibitors (anti-TNF α) are monoclonal antibodies drugs directed against TNF α (i.e. adalimumab, infliximab, etanercept, golimumab and certolizumab). Their effect consists in reducing the inflammatory response of autoimmune diseases. Several randomized controlled trials and observational studies evaluated the therapeutic efficacy of these drugs and reported a clear benefit for patients affected by chronic inflammatory disease treated with anti-TNF α , but also a high risk of reactions and infections in the injection site. These drugs are immunogenic, and consequent anti-drug antibodies (ADA) formation may decrease the functional drug concentration resulting in a loss of response. Therefore, we evaluated the impact of ADA on therapeutic response through meta-analyses, showing that detectable ADA significantly reduced TNF α inhibitors response. ADA could interfere with drugs and compromise their effects, so the determination of serum ADA levels could improve the patient's management. Even if the decrease of therapeutic response, due to ADA production, is well documented, the clinical benefit of serum ADA determination remains unclear. At the moment, there are many indications about the use of immunogenicity test to guide the therapy, but more information should be acquired before implementing this test in clinical practice.

INTRODUZIONE

Il fattore di necrosi tumorale alfa ("Tumour necrosis factor alpha", TNF α) è membro di una famiglia di citochine coinvolte in una serie di meccanismi regolatori, come l'infiammazione, la citotossicità e l'adesione cellulare (1). In alte concentrazioni, il TNF α è coinvolto nella patogenesi di alcune patologie infiammatorie croniche, quali l'artrite reumatoide (RA), la colite ulcerosa (UC), la malattia di Crohn (CD), l'artrite psoriasica (PsA) e la spondilite anchilosante (AS). Gli inibitori del TNF α sono anticorpi

monoclonali (mAbs) che legano il TNF α neutralizzando i suoi effetti pro-infiammatori (2). I farmaci inibitori del TNF α sono infliximab (IFX), adalimumab (ADL), golimumab (GOL), etanercept (ETA), e certolizumab (CTZ). Una delle caratteristiche di questi anticorpi monoclonali è l'immunogenicità, ovvero la capacità di generare anticorpi anti-farmaco (anti-drug antibodies, ADA) in grado di neutralizzare le attività pro-infiammatorie e immunoattivanti del TNF α con conseguente perdita di risposta clinica (3, 4). Data la riduzione della risposta terapeutica dovuta alla produzione di ADA, il monitoraggio

Corrispondenza a: Tommaso Trenti, Laboratorio di Tossicologia, Dipartimento Internazionale ad Attività Integrata "Medicina di Laboratorio e Anatomia Patologica", Ospedale Civile S. Agostino Estense, Via Giardini 1355, 41126 Modena. Tel. 0593961467; Fax 0593961249; E-mail t.trenti@ausl.mo.it

Ricevuto: 18.04.2018

Accettato: 03.05.2018

Pubblicato on-line: 18.07.2018

DOI: 10.19186/BC_2018.043

delle concentrazioni sieriche di ADA e di farmaco può essere utile sia nella scelta di un'appropriate strategia terapeutica, soprattutto per i pazienti che non rispondono al trattamento, sia nell'identificazione dei pazienti che potrebbero trarre vantaggio dalla modifica della terapia in atto.

IL FATTORE DI NECROSI TUMORALE

Il $TNF\alpha$ è una citochina pleiotropica che fa parte di una superfamiglia di proteine, la superfamiglia TNF, che comprende molecole implicate nella regolazione delle reazioni infiammatorie e immunitarie, proliferazione cellulare, apoptosi (linfotossine, "first apoptosis signal" - Fas, il fattore regolatore dei linfociti B, CD40, "nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells" - NFkB) e modulano la biosintesi e il rilascio di vari fattori molecolari e mediatori cellulari (1, 5). Il $TNF\alpha$ è una citochina pro-infiammatoria, regola effetti patogenici diretti e induce la produzione di altri mediatori di infiammazione e distruzione tissutale. Dato il suo ruolo nella difesa dell'ospite contro alcune infezioni batteriche, è denominata anche citochina sentinella (5, 6). È secreta principalmente dai macrofagi, ma anche dai linfociti T, mastociti, granulociti, cellule "natural killer", fibroblasti, neuroni, cheratinociti e cellule muscolari lisce in seguito a vari stimoli provenienti da batteri, virus, complessi immunitari, citochine, fattori del complemento, cellule tumorali, radiazioni ed anche in condizioni di ischemia, ipossia o traumi (5, 6).

La molecola del $TNF\alpha$ è costituita da tre subunità polipettidiche identiche (omotrimerico), è espressa sulla superficie della membrana cellulare (TNF transmembrana, tmTNF, 26kDa), oppure è presente negli spazi transmembrana e nel circolo ematico in forma solubile (sTNF, 17 kDa) in seguito a clivaggio del suo precursore tmTNF ad opera dell'enzima "TNF α converting enzyme" (TACE). Entrambe le forme, quella solubile e quella transmembrana, sono biologicamente attive. $TNF\alpha$ può essere presente anche in forma monomerica solubile, biologicamente non attiva, la quale può assemblarsi con altri monomeri e formare molecole trimeriche biologicamente attive (7, 8). Il $TNF\alpha$ svolge i suoi effetti legandosi a due tipologie di recettori, il tipo 1 (TNFR1 o p55) e il tipo 2 (TNFR2 o p75), espressi sulla superficie delle cellule immunitarie, infiammatorie ed endoteliali. Entrambi i recettori sono glicoproteine di membrana che legano in maniera specifica sia il $TNF\alpha$, sia le linfotossine, ma differiscono per struttura cellulare, affinità per i ligandi e meccanismi di trasduzione del segnale (2, 7, 8). Il TNFR1 lega preferenzialmente il sTNF ed è espresso sulla superficie di tutti i tipi cellulari, tranne gli eritrociti. Il TNFR2, invece, lega preferenzialmente il tmTNF ed è espresso soprattutto sulle cellule endoteliali ed emopoietiche. Inoltre, entrambi i recettori possono essere clivati dalla membrana plasmatica e rilasciati in circolo sotto forma di recettori solubili, in grado di legare $TNF\alpha$. In questo modo agiscono come antagonisti, bloccando gli

effetti mediati dal $TNF\alpha$. L'attivazione dei recettori espressi sulla membrana plasmatica delle cellule bersaglio, innesca l'attivazione di meccanismi pro-infiammatori. Inoltre il tmTNF α è in grado di innescare processi di segnalazione inversa ("reverse signaling"), e di attivare risposte antiinfiammatorie (8, 9).

INIBITORI DEL $TNF\alpha$ NELLE MALATTIE INFIAMMATORIE CRONICHE

$TNF\alpha$ quando è presente in alte concentrazioni, è coinvolto nella patogenesi di alcune malattie infiammatorie croniche, quali l'AR, UC, AS, PsA, CD. In queste patologie il $TNF\alpha$ regola l'attivazione di alcune citochine (IL-1 β , IL-6) e proteine della fase acuta (come ad esempio la proteina C reattiva) (7).

L'AR è una patologia infiammatoria cronica che colpisce circa 0,3-1,2% delle persone nel mondo, ed è caratterizzata dalla distruzione delle articolazioni fino all'erosione della cartilagine e dell'osso (10). Questa patologia è associata a progressiva disabilità, complicazioni sistemiche, morte precoce e conseguenti importanti costi socio-economici (11). L'origine rimane ancora sconosciuta, ma l'interazione tra fattori genetici e ambientali contribuisce all'instaurazione di questo stato infiammatorio cronico (10-12). I pazienti affetti da AR manifestano una condizione infiammatoria importante accompagnata da un elevato numero di macrofagi attivati, soprattutto in corrispondenza delle articolazioni, ma anche in altre sedi. I linfociti T attivati proliferano e migrano nell'articolazione dove stimolano una cascata molecolare immuno-infiammatoria. Producono, infatti, interferon γ e altre citochine pro-infiammatorie che a loro volta stimolano i macrofagi, fibroblasti, condrociti e osteoclasti. I macrofagi attivati secernono $TNF\alpha$, ma anche interleuchine (IL) quali IL-1, IL-6, IL-15 e IL-18 e altre citochine che a loro volta stimolano la produzione di mediatori dell'infiammazione, proteasi e fattori di crescita e attivano i neutrofili e le cellule endoteliali. Questa trasformazione endoteliale perpetua la risposta immunitaria incrementando il reclutamento cellulare a livello dell'articolazione contribuendo al danno articolare (10, 11). Inoltre, alcune infezioni, come quelle del virus Epstein-Barr e citomegalovirus, sembrano essere associate alla patogenesi della malattia (11). In questo contesto i farmaci inibitori del $TNF\alpha$ rappresentano una scelta terapeutica importante per i pazienti affetti da AR. Ad oggi non esiste una terapia farmacologica in grado di curare definitivamente l'AR, quelle comunemente adottate prevedono la somministrazione di "Disease Modifying Antirheumatic Drugs" (DMARDs) ed hanno la funzione di ridurre i segni e i sintomi della malattia e rallentarne il decorso, oltre a dare sollievo al dolore (13). Gli inibitori del $TNF\alpha$ approvati per l'AR sono in grado di bloccare l'azione pro-infiammatoria del $TNF\alpha$ favorendo la risposta clinica, a fronte però di effetti avversi gravi quali infezioni, reazioni al sito di infusione, e la comparsa di ADA che ne neutralizzano l'effetto (10).

La psoriasi colpisce i giovani adulti ed è considerata una patologia a carattere multisistemico associato a multiple comorbidità tra cui disordini extra-cutanei come la PsA. Quest'ultima è un'artrite infiammatoria cronica associata a infiammazione della pelle e del tessuto sinoviale ed influenza molto la qualità della vita dei pazienti (14). Colpisce solitamente i giovani adulti nella terza e quarta decade di vita, in rari casi anche i bambini. Data la complessità della malattia e l'eterogeneità di manifestazioni, spesso la diagnosi è tardiva. Le cause non sono ancora del tutto chiare ma fattori genetici ed ambientali contribuiscono all'insorgenza della malattia. I pazienti affetti da PsA manifestano solitamente disordini scheletrici, dolore ed infiammazioni delle articolazioni periferiche, spondiliti, entesiti, e in rari casi anche uveiti (15). I trattamenti attualmente approvati sono gli anti-infiammatori non steroidei, i DMARDS, gli steroidi intra-articolari e gli inibitori del TNF α .

La AS è una patologia infiammatoria cronica di origine sconosciuta che colpisce lo scheletro assiale causando mal di schiena e progressiva rigidità della spina dorsale (16). Colpisce soprattutto i giovani adulti prima dei 30 anni di età e la prevalenza varia tra 0,1% e 1% (17). Il processo infiammatorio alla base della malattia sembra essere scatenato dalla risposta immunitaria nei confronti delle strutture della cartilagine, confermata dalla presenza di linfociti T e B, macrofagi ed osteoclasti (16). Inoltre si è anche osservata un'alta concentrazione di TNF α nel siero, sinovio e articolazioni sacro-iliache dei pazienti affetti (18). La terapia farmacologica prevede la somministrazione di antinfiammatori per la gestione del dolore, e degli immunomodulatori per il controllo dell'infiammazione, oltre alla somministrazione di esercizi di fisioterapia. Il trattamento dei sintomi disabilitanti della malattia è migliorato con l'introduzione degli inibitori del TNF α , in particolare in seguito a somministrazione di ETA (18).

Le patologie infiammatorie dell'intestino comprendono la CD e la UC, entrambe caratterizzate da un'infiammazione cronica del tratto gastrointestinale (19, 20).

CD è una patologia sistemica che colpisce vaste aree del tratto gastrointestinale e l'infiammazione è solitamente disomogenea. L'incidenza va da 0,003 a 15,6 casi e la prevalenza da 3,6 a 214 casi per 100.000 persone per anno (20). Si manifesta con dolori addominali, diarrea, febbre, nausea, vomito e ostruzione intestinale con passaggio di sangue o muco (19). Colpisce solitamente i giovani adulti. I fattori scatenanti la risposta immunitaria a carico della mucosa intestinale sono ancora da chiarire. Si verifica più di frequente in seguito ad una gastroenterite da infezione con incremento della carica batterica presente nella mucosa gastrointestinale (19). Un ruolo chiave è rivestito dai macrofagi attivati che rilasciano citochine pro-infiammatorie che mediano la risposta infiammatoria, la quale cronicizza. Le terapie farmacologiche adottate hanno lo scopo di mantenere la malattia in una fase di remissione e controllare l'infiammazione e comprendono la somministrazione di corticosteroidi, aminosalicilati, immunomodulatori e gli inibitori del TNF α (IFX, ADL e CTZ) (19). UC è solitamente

circoscritta al colon e caratterizzata da un'infiammazione cronica della mucosa. L'incidenza è calcolata da 1,2 a 20,3 casi per 100.000 persone ogni anno, mentre la prevalenza è 7,6 a 246 per 100.000 persone ogni anno (20). Interessa generalmente la regione del retto, nel quale si osserva un infiltrato di polimorfonucleati neutrofili a livello della mucosa e della sottomucosa, responsabili della progressiva distruzione epiteliale e della conseguente formazione di lesioni ulcerose. I pazienti possono manifestare dolore addominale e nei casi più gravi anche febbre, anemia e calo ponderale (20). L'eziologia dell'UC rimane sconosciuta, probabilmente intervengono fattori sia genetici sia ambientali, oltre a infezioni, che causano alterazioni della mucosa, e contribuiscono allo sviluppo del processo infiammatorio. Questo è mantenuto dall'aumentata espressione di citochine pro-infiammatorie. In questo contesto, il TNF α riveste un ruolo importante ed è presente in alte concentrazioni nel sangue dei pazienti (20). Le terapie farmacologiche adottate hanno lo scopo di regolare il processo infiammatorio in atto e prevedono la somministrazione di acido 5-aminosalicilico, steroidi, e negli ultimi anni è indicata anche la somministrazione di probiotici. Nelle forme più severe sono utilizzati gli inibitori del TNF α , IFX, ADL e GOL, in grado di indurre e mantenere la remissione clinica. Questi farmaci sono in grado di innescare l'apoptosi delle cellule immunitarie che esprimono TNF α , riducendo in questo modo la secrezione delle citochine pro-infiammatorie a valle (20).

FARMACI INIBITORI DEL TNF α

Gli inibitori del TNF α (anti-TNF α) comprendono IFX, ADL, GOL, ETA e CTZ. Sono mAbs in grado di neutralizzare l'effetto pro-infiammatorio del TNF α .

IFX è stata la prima molecola approvata dalle agenzie regolatorie. IFX (Remicade) appartiene alla classe delle immunoglobuline di tipo G1 (IgG1). È un Abs chimerico (umano-murino), somministrato per via endovenosa, e lega sia il tmTNF sia l'sTNF anche in maniera bivalente, ovvero più molecole di TNF possono essere legate dallo stesso anticorpo. IFX è in grado di legare anche le forme monomeriche solubili di TNF α . ADL (Humira) e GOL (Simponi) sono anticorpi umanizzati, prodotti usando tecnologie del DNA ricombinante, e solitamente somministrati sottocute. ETA (Enbrel) è una proteina di fusione ingegnerizzata, costituita da un frammento Fc dell'immunoglobulina IgG1 umana, fusa con la porzione extracellulare del TNFR2 umano. Infine, CTZ (Cimzia) è un anticorpo ricombinante umanizzato in cui il frammento Fab dell'immunoglobulina è coniugato ad una molecola di polyethylene glycol (21).

Gli inibitori del TNF α legano la molecola TNF α trimerica, sia tmTNF α sia sTNF α , con grande affinità. Inoltre sono in grado di stabilire legami bivalenti o monovalenti con il TNF α , attivare processi di segnalazione inversa e indurre apoptosi. Il legame dell'mAb con il TNF α , interferisce con il legame del TNF α con i suoi recettori, TNFR1, TNFR2 e sTNFR, neutralizzandone gli effetti pro-infiammatori e inibendo

l'espressione dei geni coinvolti nei processi infiammatori (2).

Numerosi studi hanno dimostrato che questi farmaci consentono di ottenere risposte terapeutiche favorevoli nella fase di induzione e mantenimento della remissione clinica della malattia nel ~60-70% dei pazienti (22), ma in una considerevole parte dei pazienti gli inibitori del TNF α non risultano essere efficaci o i soggetti non tollerano la terapia data la possibile comparsa di eventi avversi, e vanno incontro ad un fallimento terapeutico primario. Inoltre, ~40% dei pazienti che inizialmente rispondono alla terapia, può andare incontro ad un fallimento terapeutico secondario, dovuto probabilmente alla somministrazione di un livello sub-terapeutico del farmaco, sviluppo di anticorpi antifarmaco o comparsa di mediatori dell'infiammazione (23). Di fronte ad un fallimento terapeutico, le strategie che possono essere perseguite per cercare di ottenere un effetto prevedono di (i) aumentare la dose del farmaco mantenendo inalterata la frequenza di somministrazione, (ii) aumentare la frequenza di somministrazione e non la dose, (iii) sostituire il primo farmaco con un altro farmaco anti-TNF α , (iv) sostituire il farmaco con un altro avente un meccanismo di azione differente rispetto all'inibizione del TNF α (3) pur a valenza immunosoppressiva, come ad esempio il methotrexate.

I farmaci inibitori del TNF α hanno differenti caratteristiche strutturali e funzionali, oltre a meccanismi di azione e proprietà farmacodinamiche e farmacocinetiche differenti che possono influenzarne i profili di efficacia e di sicurezza (Tabella 1). Il legame con il tmTNF α conferisce ad alcuni farmaci la capacità di attivare processi di segnalazione inversa, ovvero di comportarsi con il tmTNF non come antagonisti, ma come agonisti, e di indurre apoptosi o di sopprimere la produzione di citochine pro-infiammatorie nelle cellule che

esprimono il tmTNF.

Per quanto riguarda le proprietà farmacocinetiche, le differenze più importanti tra questi mAbs riguardano le dosi e le vie di somministrazione (endovenosa o sottocutanea), il tempo di emivita plasmatica, e il rapporto tra concentrazione massima e concentrazione minima (il cosiddetto "peak-trough ratio") del farmaco nel siero il cui valore dovrebbe essere mantenuto basso, in modo da garantire un adeguato livello di farmaco capace di neutralizzare l'effetto di TNF α (7).

Sebbene molti studi abbiano dimostrato che tutti i farmaci siano in grado di legare il TNF α con alta affinità, sono state riscontrate importanti differenze in merito alle loro cinetiche di legame e di dissociazione dal TNF α ; infatti, IFX e ADL hanno una velocità di dissociazione dal TNF α più lenta ed una affinità di legame tre volte più elevata rispetto agli altri farmaci (2, 7).

Gli inibitori del TNF α sono caratterizzati dalla capacità di scatenare la produzione di anticorpi diretti contro sé stessi (attività immunogena), i quali, legandosi agli inibitori del TNF α , bloccano l'interazione tra il farmaco e il TNF α , riducendo i livelli sierici del farmaco a volte al di sotto dei livelli minimi necessari per ottenere un'efficacia terapeutica (3, 24).

IMMUNOGENICITÀ

Una delle caratteristiche dei farmaci inibitori del TNF α è la capacità di stimolare il sistema immunitario e generare anticorpi diretti contro il farmaco stesso, gli ADA. Questo fenomeno è conosciuto come immunogenicità (25). La produzione di ADA è causata dal fatto che epitopi diversi della molecola di anti-TNF α vengono riconosciuti come elementi estranei da parte del sistema immunitario, e si ritiene che questa tendenza sia maggiore nei farmaci contenenti frazioni murine rispetto a quelli costituiti da

Tabella 1

Principali caratteristiche degli inibitori del TNF α

	Infliximab	Adalimumab	Golimumab	Etanercept	Certolizumab
Struttura	Anticorpo monoclonale	Anticorpo monoclonale	Anticorpo monoclonale	Proteina di fusione P75TNFR/Fc	Anticorpo monoclonale PEG/ Fab
Ligando	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF	sTNF, tmTNF and LT α 3	sTNF, tmTNF
Peso (kDa)	150	150	150	150	95
Vita media (giorni)	8-10	10-14	9 $\pm$ 15	3	14
Patologie approvate	CD, UC, RA, PsA, AS	CD, UC, RA, PsA, AS	RA, PsA, AS, UC	RA, AS, PsA	CD, RA
"Reverse signaling"	Alto	Alto	Moderato	Moderato	Moderato
Apoptosi	Alto	Alto	Moderato	Moderato	Moderato
Dosaggio	5 mg/kg	40 mg	50 mg	25-50 mg	400 mg
Somministrazione	Endovena	Sotto cute	Sotto cute	Sotto cute	Sotto cute
Frequenza (settimane)	8 settimane, poi dopo 0, 2-6 settimane	2	4	1	2

sTNF, tumor necrosis factor forma solubile; tmTNF, tumor necrosis factor forma trans-membrana; CD, malattia di Crohn; UC, colite ulcerosa; RA, artrite reumatoide; PsA, artrite psoriasica; AS, spondilite anchilosante.

molecole di origine umana. Inoltre, gli ADA prodotti possono essere di differenti isotipi (IgG, IgE, IgM) (23). La produzione di ADA è uno dei fattori che può determinare un fallimento terapeutico secondario, oltre a causare l'insorgenza di reazioni avverse da infusione, e determinare la neutralizzazione degli effetti terapeutici dei farmaci. Gli ADA agiscono legandosi al farmaco anti-TNF α formando un complesso che impedisce il legame del farmaco con le loro molecole bersaglio. In questo modo incrementano la clearance del farmaco riducendone la concentrazione funzionale con conseguente perdita di risposta (23). Gli ADA possono quindi interferire sia a livello farmacocinetico, riducendo le concentrazioni attive del farmaco anti-TNF α , sia a livello farmacodinamico, impedendo al farmaco anti TNF α di legarsi al TNF α per neutralizzarlo.

La determinazione degli ADA nel siero può quindi essere molto importante per la scelta di un'adeguata strategia terapeutica per i pazienti. Un recente studio riporta che la comparsa degli ADA potrebbe essere transitoria. Nei pazienti per i quali si rilevano modeste quantità di ADA, questi potrebbero scomparire in breve tempo, a differenza dei pazienti per i quali si determinano alte concentrazioni di ADA, i quali vanno incontro solitamente a interruzione del trattamento, o potrebbero richiedere modifiche del trattamento, eventualmente con aggiunta di immunosoppressori (26).

La somministrazione degli inibitori del TNF α può comportare la formazione di anticorpi neutralizzanti (infliximab, certolizumab, golimumab) o non neutralizzanti (eternacept). I diversi farmaci hanno un differente tasso di immunogenicità che varia a seconda della via di somministrazione del farmaco, della struttura molecolare, dose, terapie concomitanti, ma anche fattori genetici, età, sesso e caratteristiche della patologia. La produzione degli ADA è molto variabile tra i pazienti. L'IFX, essendo un anticorpo chimerico, dovrebbe essere più immunogenico rispetto agli anticorpi umanizzati. Il tasso di produzione di ADA in pazienti in terapia con IFX varia dal 6% al 61%, mentre, per i pazienti in terapia con ADL, oscilla tra 0,04% e 87%. La frequenza di ADA è inferiore con gli altri inibitori del TNF α , CTZ (3-25%), ETA (0-18%) e GOL (0-7%), riducendo anche l'associazione tra ADA e la risposta clinica (3).

REVISIONE SISTEMATICA DELLA LETTERATURA

Per studiare l'effetto degli ADA sulla risposta terapeutica e clinica in pazienti affetti da patologie infiammatorie croniche, abbiamo condotto una revisione sistematica della letteratura (27). La revisione include 34 studi (4 studi randomizzati e 30 studi osservazionali). La nostra meta-analisi mostra che la presenza di ADA nel siero riduce la risposta al trattamento nel 57% dei pazienti trattati con ADL e IFX rischio relativo (RR) 0,43, 95% intervallo di confidenza (95% IC) da 0,3 a 0,63. L'analisi statistica effettuata tenendo conto del tipo di disegno di studio, metodo di determinazione, tipo di malattia, terapia

concomitante o pazienti che cambiano trattamento, riporta un'associazione ugualmente significativa. Inoltre i pazienti trattati con ETA, valutati in soli due studi, non sembrano sviluppare ADA. La produzione di ADA sembra essere associata anche al cambiamento della risposta clinica. Nei pazienti che sviluppano ADA, lo score sulla scala del "disease activity score 28" (DAS28) si riduce di circa un punto (MD 0,93; 95% IC da 0,41 a 1,44) e la concentrazione sierica del farmaco si riduce di circa 7 mg/L. Allo stesso modo, lo sviluppo di ADA si riduce di ~70% nei pazienti che rispondono al trattamento con gli inibitori del TNF α rispetto ai pazienti che non rispondono (RR 0,31; 95% IC da 0,18 a 0,52), e la concentrazione del farmaco era più alta di circa 3 mg/l. La terapia con gli inibitori del TNF α è associata anche ad un rischio aumentato di reazioni avverse al sito di iniezione, soprattutto nei pazienti in terapia con IFX somministrato per via endovenosa, e di infezioni serie come riportato anche in una precedente revisione sistematica (28).

Le evidenze disponibili suggeriscono che ci sono chiare differenze nella risposta al trattamento tra i pazienti che sviluppano ADA e quelli che non li producono. Per cui questo aspetto dovrebbe essere considerato quando si prendono decisioni cliniche al fine di apportare maggiori benefici ai pazienti.

Gli effetti degli ADA sull'efficacia degli inibitori del TNF α sono stati valutati anche in altre revisioni sistematiche i cui risultati sono concordanti con la nostra valutazione (29-32).

IMPLICAZIONI DEI METODI PER LA QUANTIFICAZIONE DEGLI ADA E DEI FARMACI

I farmaci inibitori del TNF α sono determinati utilizzando principalmente metodi ELISA o RIA, ma anche utilizzando saggi enzimatici in fase liquida, o saggi che misurano la mobilità ("homogeneous mobility shift assay", HMSA) anche se non utilizzati comunemente nella pratica di laboratorio. L'elemento in comune che definisce la loro specificità è il rilevamento degli anticorpi utilizzati. Non c'è differenza tra saggi in fase liquida o solida in termini di concentrazione misurata del farmaco, ma è stata osservata una differenza nella specificità (26). Il vantaggio di usare anticorpi antifarmaco mono o policlonali è la specificità con cui legano il farmaco stesso, riducendo il numero di falsi positivi. Generalmente si suppone vi sia una buona correlazione tra le concentrazioni di farmaco misurati con le diverse metodiche (33) anche se pochi sono gli studi sperimentali.

Per quanto riguarda la determinazione degli ADA, il saggio più utilizzato è quello ELISA che permette di determinare i livelli di ADA in assenza di farmaco sierico. In presenza di farmaco nel siero, la determinazione degli ADA potrebbe essere inconclusiva. Per la determinazione degli ADA il metodo più impiegato è quello con il doppio antigene, in cui il farmaco è utilizzato sia per catturare che per rilevare gli anticorpi (33). Gli ADA possono essere determinati anche con saggi RIA o HMSA. Le metodiche in fase fluida, in questo caso, presentano maggiori

vantaggi, in quanto sono meno suscettibili all'interferenza dovuta alla presenza del farmaco nel siero (26). Il tasso di ADA riportato dipende non solo dalla metodica utilizzata, ma anche dal tipo di popolazione e in quale momento viene effettuato il campionamento.

Gli studi valutati nella nostra revisione sistematica utilizzano, per la quantificazione sia dei farmaci che degli ADA soprattutto metodi ELISA o RIA, i quali però non sono in grado di determinare tutti i tipi di anticorpi. Il principale limite di queste metodiche è il rischio di avere risultati falsi positivi, a causa del legame non specifico tra l'immunoglobulina e il farmaco, come riportato in un recente studio (34). Gli autori sottolineano che l'alta prevalenza di falsi positivi e l'assenza di associazione tra la formazione di ADA e le caratteristiche cliniche dei pazienti, limitano l'utilità di questi kit nella pratica clinica (34). Inoltre, in presenza di alte concentrazioni sieriche di farmaco, gli ADA liberi non vengono identificati correttamente (35). Infatti, gli ADA liberi legano il farmaco formando un complesso riducendo così i livelli di anticorpo libero che possono essere determinati (36).

Nonostante lo sviluppo di differenti metodiche per determinare sia il farmaco sia gli ADA, si è osservata l'assenza di standardizzazione tra i saggi, aspetto che contribuisce a limitare la riproducibilità dei risultati soprattutto tra laboratori. Questi kit mostrano differenti valori di accuratezza diagnostica, alcuni sono costruiti per piattaforme completamente automatizzate, ma potrebbero risentire dell'effetto matrice o cross reattività. Per cui risulta difficile confrontare i risultati ottenuti in laboratori diversi e questi potrebbero essere soggetti a misinterpretazioni. In commercio sono disponibili kit per la determinazione di ADA che utilizzano differenti anticorpi e diversi standard di riferimento. Con queste metodiche, la presenza di ADA dovrebbe essere riconfermata con un saggio successivo, in quanto questi ADA potrebbero essere transitori per quei pazienti in terapia di mantenimento o concomitante con immunosoppressori (23). Recentemente è stato sviluppato uno standard per gli anticorpi anti-ADL per favorire l'armonizzazione interlaboratorio, da utilizzare come calibratore per i differenti saggi e per standardizzare la quantificazione di ADA (37).

In questo contesto, la standardizzazione dei metodi analitici a disposizione è il primo passo necessario per poter implementare la determinazione dei farmaci e degli ADA nei laboratori clinici.

FATTORI CHE INFLUENZANO LE CONCENTRAZIONI SIERICHE DI FARMACO

I meccanismi coinvolti nel fallimento terapeutico primario e secondario, non sono stati ancora bene definiti, ma alcuni fattori possono influenzare i livelli sierici di farmaco; tra questi il peso dei pazienti, il cui aumento comporta l'incremento della clearance del farmaco, il sesso maschile, e il "body mass index" (BMI) che risulta associato ad una riduzione del farmaco dovuta alla produzione di citochine pro-infiammatorie da parte del tessuto adiposo. Infine, molteplici studi dimostrano che la

formazione di ADA influenza il livello sierico di farmaco (38).

FATTORI CHE INFLUENZANO LA FORMAZIONE DI ADA

I fattori associati alla produzione di ADA non sono ancora completamente chiari, ma alcuni studi riportano un'associazione significativa tra ADA e l'età dei pazienti, ma anche il tipo, la durata e la severità della malattia, la frequenza e il dosaggio di somministrazione del farmaco, eventuale terapia concomitante con gli immunosoppressori (3). Anche l'analisi sviluppata nella nostra revisione mostra come la somministrazione di methotrexate sembrerebbe ridurre la frequenza di formazione di ADA (RR 0,65, 95% IC da 0,47 a 0,9), soprattutto per i pazienti affetti da AR, CD e AS (27).

MONITORAGGIO TERAPEUTICO DEI FARMACI E DEGLI ADA

Data l'associazione tra la formazione di ADA e la riduzione dell'efficacia terapeutica degli inibitori del $\text{TNF}\alpha$, il monitoraggio terapeutico di entrambe le molecole potrebbe essere d'aiuto nel processo decisionale. L'implementazione del monitoraggio richiede la standardizzazione dei metodi di determinazione e accordo nell'interpretazione dei risultati (39). Data la relazione tra la formazione degli ADA, la risposta terapeutica, i livelli sierici degli inibitori del $\text{TNF}\alpha$ e la risposta clinica riportata in molti studi, sta maturando la convinzione che il monitoraggio possa favorire le scelte terapeutiche più appropriate per ridurre la perdita di risposta ed evitare l'immunogenicità (40). Il principale problema relativo al monitoraggio è l'identificazione del livello minimo di farmaco nel siero associato alla risposta clinica, in quanto i dati disponibili derivano da studi eterogenei in termini di popolazione studiata, determinazioni ed "endpoints" (41). Diversi algoritmi sono stati proposti per interpretare i risultati generati dai laboratori clinici (3, 40, 42-45). In generale, gli autori concordano nel suggerire la determinazione dei livelli sierici sia del farmaco sia degli ADA. Questo consente, nei pazienti che rispondono alla terapia con gli inibitori del $\text{TNF}\alpha$, il dosaggio o sospendere il farmaco, mentre i pazienti che non rispondono alla terapia potrebbero trarre vantaggio dalla modifica del trattamento in presenza di ADA, o dal cambiamento della tipologia o dosaggio del farmaco in caso rispettivamente di assenza di ADA o livelli di farmaco insufficienti (Tabella 2).

Il monitoraggio terapeutico degli anti- $\text{TNF}\alpha$ e degli ADA è importante in tutte le fasi della terapia, dall'induzione, alla fase di mantenimento fino alla remissione, in modo da garantire ai pazienti un'adeguata terapia e ridurre il rischio di perdita di risposta. Monitorare i livelli sierici del farmaco consente di limitare il rischio di sviluppare ADA, che si verifica solitamente in caso di livelli subottimali di anti- $\text{TNF}\alpha$ nella fase di induzione. Inoltre, una risposta immunogenica precoce, che guida la clearance del farmaco neutralizzandone l'effetto,

Tabella 2

Proposte di algoritmi per la valutazione del monitoraggio sierico degli anticorpi anti-farmaco (ADA) e dei farmaci inibitori del TNF α

Pazienti che rispondono alla terapia con gli inibitori del TNF α			Pazienti che non rispondono alla terapia con gli inibitori del TNF α	
Alti livelli sierici di anti-TNF α	Bassi livelli sierici di anti-TNF α		Livelli sierici ottimali di anti-TNF α	Livelli sierici insufficienti di anti-TNF α
La riduzione del farmaco somministrato riduce il rischio di sviluppare eventi avversi	In presenza di ADA, sospendere la terapia con anti-TNF α	In assenza di ADA, continuare con il regime terapeutico in atto	ADA non determinabili o presenti in piccole concentrazioni, somministrare un farmaco diverso dagli anti-TNF α	ADA non determinabili, incrementare la dose o la frequenza di somministrazione di anti-TNF α
In presenza di livelli significativi di ADA, i pazienti possono trovare beneficio dal cambiamento del trattamento con un altro farmaco anti-TNF α diverso da quello già somministrato				

comporta il fallimento terapeutico primario. Nella fase di mantenimento, concentrazioni ottimali di farmaco sono associate ad un miglioramento dell'esito clinico, mentre nei pazienti in terapia con IFX è stato osservato che l'incremento individuale del dosaggio accresce la proporzione di pazienti in remissione clinica (46).

Per garantire un adeguato monitoraggio degli inibitori del TNF α , è fondamentale anche definire i livelli soglia ottimali entro i quali dovrebbero ricadere le concentrazioni dei farmaci. Per l'IFX tale valore è stato definito a 3,5 $\mu\text{g/ml}$. Questo vuol dire che i pazienti che hanno un livello sierico di farmaco superiore a questa soglia potrebbero trarre beneficio dalla riduzione del dosaggio. Per ADL la concentrazione sierica intorno a 6-7 $\mu\text{g/ml}$ è considerata sufficiente (47, 48). Per gli altri farmaci ancora non sono stati individuati dei valori soglia ottimali, per cui ulteriori studi sono necessari per stabilirli.

CONCLUSIONI

Le evidenze disponibili dimostrano la relazione tra la formazione di ADA e la riduzione della risposta terapeutica in pazienti affetti da una patologia infiammatoria cronica che determina risultati clinici insoddisfacenti. Il monitoraggio terapeutico degli inibitori del TNF α e degli ADA può pertanto offrire un valore aggiunto nel percorso diagnostico-terapeutico, ottimizzando i trattamenti e riducendo così il rischio di eventi avversi. Tuttavia il significato clinico dell'immunogenicità e la variazione della concentrazione sierica degli inibitori del TNF α sono ancora difficili da interpretare sia per la mancanza di standardizzazione dei metodi di determinazione sia per la definizione dei range terapeutici ottimali che dipendono dalle diverse patologie e dagli endpoints clinici valutati, come comunque avviene anche nel monitoraggio terapeutico di molti farmaci di più comune e tradizionale utilizzo.

CONFLITTO DI INTERESSI

Nessuno.

BIBLIOGRAFIA

- Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 2016;12:49-62.
- Nielsen OH, Ainsworth MA. Tumor Necrosis Factor inhibitors for inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2013;369:754-62.
- Vincent F, Morand E, Murphy K, et al. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinica perspective. *Ann Rheum Dis* 2013;72:165-78.
- Atzeni F, Talotta R, Salaffi F, et al. Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. *Autoimmun Rev* 2013;12:703-8.
- Vujanovic NL. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 2011;50:159-74.
- Feldmann M, Steinman L. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* 2005;435:612-9.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, et al. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: A comprehensive review. *Pharmacol Ther* 2008;117:244-79.
- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, et al. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology* 2010;49:1215-28.
- Juhász K, Buzás K, Duda E. Importance of reverse signaling of the TNF superfamily in immune regulation. *Expert Rev Clin Immunol* 2013;9:335-48.
- Scott DL, Kingsley GH. Tumor Necrosis Factor inhibitors for Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2006;355:704-12.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011;365:2205-19.
- Willrich M, Murray DL, Snyder MR. Tumor necrosis factor inhibitors: clinical utility in autoimmune diseases. *Transl Res* 2015;165:270-82.
- Singh JA, Saag KG, Bridges SL Jr, et al. American College of Rheumatology Guideline for the treatment of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheumatol* 2016;68:1-26.
- Jung-Tai L, Horng-Ming Y, Shyun-Yeu L, et al. Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment. *World J Orthop* 2014;5:537-43.
- Ritchlin CT, Colbert RA, Gladman DD. Psoriatic arthritis. *N Engl J Med* 2017;376:957-70.
- Maksymowych WP. Ankylosing spondylitis - at the interface of bone and cartilage. *J Rheumatol* 2000;27:2295-301.
- Olivieri I, Salvarani C, Cantini F, et al. Ankylosing spondylitis

- and undifferentiated spondyloarthropathies: a clinical review and description of a disease subset with older age at onset. *Curr Op Rheumatol* 2001;13:280-4.
18. Gorman JD, Sack KE, Davis JC Jr. Treatment of ankylosing spondylitis by inhibition of tumor necrosis factor alpha. *N Engl J Med* 2002;346:1349-56.
 19. Baumgart DC, Sandborn WJ. Crohn's disease. *Lancet* 2012;380:1590-605.
 20. Danese S, Fiocchi C. Ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2011;365:1713-25.
 21. Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2011;25:549-67.
 22. Ford AC, Sandborn WJ, Khan KJ, et al. Efficacy of biological therapies in inflammatory bowel disease: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2011;106:644-59.
 23. Ha C, Mathur J, Kornbluth A. Anti-TNF levels anti-drug antibodies, immunosuppressants and clinical outcomes in inflammatory bowel disease. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 2015;9:497-505.
 24. Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 2010;10:308-15.
 25. Ordás I, Mould DR, Feagan BG, et al. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther* 2012;91:634-26.
 26. Vande Casteele N, Gils A, Singh S, et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am J Gastroenterol* 2013;108:962-71.
 27. Pecoraro V, De Santis E, Melegari A, et al. The impact of immunogenicity of TNF α inhibitors in autoimmune inflammatory disease. A systematic review and meta-analysis. *Autoimmun Rev* 2017;16:564-75.
 28. Minozzi S, Bonovas S, Lytras T, et al. Risk of infections using anti-TNF agents in rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis: a systematic review and meta-analysis. *Expert Opin Drug Saf* 2016;15:35-54.
 29. Garcês S, Demengeot J, Benito-Garcia E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a metaanalysis. *Ann Rheum Dis* 2013;72:1947-55.
 30. Maneiro J, Salgado E, Gomez-Reino J. Immunogenicity of monoclonal antibodies against tumor necrosis factor used in chronic immune-mediated inflammatory conditions: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med* 2013;173:1416-28.
 31. Nanda K, Cheifetz A, Moss A. Impact of antibodies to infliximab on clinical outcomes and serum infliximab levels in patients with inflammatory bowel disease (IBD): a meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2013;108:40-7.
 32. Thomas S, Borazan N, Barroso N, et al. Comparative immunogenicity of TNF inhibitors: impact on clinical efficacy and tolerability in the management of autoimmune diseases. A systematic review and meta-analysis. *Bio Drugs* 2015;29:241-58.
 33. Tighe D, McNamara D. Clinical impact of immunomonitoring in the treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2017;23:414-25.
 34. Lombardi G, Perego S, Sansoni V, et al. Anti-adalimumab antibodies in psoriasis: lack of clinical utility and laboratory evidence. *BMJ Open* 2016;6:e011941.
 35. Yanai H, Hanauer S. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol* 2011;106:685-98.
 36. Keiserman M, Codreanu C, Handa R, et al. The effect of antidrug antibodies on the sustainable efficacy of biologic therapies in rheumatoid arthritis: practical consequences. *Expert Rev Clin Immunol* 2014;10:1049-57.
 37. Gils A, Vande Casteele N, Poppe R, et al. Development of a universal anti-adalimumab antibody standard for interlaboratory harmonization. *The Drug Monit* 2014;36:669-73.
 38. Fernandes C, Allocca M, Danese S, et al. Progress with antitumor necrosis factor therapeutics for the treatment of inflammatory bowel disease. *Immunotherapy* 2015;7:175-90.
 39. Krieckaert C, Rispens T, Wolbink G. Immunogenicity of biological therapeutics: from assay to patient. *Curr Opin Rheumatol* 2012;24:306-11.
 40. Scott F, Lichtenstein G. Therapeutic drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2014;12:59-75.
 41. Felice C, Pugliese D, Papa A, et al. Therapeutic drug monitoring of anti-TNF- α agents in inflammatory bowel diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2015;15:1107-17.
 42. Carrascosa J. Immunogenicity in biologic therapy: implications for dermatology. *Actas Dermosifiliogr* 2013;104:471-9.
 43. Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, et al. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:971-86.
 44. Yarur A, Rubin D. Therapeutic drug monitoring of anti-tumor necrosis factor agents in patients with inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis* 2015;21:1709-18.
 45. Garcês S, Antunes M, Benito-Garcia E, et al. A preliminary algorithm introducing immunogenicity assessment in the management of patients with RA receiving tumour necrosis factor inhibitor therapies. *Ann Rheum Dis* 2014;73:1138-43.
 46. Vande Casteele N, Gils A. Pharmacokinetics of anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: Adding value to current practice. *J Clin Pharmacol* 2015;55 Suppl 3:S39-50.
 47. Strik AS, Bots SJA, D'Haens G, et al. Optimization of anti-TNF therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Expert review of clinical pharmacology* 2016;9:429-39.
 48. Sirotti S, Generali E, Ceribellini A, et al. Personalized medicine in rheumatology: the paradigm of serum autoantibodies. *Auto Immun Highlights* 2017. doi: 10.1007/s13317-017-0098-1.