



SOCIETÀ ITALIANA DI FARMACOLOGIA

Position paper

Equivalenza terapeutica di classe dei farmaci inibitori del *tumour necrosis factor*: analogie e differenze farmacologiche

Corrado Blandizzi

Divisione di Farmacologia e Chemioterapia, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Pisa

Con l'approvazione del Consiglio Direttivo della Società Italiana di Farmacologia

Indirizzo per la corrispondenza:

Prof. Corrado Blandizzi
Ordinario di Farmacologia
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale
Università di Pisa
Via Roma, 55
56126 Pisa

Tel.: 050-2218754; Fax: 050-2218758
e-mail: corrado.blandizzi@med.unipi.it

Indice

1. Introduzione
2. Farmaci anti-TNF: profili differenziali di efficacia e tollerabilità clinica
3. Il sistema del TNF e dei suoi recettori
 - 3.1. Tumour necrosis factor
 - 3.2. Linfotossine
 - 3.3. Recettori del TNF: meccanismi di signaling e reverse signaling
4. Anticorpi: proprietà molecolari e biologiche
5. Farmaci anti-TNF
 - 5.1. Struttura molecolare
 - 5.2. Differenze farmacodinamiche
 - 5.2.1. Affinità e cinetica di legame con il TNF
 - 5.2.2. Neutralizzazione di TNF: specificità
 - 5.2.3. Interazione monovalente o bivalente con il TNF
 - 5.2.4. Reverse signaling
 - 5.2.5. Apoptosi
 - 5.2.6. Interazione con i recettori Fc γ -R
 - 5.3. Differenze farmacocinetiche
 - 5.4. Differenze inerenti all'attività immunogena
6. Conclusioni
7. Bibliografia

1. Introduzione

Tumour necrosis factor (TNF) è una citochina pleiotropica prodotta dall'organismo umano per svolgere funzioni regolatrici sui meccanismi alla base delle reazioni infiammatorie, delle risposte immunitarie e della trasformazione cellulare neoplastica (Tracey et al., 2008; Vujanovic et al., 2011). Le diverse attività biologiche del TNF sono mediate dalla sua interazione con due tipi di recettore, denominati TNF-R1 e TNF-R2, che sono espressi nella maggior parte delle cellule umane e si avvalgono di meccanismi di trasduzione differenti per svolgere funzioni biologiche diverse (Taylor, 2010). Il TNF è considerato una sorta di 'citochina sentinella' dell'organismo, dal momento che esso dà l'avvio ai meccanismi di difesa in risposta all'applicazione di stimoli lesivi locali. Sotto questo profilo, si ritiene che il TNF, se presente nei tessuti a basse concentrazioni, possa svolgere azioni benefiche, favorevoli all'omeostasi dell'organismo, quali il potenziamento dei meccanismi di difesa dell'ospite contro le infezioni (Taylor et al., 2010).

A causa del proprio coinvolgimento nella regolazione dei processi immuno-infiammatori, il TNF, se prodotto in quantità eccessive rispetto alle concentrazioni fisiologiche, assume un ruolo predominante nella patogenesi e fisiopatologia di varie malattie infiammatorie croniche immuno-mediate, quali l'artrite reumatoide, la spondilite anchilosante, la malattia di Crohn, la colite ulcerosa, la psoriasi e l'artrite psoriasica. Queste malattie sono tutte caratterizzate da gravi e progressive alterazioni organiche dei tessuti colpiti, alle quali conseguono importanti limitazioni funzionali e complicanze e, più in generale, un notevole peggioramento della qualità di vita e della capacità lavorativa e relazionale dei pazienti colpiti (Jacobs et al., 2011; Raval et al., 2011; Salomon-Escoto et al., 2011). In tali patologie l'espressione del TNF aumenta nei tessuti coinvolti come conseguenza delle risposte immunitarie di tipo sia innato che adattativo. Il TNF media quindi un'ampia varietà di effetti patogeni diretti e induce anche

la produzione di altri mediatori dell'inflammatione e della distruzione tissutale, costituendo, in tal modo, l'apice di una piramide infiammatoria molto complessa (Tracey et al., 2008).

Per le ragioni sopra esposte, il TNF è considerato un bersaglio molecolare rilevante per lo sviluppo di farmaci efficaci contro le malattie infiammatorie immuno-mediate. In linea con questo concetto, l'introduzione nella pratica clinica di farmaci biotecnologici, caratterizzati da strutture molecolari proteiche complesse in grado di legarsi al TNF e di neutralizzare le sue attività biologiche pro-infiammatorie e immuno-attivanti, ha consentito una vera e propria svolta storica nella terapia medica delle malattie su base immunitaria. Di fatto questi farmaci costituiscono tuttora un irrinunciabile strumento terapeutico per modificare la storia naturale e la progressione sfavorevole delle malattie infiammatorie immuno-mediate (Blonski et al., 2011; Furst et al., 2011; Raval et al., 2011).

La classe dei farmaci anti-TNF comprende attualmente cinque molecole proteiche biotecnologiche, rappresentate da infliximab, etanercept, adalimumab, golimumab e certolizumab pegol. Sebbene tutte queste molecole siano approvate per l'uso clinico in Italia, ciascuna di esse è registrata per specifiche indicazioni terapeutiche le quali coincidono solo in parte (Tabella 1).

I dati della letteratura scientifica suggeriscono che i farmaci compresi nella classe degli anti-TNF siano in grado di inibire in maniera differenziale le numerose azioni biologiche mediate dal TNF, con conseguenze diverse sui meccanismi patogenetici e sulla fisiopatologia delle malattie infiammatorie immuno-mediate. Inoltre, le differenze nella struttura molecolare dei farmaci anti-TNF giustificano i loro diversi profili farmacocinetici, la loro diversa capacità di stimolare il sistema immunitario a produrre anticorpi in grado di neutralizzare le loro azioni farmacologiche (attività immunogena), e le loro differenze di efficacia terapeutica. Queste ultime tendono ad emergere soprattutto nei trattamenti a lungo termine o nei casi in cui i pazienti perdono la risposta terapeutica ad uno dei farmaci compresi nella classe, ma

mantengono la possibilità di rispondere ad altri farmaci appartenenti alla stessa classe (Tracey et al., 2008; Thalayasingam & Isaacs, 2011).

Sulla base di quanto premesso, l'obiettivo del presente *position paper* è quello di illustrare e discutere i dati principali della letteratura scientifica a sostegno delle similitudini o differenze che intercorrono tra i farmaci compresi nella classe degli anti-TNF, con particolare riguardo per la loro struttura molecolare, i meccanismi di azione (farmacodinamica), i profili farmacocinetici, e le possibili implicazioni delle differenze in termini di efficacia terapeutica e sicurezza di impiego.

2. Farmaci anti-TNF: profili differenziali di efficacia e tollerabilità clinica

L'assenza di studi clinici comparativi diretti, di tipo randomizzato e controllato, tra i farmaci anti-TNF ha finora impedito di stabilire in maniera oggettiva la possibile esistenza di differenze significative tra i loro profili di efficacia e tollerabilità. Nonostante questa notevole limitazione, le differenze tra i farmaci anti-TNF nel contesto clinico sono comunque testimoniate dal fatto che le indicazioni terapeutiche per le quali essi sono stati registrati sono, per lo meno in parte, diverse (Tabella 1). Per esempio, se da un lato infliximab, etanercept e adalimumab condividono l'indicazione per l'impiego nell'artrite reumatoide, nella psoriasi e nell'artrite psoriasica, dall'altro infliximab e adalimumab, ma non etanercept, sono indicati per la terapia della malattia di Crohn e della colite ulcerosa, così come adalimumab, ma non infliximab ed etanercept, è indicato per il trattamento della spondiloartrite assiale.

E' importante sottolineare inoltre che studi condotti nella fase post-marketing, volti all'ottimizzazione dell'efficacia dei trattamenti farmacologici, e lo sviluppo di registri, che riflettono l'uso effettivo dei farmaci nella pratica clinica, hanno portato evidenze a sostegno delle differenze che connotano le azioni cliniche dei diversi farmaci anti-TNF (Thalayasingam e Isaacs, 2011). Alcune di queste osservazioni cliniche sono commentate qui di seguito:

1) E' noto che trattamenti a base di infliximab, etanercept e adalimumab sono efficaci nell'artrite associata alla psoriasi (Mease et al., 2004; Antoni et al., 2005; Mease et al., 2005). Tuttavia, in questo contesto, etanercept è risultato meno efficace di infliximab e adalimumab nel promuovere il miglioramento delle lesioni psoriasiche cutanee (Mease et al., 2004; Taylor, 2010). Inoltre, nei pazienti con psoriasi affetti da comorbidità, quali, per esempio, le uveiti, la malattia di Crohn e la colite ulcerosa, adalimumab, a differenza di etanercept, si è dimostrato efficace nei confronti sia della psoriasi che delle condizioni di comorbidità (Pierard et al., 2010; Kimball et al., 2001).

2) Nei pazienti con malattia di Crohn le differenze cliniche tra farmaci anti-TNF risultano ancora più evidenti, dal momento che, a differenza di infliximab e adalimumab (Ten Hove et al., 2002; Papadakis et al., 2005), etanercept è risultato scarsamente efficace e non è stato approvato per il trattamento di questa patologia (Sandborn et al., 2001; Taylor, 2010). Per spiegare tale differenza è stato suggerito che gli anticorpi monoclonali anti-TNF (infliximab, adalimumab) abbiano una maggiore capacità di promuovere la disgregazione dei granulomi rispetto ad etanercept (Wallis & Ehlers, 2005). Le lesioni granulomatose sono il risultato di complesse interazioni tra linfociti T e macrofagi altamente regolate dal TNF (Baughman et al., 2003). Tuttavia, nonostante l'importanza del TNF nella fisiopatologia dei granulomi, etanercept è risultato inefficace nel trattamento di varie malattie granulomatose quali la granulomatosi di Wegener, la sarcoidosi, sia polmonare che oculare, e le uveiti granulomatose (Utz et al., 2003; Baughman et al., 2005; Smith et al., 2005; WGET Research Group, 2005). Per contro, altre esperienze cliniche hanno evidenziato che infliximab può svolgere effetti benefici sulle manifestazioni sia polmonari che extra-polmonari della sarcoidosi (Baughman et al., 2006; Judson et al., 2008). Risultati analoghi sono stati ottenuti con adalimumab in pazienti affetti da sarcoidosi sistemica, polmonare od oculare (Kamphuis et al., 2001; Baughman et al., 2012; Milman et al., 2012).

3) I registri nazionali sugli anti-TNF attivi in alcuni Paesi europei e in U.S.A. hanno evidenziato che, nei pazienti con artrite reumatoide, questi farmaci sono efficaci e ben tollerati. Tuttavia, per i tre farmaci anti-TNF (infliximab, adalimumab ed etanercept) le rispettive percentuali di risposta terapeutica, remissione della malattia e aderenza al trattamento farmacologico non sono risultate sovrapponibili (Hetland et al., 2010; Greenberg et al., 2012). Infatti, per ciascun farmaco, i registri riportano diverse percentuali di *drug survival* (intervallo di tempo nel quale il paziente permane in terapia con un dato farmaco) in ragione della patologia (artrite reumatoide, artrite psoriasica, spondilite anchilosante, psoriasi) e della tipologia dei pazienti valutati (naive alla terapia anti-TNF, risposta inadeguata ad un primo, secondo o terzo farmaco anti-TNF) (Gniadecki et al., 2011; Carmona et al., 2006)

4) In generale, i dati contenuti nei registri mostrano che il 50% circa dei pazienti, che hanno inizialmente risposto al trattamento con un farmaco anti-TNF, sono costretti ad interrompere la terapia dopo circa 3-4 anni, a causa dell'insorgenza di effetti avversi o di perdita dell'efficacia (Du Pan et al. 2009; Hetland et al., 2010; Soliman et al., 2011). Altri studi hanno suggerito che i pazienti che perdono la risposta terapeutica ad un primo farmaco anti-TNF possono rispondere al trattamento con un secondo farmaco della stessa classe (Thalayasingam & Isaacs, 2011). Per esempio, l'analisi dei dati del registro nazionale del Regno Unito ha evidenziato che, tra i pazienti che erano passati da un primo a un secondo farmaco anti-TNF, circa il 73% è rimasto in terapia con il secondo farmaco per almeno sei mesi. Inoltre, è stato osservato che l'interruzione del primo farmaco per inefficacia si associa ad un aumento della percentuale di inefficacia anche per il secondo farmaco, e che l'interruzione del primo farmaco a causa dell'insorgenza di effetti avversi si associa ad un aumento della percentuale di reazioni avverse anche con il secondo farmaco (Hyrich et al., 2007).

5) L'analisi cumulativa dei risultati degli studi clinici randomizzati e controllati con quelli forniti dai registri sul monitoraggio della sicurezza ha evidenziato un aumento del rischio di

effetti avversi infettivi, con particolare riguardo per la tubercolosi e altre infezioni causate da microrganismi intracellulari, in seguito a trattamento con farmaci anti-TNF (Askling et al., 2005; Bongartz et al., 2006). Casi di tubercolosi sono stati documentati nei pazienti trattati con tutti i farmaci anti-TNF, e l'incidenza è risultata più elevata e precoce con infliximab e adalimumab rispetto a etanercept (Keystone, 2005). Gli episodi si sono verificati soprattutto come riattivazione di una forma latente di tubercolosi, e di solito sono insorti entro i primi mesi di terapia (Bieber e Kavanaugh, 2004).

3. Il sistema del TNF e dei suoi recettori

Il TNF fa parte di un ampio gruppo di citochine denominate 'superfamiglia TNF', che comprende vari fattori molecolari strutturalmente e funzionalmente correlati. A questa superfamiglia appartengono, oltre al TNF stesso, le linfotossine, il fattore pro-apoptotico Fas, il fattore regolatore dei linfociti B CD40, e il *receptor activator of nuclear factor kappa-B*. Queste citochine regolano vari aspetti dei processi biologici legati alle reazioni infiammatorie e immunitarie attraverso il controllo di importanti funzioni cellulari, quali la proliferazione, la differenziazione, la morte cellulare programmata (apoptosi) e la biosintesi e liberazione di un'ampia serie di fattori molecolari e mediatori (Mewar & Wilson, 2011).

La nomenclatura del TNF e delle linfotossine è stata modificata nel corso degli anni, e questo aspetto merita quindi una precisazione. Nel 1998, le vecchie denominazioni – TNF α e TNF β – sono state modificate, rispettivamente, in TNF e linfotossina alfa (LT α) (Tracey et al., 2008). La nomenclatura completa delle molecole endogene correlate al TNF e alle linfotossine è descritta in dettaglio nelle sezioni seguenti.

3.1. Tumour necrosis factor

Il TNF può essere prodotto da una notevole varietà di cellule sia di natura immunitaria che non-immunitaria, quali macrofagi, linfociti T, mastociti, granulociti, cellule NK (*natural*

killer), fibroblasti, neuroni, cheratinociti e cellule muscolari lisce (Tracey et al., 2008; Mewar & Wilson, 2010).

Il TNF è una molecola proteica costituita da tre subunità polipeptidiche identiche (omotrimerico). Dopo la biosintesi, le singole subunità (monomeri) vengono esposte sulla superficie della membrana cellulare dove si assemblano a costituire la forma omo-trimerica, la quale può mantenere questa localizzazione (tmTNF, *trans-membrane TNF*) oppure può essere clivata ad opera dell'enzima TACE (*TNF- α converting enzyme*, noto anche come ADAM-17: *a disintegrin and metalloproteinase 17*) e liberata negli spazi extracellulari e nel circolo ematico, dove si trova come forma trimerica solubile (sTNF). Sia tmTNF che sTNF sono biologicamente attivi. Sotto questo aspetto, il sistema del TNF è peculiare in quanto TNF si comporta come un mediatore che può svolgere le proprie azioni sia che si trovi legato alla membrana cellulare (tmTNF) o che si trovi in circolazione nei fluidi organici (sTNF). Tuttavia è importante sottolineare che le quantità relative di tmTNF o sTNF presenti nell'organismo possono variare sensibilmente in rapporto al tipo di patologia, allo stato di attivazione di diversi tipi di cellule coinvolte in una determinata patologia, alle concentrazioni di TACE in forma attiva e alle concentrazioni di fattori inibitori endogeni di TACE (per es., l'inibitore tissutale della metalloproteinasi-3). Un frammento della molecola di tmTNF può essere clivato anche dall'enzima SPPL2b (*type 2 signal peptide peptidase-like protease*) e liberato nel citoplasma cellulare, dal quale può traslocare nel nucleo per trasmettere segnali di attivazione o soppressione dei processi di trascrizione genica. Nel sangue e nei fluidi tissutali il TNF può essere presente anche come forma monomera solubile. Questa, pur essendo di per sé priva di attività biologica, può aggregarsi con altri monomeri e dare luogo a forme trimeriche solubili (sTNF) biologicamente attive (Tracey et al., 2008; Horiuchi et al., 2010).

La biosintesi di TNF è un processo finemente regolato, e, in condizioni fisiologiche, le cellule del sistema immunitario/infiammatorio in stato di quiescenza producono quantità molto basse di questa citochina. Studi sui macrofagi hanno mostrato che la biosintesi di TNF

può essere indotta da un'ampia varietà di stimoli, tra i quali: batteri, virus, complessi antigene-anticorpo, citochine (IL-1, IL-17, GMC-SF, interferone- γ), fattori del complemento, cellule tumorali, irradiazioni e ipossia/ischemia. E' noto, inoltre, che la produzione di TNF è controllata da meccanismi a *feedback* positivi e negativi attivati da fattori endogeni indotti dal TNF. Per esempio, il TNF induce la produzione di varie citochine (IL-1, interferone- γ , IL-12), che, a loro volta, possono stimolare la liberazione di TNF. Inoltre, TNF può indurre fattori di regolazione inibitori, quali IL-10, prostaglandine e glucocorticoidi, che inibiscono la trascrizione dell'mRNA che codifica per il TNF (Tracey et al., 2008; Horiuchi et al., 2010).

3.2. Linfotossine

Le linfotossine condividono molte analogie con le forme molecolari del TNF, ma, allo stesso tempo, esse sono connotate da proprietà biologiche e molecolari distinte (Tracey et al., 2008; Remouchamps et al., 2011). La famiglia delle linfotossine comprende una forma omotrimerica circolante nei fluidi dell'organismo e nel sangue e due forme eterotrimeriche che si trovano localizzate sulle membrane cellulari. La forma omotrimerica solubile è composta da tre monomeri alfa ed è attualmente designata come LT α_3 (in precedenza TNF β); essa svolge le proprie azioni biologiche legandosi specificamente ai recettori TNF-R1 e TNF-R2, nei confronti dei quali mostra un'affinità di legame simile a quella del TNF. Le due linfotossine espresse sulle membrane cellulari sono collettivamente denominate LT $\alpha\beta$, e comprendono una forma predominante LT $\alpha_1\beta_2$ e una forma minore LT $\alpha_2\beta_1$. Entrambe le LT $\alpha\beta$ di membrana interagiscono con un recettore specifico, denominato LT β -R, ma la forma LT $\alpha_2\beta_1$ può legare anche i recettori TNF-R1 e TNF-R2, sia pure con minore affinità rispetto a LT β -R (Williams-Abbott et al., 1997; Ware, 2005; Remouchamps et al, 2011).

3.3. Recettori del TNF: meccanismi di signaling e reverse signaling

Il TNF svolge le proprie azioni biologiche tramite interazione con due popolazioni di recettori specifici denominati TNF-R1 (p55, CD120a) e TNF-R2 (p75, CD120b). Entrambi questi tipi di recettori sono glicoproteine omotrimeriche, ovvero costituite da tre subunità polipeptidiche, localizzate sulla superficie della membrana cellulare ed in grado di interagire sia con TNF che con le linfotossine. Tuttavia, queste due tipologie recettoriali differiscono tra loro in termini di profili di espressione cellulare, affinità per i mediatori e meccanismi di trasduzione. In particolare, TNF-R1 è generalmente espresso in maniera costitutiva, si può trovare localizzato virtualmente in qualunque tipo di cellula, ad eccezione degli eritrociti, può legarsi con elevata affinità a sTNF e tmTNF, ma mostra un'affinità preferenziale di legame per sTNF. In linea con questo concetto, i risultati di vari studi in vitro mostrano che la maggior parte delle azioni biologiche dell'sTNF è mediata dal recettore TNF-R1 (Ksontini et al., 1998). D'altra parte, TNF-R2 è generalmente espresso in maniera inducibile (cioè in risposta a specifici stimoli biologici), si trova localizzato soprattutto sulle cellule endoteliali ed emopoietiche, può legare con elevata affinità sia sTNF che tmTNF, ma mostra affinità di legame preferenziale per tmTNF (Grell et al., 1995), e si ritiene che tmTNF svolga la maggior parte delle proprie azioni pro-infiammatorie per mezzo del recettore TNF-R2 (Tracey et al., 2008).

Un aspetto peculiare di TNF-R1 e TNF-R2 è rappresentato dal fatto che essi possono essere rimossi (clivati) dalla membrana cellulare per mezzo di enzimi e liberati come forme molecolari solubili nei fluidi degli spazi interstiziali e nel circolo ematico. Per esempio, è stato osservato che l'attivazione del recettore TNF-R1 può indurre l'attivazione dell'enzima TACE, il quale cliva la porzione extracellulare di TNF-R2, liberandola nei fluidi interstiziali e nel sangue sotto forma di recettore solubile (sTNF-R2) (Higuchi & Aggarwal, 1994). È stato dimostrato inoltre che le forme circolanti di TNF-R1 e TNF-R2 sono in grado di legare e complessare la forma solubile di TNF e, in questo senso, si ritiene che i recettori circolanti si

comportino come veri e propri bloccanti naturali (antagonisti) del loro mediatore in forma solubile (sTNF) (Kozuch & Hanauer, 2006; Tracey et al., 2008). A questo riguardo è interessante notare che nei pazienti con artrite reumatoide sono state riscontrate concentrazioni elevate di sTNF-R1 e di sTNF-R2 ed è stato suggerito che le frazioni circolanti dei recettori del TNF possano essere considerati come marcatori dell'attività della malattia (Roux-Lombard et al., 1993).

L'interazione molecolare tra tmTNF o sTNF e i rispettivi recettori localizzati sulla membrana delle cellule bersaglio determina l'attivazione di tali recettori. Questi, una volta stimolati, inducono l'attivazione di meccanismi di trasduzione (*signaling*) i quali, modulando sistemi molecolari intracellulari complessi, promuovono l'induzione di risposte biologiche rilevanti per il controllo della proliferazione, differenziamento e morte cellulare, nonché dell'oncogenesi, dell'immunità, dell'infiammazione e dello stress. In questo contesto, è interessante notare che, rispetto alla forma solubile, il TNF di membrana, proprio a causa di questa sua localizzazione, oltre ad attivare i processi di *signaling*, sopra menzionati, può mediare anche processi che vanno nella direzione opposta, denominati *reverse signaling* (Horiuchi et al., 2010; Taylor, 2010). Ciò può avvenire quando, nel contesto di una reazione infiammatoria o immunitaria, due cellule vengono in contatto giustapponendo le loro rispettive superfici. In questo caso, se da un lato il tmTNF, localizzato sulla superficie di una delle due cellule, può stimolare i recettori espressi sulla superficie della cellula bersaglio, evocando risposte biologiche pro-infiammatorie da parte di quest'ultima (*signaling*), dall'altro lato i recettori espressi sulla cellula bersaglio possono indurre l'attivazione del TNF espresso sulla membrana della cellula giustapposta, la quale risponde con l'attivazione di meccanismi molecolari (*reverse signaling*), in grado di evocare risposte anti-infiammatorie/immuno-modulatrici, quali la soppressione dell'attività proliferativa dei linfociti T, la riduzione o soppressione della biosintesi e liberazione di citochine pro-infiammatorie e la morte cellulare apoptotica. In particolare, a livello molecolare, è stato dimostrato che l'interazione di tm-TNF

con specifici ligandi può stimolare la fosforilazione di residui di serina in corrispondenza dell'estremità citoplasmatica del tmTNF, cui fa seguito la trasduzione di segnali nella cellula che esprime il tmTNF (Watts et al., 1999; Horiuchi et al., 2010). Studi sui monociti isolati hanno evidenziato che il *reverse signaling* attivato dal tmTNF può essere mediato da incrementi delle concentrazioni di calcio intracellulare e conseguente attivazione delle chinasi p38, MAPK ed ERK (Eissner et al., 2004). Inoltre, processi controllati di proteolisi intramembranaria del tmTNF, mediati a livello delle cellule dendritiche dall'attivazione delle proteasi *signal peptide peptidase-like*, sono in grado di clivare il tmTNF e di liberare nel citoplasma una porzione del suo dominio intracellulare che, a sua volta, promuove l'attivazione di processi di *reverse signaling* [Friedman et al., 2006]. Nell'insieme, le conoscenze attuali suggeriscono quindi che il TNF di membrana possa comportarsi sia come mediatore, capace di trasdurre segnali molecolari verso specifici recettori, che come recettore esso stesso, in grado di ricevere segnali inversi e di trasmetterli alla cellula sulla quale si trova localizzato (Tracey et al., 2008; Thalayasingam & Isaacs, 2011).

4. Anticorpi: proprietà molecolari e biologiche

Poiché l'anticorpo è una molecola complessa, in grado di svolgere funzioni biologiche differenti con le diverse regioni molecolari presenti nella sua struttura, è opportuno fare, molto concisamente, alcune considerazioni in merito alle proprietà biologiche che connotano i diversi domini molecolari dell'anticorpo.

La molecola di un anticorpo è tipicamente costituita da due catene pesanti (H) legate tra loro e due catene leggere (L) legate ciascuna ad una catena pesante. Nell'insieme, l'organizzazione spaziale della molecola anticorpale dà luogo alla formazione di una sorta di Y, dove lo stelo prende il nome di regione Fc, e i due rami sono denominati regioni Fab. Le due regioni Fab sono connesse alla regione Fc tramite una struttura intermedia, denominata 'regione cerniera' (*hinge region*). Ciascuna regione Fab contiene due domini variabili (V_L e

V_H) e due domini costanti (C_{H1} e C_L). La regione Fc, glicosilata, è costituita da due domini C_{H2} e due domini C_{H3}. Ciascuno di questi domini ha proprietà biologiche diverse. In particolare, i domini V_H-V_L sono in grado di riconoscere e legare in maniera specifica l'antigene; i domini C_{H1}-C_{H2}-C_{H3} sono coinvolti nei processi di citotossicità anticorpo-dipendente (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC); i domini C_{H2}-C_{H3} sono necessari per i processi di citotossicità legati all'attivazione del complemento da parte del complesso antigene-anticorpo (*complement-dependent cytotoxicity*, CDC). Grazie a questa struttura tridimensionale, un singolo anticorpo può legare due molecole dello stesso antigene simultaneamente tramite le due regioni Fab (legame bivalente). La regione Fc non è coinvolta nel riconoscimento dell'antigene, ma può svolgere funzioni diverse grazie alla sua capacità di interagire con recettori specifici, che sono localizzati sulla superficie delle membrane cellulari e che sono stati classificati in due tipi distinti, denominati Fc-Rn ed Fc γ -R (a sua volta rappresentato da tre sottotipi, designati come I, II e III (Woof & Burton, 2004; Taylor et al., 2010; Thalayasingam and Isaacs, 2011)).

Il recettore Fc-Rn è espresso in maniera predominante sulla superficie delle cellule endoteliali dei vasi sanguigni. Esso consente agli anticorpi di aderire alla superficie interna dei vasi, di rimanere adesi all'endotelio per un certo intervallo di tempo e successivamente di liberarsi per tornare in circolo in forma attiva. In questo senso, l'endotelio vascolare si comporta come una sorta di deposito che può restituire gli anticorpi al sangue in forma attiva, consentendo di prolungare l'emivita di permanenza in circolo degli anticorpi stessi (Thaylor et al., 2010; Thalayasingam & Isaacs, 2011).

I recettori di tipo Fc γ -R sono presenti soprattutto nei leucociti e in altri tipi di popolazioni cellulari e, una volta attivati dal legame con la regione Fc dell'anticorpo, possono mediare importanti funzioni biologiche, quali la fagocitosi, la modulazione della produzione di citochine o anticorpi, la citotossicità complemento-dipendente, la citotossicità anticorpo-

dipendente e i processi di degranulazione dei granulociti o dei mastociti (Thalayasingam & Isaacs, 2011; Albanesi & Daeron, 2012).

5. Farmaci anti-TNF

5.1. Struttura molecolare

I farmaci anti-TNF sono molecole proteiche complesse, ottenute tramite la tecnologia del DNA ricombinante, le quali riproducono per intero la classica struttura molecolare di un anticorpo (infliximab, adalimumab, golimumab) o contengono nella loro struttura frammenti molecolari di origine anticorpale (etanercept, certolizumab) (Tabella 2).

La conoscenza delle funzioni biologiche associate ai diversi domini molecolari presenti nella molecola degli anticorpi consente di comprendere le analogie o le differenze strutturali che intercorrono tra i farmaci anti-TNF (Tabella 2). In particolare, infliximab, adalimumab e golimumab hanno in comune la caratteristica di essere anticorpi monoclonali completi appartenenti alla classe delle immunoglobuline di tipo G1 (IgG1). Come tali, queste tre molecole condividono anche il peso molecolare, pari a circa 150 kDa, la presenza di una regione Fc completa, la capacità di legare sia sTNF che tmTNF, e la capacità di legare il TNF in maniera bivalente, con formazione di complessi ‘antigene-anticorpo’ multimerici, dove molecole diverse di TNF possono essere legate dalla stessa molecola di anticorpo monoclonale anti-TNF (Taylor et al., 2010; Thalayasingam & Isaacs, 2011). Tuttavia, è importante ricordare che adalimumab e golimumab sono due anticorpi completamente umani (ovvero, le strutture polipeptidiche che compongono la loro struttura sono tutte di origine umana), mentre infliximab è un anticorpo chimerico, composto da strutture polipeptidiche di origine murina (circa 25%) a livello dei domini variabili delle due regioni Fab, deputate al riconoscimento e al legame del TNF, e per la restante parte (domini costanti delle regioni Fab e regione Fc) da strutture polipeptidiche di origine umana (circa 75%) (Taylor et al., 2010; Thalayasingham et al., 2011).

Etanercept è caratterizzato anch'esso una struttura a 'Y' simile a quella dell'anticorpo, ma con una fondamentale differenza. Esso è infatti una proteina di fusione, costituita dalla regione Fc di una IgG1 di origine umana, alla quale, per mezzo di una regione cerniera, sono state agganciate due strutture rappresentate dalla regione extracellulare del recettore TNF-R2 umano. Anche etanercept ha un peso molecolare di circa 150 kDa ed è in grado di legare sia sTNF che tmTNF (Tabella 2). Tuttavia, a differenza di infliximab, adalimumab e golimumab, etanercept, pur essendo dotato di una struttura tridimensionale simile a quella degli anticorpi, contrae con il TNF legami di tipo monovalente, con formazione di complessi 'antigene-anticorpo' dimerici. E' stato infatti osservato che una sola molecola di etanercept può legare una sola molecola di TNF (rapporto stechiometrico di legame 1:1), poiché i due domini del recettore TNF-R2, inseriti sul frammento Fc di etanercept, possono legare solo due monomeri della stessa molecola di TNF, probabilmente a causa di una scarsa flessibilità della regione cerniera di etanercept (Thalayasingham et al., 2011).

La struttura di certolizumab pegol è costituita da una singola regione Fab di un anticorpo monoclonale anti-TNF di tipo IgG1 legata in maniera covalente, per mezzo di una singola regione cerniera modificata, a due catene di polietilenglicole (PEG) del peso di 20 kDa ciascuna, allo scopo di aumentarne la massa molecolare e, di conseguenza, l'emivita plasmatica (Weir et al., 2006). I due domini variabili presenti nella struttura di certolizumab, in grado di legare sia sTNF che tmTNF, non sono completamente di origine umana, ma contengono nella loro struttura sequenze murine nella proporzione di circa il 10% rispetto alla quota di origine umana (regione variabile umanizzata). Contenendo una singola regione Fab anticorpale, certolizumab non è dotato di regione Fc e interagisce con il TNF in maniera monovalente (Tabella 2). Ciò significa che il legame tra TNF e certolizumab dà luogo alla formazione di complessi 'antigene-anticorpo' dimerici, nei quali una sola molecola di certolizumab può interagire in rapporto 1:1 con un solo monomero della molecola di TNF (Taylor, 2010; Thalayasingam & Isaacs, 2011).

5.2. Differenze farmacodinamiche

I dati della letteratura suggeriscono che le differenze farmacodinamiche più rilevanti, riscontrabili all'interno della classe dei farmaci anti-TNF, possano essere ricondotte a sei categorie principali: 1) affinità e cinetica di legame con il TNF; 2) specificità della neutralizzazione del TNF; 3) capacità di stabilire legami bivalenti o monovalenti con il TNF; 4) capacità di attivare processi di *reverse signaling*; 5) capacità di indurre apoptosi; 6) capacità di interagire con i recettori Fc γ -R (Rigby, 2007; Taylor, 2010). Le principali differenze farmacodinamiche dei farmaci anti-TNF sono riportate in maniera sinottica nella Tabella 2. A questo riguardo, è utile notare che i dati disponibili sulle proprietà farmacodinamiche di golimumab sono molto limitati.

5.2.1. *Affinità e cinetica di legame con il TNF*

La maggior parte degli studi volti a saggiare l'affinità e la cinetica (*binding*) con cui i farmaci anti-TNF (ligandi) interagiscono con il TNF sono stati condotti per mezzo della metodologia *BIAcore surface plasmon resonance* che consente di misurare la velocità con cui un determinato ligando si lega (*on-rate*) e si dissocia (*off-rate*) dal proprio bersaglio molecolare. Il rapporto tra questi due parametri permette di determinare l'affinità di legame del ligando per il bersaglio, e questa viene generalmente espressa come costante di dissociazione (K_d) (Tracey et al., 2008). Gli studi svolti in questo contesto hanno mostrato che tutti i farmaci anti-TNF si legano a sTNF con alta affinità, come dimostrato dai rispettivi valori di K_d che sono tutti inferiori al livello della nanomolarità. Tuttavia sono state riscontrate importanti differenze tra i farmaci anti-TNF in merito alle loro cinetiche di legame e di dissociazione dal TNF. In particolare, i primi studi hanno evidenziato che infliximab e adalimumab sono caratterizzati da velocità di legame e di dissociazione dal TNF più lente rispetto ad etanercept (Santora et al., 2001; Scallon et al., 2002). Successivamente, è stato confermato che la velocità di legame di etanercept è circa due volte più alta rispetto a quella

stimata per infliximab o adalimumab, mentre le velocità di dissociazione di questi tre farmaci sono risultate simili (Kaymakcalan et al., 2006-a). Secondo alcuni autori, queste differenze possono essere attribuite alla capacità di infliximab ed etanercept di riconoscere e di legarsi ad epitopi diversi sulla superficie di sTNF (Scallon et al., 2002).

Sebbene tutti i farmaci anti-TNF abbiano in comune la proprietà di bloccare l'interazione tra tmTNF e i recettori TNF-R1/R2 espressi su varie popolazioni cellulari, alcuni studi hanno evidenziato differenze in merito alla capacità dei farmaci anti-TNF di interagire con la forma di membrana del TNF. Secondo alcuni autori l'affinità di legame di infliximab o adalimumab a tmTNF è 3 volte più elevata rispetto ad etanercept (Santora et al., 2001; Scallon et al., 2002). Altri hanno osservato che infliximab, adalimumab e certolizumab neutralizzano con potenza simile i segnali di trasduzione mediati dal tmTNF, mentre etanercept sembra essere circa 2 volte meno potente rispetto agli altri farmaci anti-TNF (Nesbitt et al., 2007). Tali differenze sembrano dipendere da rapporti di tipo stechiometrico, piuttosto che da differenze di affinità, come suggerito dal fatto che fino a 3 molecole di infliximab possono legarsi ad 1 molecola di tmTNF, mentre l'etanercept generalmente si lega in un rapporto di 1:1 (vedere sezione 5.2.3). Le diverse modalità con cui i farmaci anti-TNF interagiscono con il tmTNF potrebbero dipendere anche dalle variazioni di espressione di tmTNF sulle superfici cellulari. Infatti, l'espressione a bassa densità del tmTNF sulla superficie cellulare potrebbe favorire, preferenzialmente, il legame di infliximab, adalimumab ed etanercept a singole molecole di tmTNF. Per contro, l'espressione di tmTNF ad alta densità sulle membrane cellulari potrebbe favorire legami di tipo multimerico tra tmTNF e infliximab o adalimumab, ma non etanercept (legame con modalità *cross-link*: vedere sezione 5.2.3) (Tracey et al., 2008).

5.2.2. Neutralizzazione di TNF: specificità

Tutti i farmaci anti-TNF hanno in comune la proprietà di legare le forme trimeriche di sTNF e tmTNF e di neutralizzare le loro funzioni biologiche. Questo rappresenta il

meccanismo principale alla base delle azioni farmacologiche dei farmaci anti-TNF (Tracey et al., 2008; Taylor et al., 2010; Ueda et al., 2013). Tuttavia, studi condotti su infliximab hanno evidenziato che questa molecola, oltre a legare le forme trimeriche e biologicamente attive di TNF (sTNF e tmTNF), possiede anche la capacità di interagire con la forma monomera solubile, cioè circolante, di TNF. Sebbene si ritenga che la forma monomera del TNF sia priva di attività biologica, è noto anche che i monomeri del TNF possono aggregarsi in circolo per dare luogo alla forme trimeriche (sTNF), biologicamente attive. In questo senso, la capacità dell'infliximab di neutralizzare i monomeri circolanti del TNF può avere ricadute terapeutiche favorevoli, poiché il legame di tali monomeri con l'infliximab impedisce loro di formare trimeri attivi (sTNF) che potrebbero contribuire a mantenere e favorire la progressione dei processi infiammatori. La capacità di legare la forma monomera solubile di TNF non è condivisa da etanercept e non è nota per certolizumab, ma si ritiene che possa essere anche una caratteristica comune ad adalimumab e golimumab (Flood, 2008).

A differenza degli altri farmaci anti-TNF, solo etanercept possiede la capacità di legare e neutralizzare le linfotossine (in particolare, sLT α 3 e tmLT α 2 β 1), poiché esso è l'unico a contenere nella propria struttura molecolare le sequenze del recettore TNF-R2, che mostra affinità per le linfotossine. Alcuni studi suggeriscono che l'affinità di legame di etanercept per sLT α 3 sia simile all'affinità per sTNF (Scallon et al., 2002; Tracey et al., 2008). Le possibili conseguenze cliniche di questa peculiarità di etanercept sono oggetto di discussione. Di fatto, non è stato finora stabilito se le linfotossine svolgano un ruolo significativo nella patogenesi delle malattie infiammatorie immuno-mediate e, in ogni caso, il loro coinvolgimento appare minore rispetto a quello del TNF (Tracey et al., 2008). Pertanto, secondo alcuni autori, in presenza di elevati livelli di linfotossine, l'eccesso di legame di etanercept alle linfotossine potrebbe impedire al farmaco di neutralizzare efficacemente il TNF (competizione tra TNF e linfotossine per il legame con il farmaco), con conseguenze negative sul controllo della

malattia infiammatoria (Thalayasingam & Isaacs, 2011). Secondo i risultati ottenuti da alcuni autori, il legame delle linfotossine da parte di etanercept potrebbe avere invece conseguenze terapeutiche vantaggiose. Infatti è stato osservato che per mezzo di tale interazione etanercept, ma non adalimumab, promuove una riduzione del numero di linfociti B della memoria immunitaria a livello del sangue periferico, delle biopsie tonsillari, delle cellule dendritiche follicolari e dei centri germinativi dei tessuti linfoidei di pazienti con artrite reumatoide, con possibili conseguenze positive sul decorso di tale patologia (Anolik et al., 2008).

5.2.3. *Interazione monovalente o bivalente con il TNF*

Per quanto riguarda la complessità del legame tra TNF e farmaci anti-TNF, come già accennato (vedere sezione 5.2.1), i farmaci anti-TNF dotati di struttura anticorpale completa (infliximab, adalimumab, golimumab) sono in grado di formare con il TNF legami di tipo bivalente. In particolare, dal punto di vista dell'interazione molecolare, gli scenari che si possono delineare con gli anticorpi monoclonali anti-TNF sono i seguenti: a) una singola molecola di sTNF o tmTNF può essere simultaneamente legata da un massimo di tre molecole anticorpali (ovvero, ciascuno dei tre monomeri presenti nella molecola del TNF viene legato da una molecola distinta di anticorpo anti-TNF); b) due monomeri della stessa molecola di TNF possono essere legati simultaneamente dalla stessa molecola di anticorpo anti-TNF; c) due molecole distinte di TNF possono essere simultaneamente legate dalla stessa molecola di anticorpo anti-TNF (*cross-link*: ovvero, lo stesso anticorpo anti-TNF lega due monomeri localizzati su due molecole distinte di TNF); in questo caso, le due molecole di TNF possono essere entrambe solubili (sTNF), entrambe espresse sulla membrana cellulare (tmTNF), oppure una solubile e una di membrana (Tracey et al., 2008).

A differenza di quanto illustrato per gli anticorpi anti-TNF, una singola molecola di etanercept, pur avendo una struttura molecolare potenzialmente bivalente, riconosce una singola molecola di TNF (solubile o di membrana). In altri termini, nell'ambito della stessa

molecola di TNF, i siti di *binding* di due monomeri vengono legati dai due domini del recettore TNF-R2 presenti nella stessa molecola di etanercept, mentre il sito di *binding* del terzo monomero rimane libero. Ciò significa che etanercept, pur essendo virtualmente bivalente, si comporta di fatto come un ligando monovalente, in grado di legare una sola molecola di TNF (rapporto stechiometrico 1:1) (Scallon et al., 2002). La stessa modalità di legame si realizza nell'interazione tra etanercept e linfotossine, sia per la forma solubile LT α 3 che per la forma di membrana LT α 2 β 1. Nel caso del certolizumab, che è un frammento anticorpale Fab monovalente, il legame si realizza tra farmaco anti-TNF e un solo monomero presente nella forma solubile o di membrana del TNF (Rigby, 2007; Taylor, 2010).

E' importante sottolineare che la proprietà della bivalenza consente agli anticorpi monoclonali anti-TNF (infliximab, adalimumab) di legare il tmTNF con maggiore efficienza rispetto a quanto osservato con etanercept (Scallon et al., 2002). La stessa proprietà consente ai farmaci suddetti di formare anche complessi multimerici che contengono varie molecole di sTNF e che hanno pesi molecolari compresi tra 600 e 5.000 per adalimumab e infliximab. Nel caso di adalimumab la formazione dei complessi multimerici più stabili si ottiene intorno al peso molecolare di 600 kDa, corrispondente a tre molecole di adalimumab che legano tre molecole omotrimeriche del sTNF (Suffredini et al., 1995; Arora et al., 2009).

E' stato osservato che la velocità di *clearance* dal circolo ematico dei complessi molecolari formati dai farmaci anti-TNF con il TNF può variare in relazione alla natura dei complessi che si formano. Per esempio, in topi transgenici che iperesprimono TNF umano, i complessi tra etanercept e TNF sono rimasti in circolo per settimane, mentre, al contrario, i complessi formati da infliximab o adalimumab con il TNF subiscono una *clearance* più rapida (Tracey et al., 2008). In linea con queste osservazioni, nei pazienti trattati con etanercept i complessi molecolari tra TNF ed etanercept sono rimasti in circolo per lunghi periodi di tempo (Suffredini et al., 1995; Taylor, 2010).

Nell'insieme, i dati disponibili indicano che la capacità differenziale dei farmaci anti-TNF di stabilire legami bivalenti o monovalenti con il TNF e, conseguentemente, di dare luogo alla formazione di complessi farmaco-TNF di grandi o piccole dimensioni, influenza in maniera significativa l'attività farmacodinamica dei farmaci anti-TNF. Infatti, la capacità degli anticorpi monoclonali (infliximab, adalimumab) di interagire in maniera bivalente con sTNF e di generare complessi 'antigene-anticorpo' multimerici di elevate dimensioni si traduce in una elevata stabilità dei complessi anticorpo-sTNF. Questa condizione facilita una rapida rimozione dei complessi anticorpo-sTNF dal circolo ematico (*clearance*), e determina anche una lenta velocità di dissociazione del sTNF dall'anticorpo monoclonale. Come conseguenza, sTNF, una volta intrappolato nei complessi con l'anticorpo anti-TNF ha una probabilità molto scarsa di ritornare in circolo in forma attiva e di riacquisire la propria attività pro-infiammatoria. Per contro, la capacità di etanercept e certolizumab di interagire in maniera monovalente con il TNF comporta la formazione di complessi farmaco-sTNF di piccole dimensioni, che sono caratterizzati da una minore stabilità, una più lenta velocità di rimozione dal circolo ematico, una più elevata velocità di dissociazione di sTNF dal farmaco anti-TNF, e una minore propensione ad evocare processi di *reverse signaling* in seguito ad interazione con il tmTNF (vedere Sezione 4.2.3.) (Rigby, 2007; Taylor, 2010).

5.2.4. *Reverse signaling*

I risultati di alcuni studi sperimentali suggeriscono che l'interazione con il tmTNF conferisca ad alcuni farmaci anti-TNF la capacità di attivare processi di *reverse signaling*, 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 tmTNF (Tracey et al., 2008) (vedere Sezione 3.3). Questa proprietà non sembra essere condivisa in maniera simile tra tutti i farmaci anti-TNF, e appare connessa soprattutto alla loro capacità di formare legami bivalenti e complessi multimerici nei quali ciascuna

molecola di farmaco anti-TNF lega molecole diverse di tmTNF (*crosslink*). Su tali basi, il processo di *reverse signaling* può essere attivato prevalentemente e più facilmente dagli anticorpi monoclonali infliximab, adalimumab e golimumab, e in misura minore da etanercept o certolizumab, che possono legare una sola molecola di tmTNF (Rigby et al., 2007; Taylor et al., 2010).

La capacità differenziale dei farmaci anti-TNF di attivare i meccanismi di *reverse signaling* e, conseguentemente, di modulare la produzione di citochine pro-infiammatorie è stata documentata da numerosi studi sperimentali (Scallon et al., 2002; Kirchner et al., 2004; Mitoma et al., 2005; Shen et al., 2005; Nesbitt et al., 2007). In uno studio condotto su una linea cellulare monocitaria caratterizzata dall'espressione di tmTNF, Kirchner et al. (2004) hanno condotto una serie di esperimenti per valutare la capacità di infliximab ed etanercept di attivare il meccanismo di *reverse signaling* e di modulare l'attività pro-infiammatoria indotta dal lipopolisaccaride (LPS). In queste condizioni sperimentali, infliximab ha inibito la liberazione di sTNF e interleuchina-1 β (IL-1 β) stimolata dal lipopolisaccaride, mentre etanercept non ha svolto effetti significativi su questi due fattori infiammatori. Analogamente, sia adalimumab che infliximab hanno inibito l'azione pro-infiammatoria indotta da LPS su monociti umani, mentre etanercept non ha svolto alcun effetto (Shen et al., 2005). In un altro studio, svolto su linfociti T isolati, infliximab ed etanercept hanno indotto l'attivazione di tmTNF, con conseguente aumento dell'espressione di selettina E, una proteina che svolge un ruolo predominante nelle fasi iniziali dell'adesione delle cellule immunitarie circolanti all'endotelio vascolare a livello dei siti tissutali infiammati. Tuttavia, nelle stesse condizioni sperimentali, infliximab, ma non etanercept, ha bloccato la proliferazione dei linfociti inducendo un arresto del ciclo cellulare in fase G0/G1, suggerendo che l'interazione di tipo monovalente dell'etanercept con tmTNF è sufficiente ad indurre l'espressione di selettina E, ma non a sopprimere la proliferazione cellulare (Mitoma et al., 2005). I dati ottenuti in uno studio, condotto da Nesbitt et al. (2007) su cellule leucocitarie isolate dal sangue periferico di

soggetti sani, sostengono tuttavia solo in parte il concetto che la capacità di evocare risposte cellulari tramite meccanismi di *reverse signaling* sia una prerogativa esclusiva dei farmaci anti-TNF in grado di formare legami bivalenti con il TNF. In questo studio, in un test sulla liberazione di IL-1 β da parte di monociti stimolati con LPS, certolizumab ha esercitato un effetto inibitore simile a quello di infliximab e adalimumab, mentre etanercept ha mostrato un'attività inibitrice parziale, suggerendo che anche i farmaci anti-TNF caratterizzati da legame monovalente possono, sia pure in parte, attivare processi di *reverse signaling*.

5.2.5. Apoptosi

L'apoptosi (morte cellulare programmata) è un processo fisiologico, coinvolto nei meccanismi di regolazione del ricambio cellulare, della tolleranza immunitaria in condizioni normali, e del controllo delle risposte immunitarie contro gli agenti patogeni. In alcune malattie infiammatorie immuno-mediate, quali l'artrite reumatoide e la malattia di Crohn, è stata osservata una riduzione della frequenza di apoptosi nei tessuti infiammati, ed è stato ipotizzato che questa condizione sia essa stessa causa di mantenimento dello stato infiammatorio cronico (Sands, 2004; Tak, 2005).

Nei pazienti con malattie infiammatorie immuno-mediate che rispondono favorevolmente alla terapia con farmaci anti-TNF, la remissione del processo patologico si associa generalmente ad una rapida riduzione della densità di cellule immuno-infiammatorie nelle sedi tissutali dell'infiammazione. Tuttavia non è stato chiarito se, e in quale misura, questo effetto dipenda dalla capacità dei farmaci anti-TNF di indurre apoptosi o citotossicità, o dalla modulazione dei meccanismi che regolano la chemiotassi e la migrazione cellulare (Taylor, 2010). In questo contesto, i farmaci anti-TNF potrebbero indurre apoptosi dei macrofagi e dei linfociti per mezzo di due meccanismi distinti: 1) in seguito alla neutralizzazione di sTNF un farmaco anti-TNF può privare le cellule dei segnali biochimici di sopravvivenza mediati dai recettori TNF-R1 (Baud e Karin, 2001); questo meccanismo potrebbe essere rilevante nella

terapia delle IBD con farmaci anti-TNF, dal momento che la resistenza delle cellule T all'apoptosi sembra svolgere un ruolo significativo nella patogenesi (Peppelenbosch e Van Deventer, 2004); 2) i farmaci anti-TNF anticorpali bivalenti possono indurre apoptosi delle cellule produttrici di TNF tramite la formazione di complessi multimerici e la conseguente attivazione del *reverse signaling* mediato dal tmTNF (Taylor, 2010). L'attivazione di questo secondo meccanismo da parte di infliximab e adalimumab è stata documentata tramite esperimenti in vitro condotti su linfociti e monociti umani isolati da sangue periferico e attivati (Kirchner et al., 2004; Nesbitt et al., 2007; Mitoma et al., 2008). In condizioni sperimentali simili è stato di recente osservato che golimumab, malgrado la sua potenzialità di interagire in maniera bivalente con tmTNF, induce l'apoptosi con minore efficacia rispetto a infliximab e adalimumab (Ueda et al., 2013). Certolizumab non è invece in grado di indurre apoptosi, coerentemente con la circostanza che questo farmaco lega il tmTNF in maniera monovalente e non dà luogo alla formazione di complessi multimerici (Nesbitt et al., 2007). Per contro, negli stessi studi, etanercept ha indotto l'apoptosi con intensità variabile (effetto simile a infliximab: Kirchner et al., 2004; effetto minore rispetto a infliximab e adalimumab: Nesbitt et al., 2007; assenza di effetto: Mitoma et al., 2008), suggerendo che il *cross-link* di tmTNF, nell'ambito di complessi multimerici generati dagli anticorpi monoclonali anti-TNF, non rappresenta l'unico meccanismo tramite cui i farmaci anti-TNF possono evocare la morte cellulare apoptotica o ridurre la densità cellulare a livello dei siti tissutali infiammati. A sostegno di questa ipotesi, uno studio condotto più di recente su pazienti con artrite reumatoide ha suggerito che l'aumento dell'efflusso di cellule infiammatorie dalla sinovia può rappresentare un importante meccanismo alla base dell'efficacia dei farmaci anti-TNF, molto probabilmente sostenuto da una riduzione dell'espressione delle molecole di adesione (Herenius et al., 2011).

A livello clinico il rapporto fra trattamento con farmaci anti-TNF e induzione di apoptosi è stato valutato su cellule del sangue periferico e biopsie ottenute da pazienti con malattia di

Crohn, artrite reumatoide e psoriasi. Nella malattia di Crohn è stato osservato un aumento dei processi apoptotici nelle sezioni di tessuto intestinale a distanza di 24 ore (Ten Hove et al., 2002) e di 28 giorni (Di Sabatino et al., 2004) dal trattamento con infliximab. Alcuni studi hanno valutato l'apoptosi in pazienti con artrite reumatoide dopo trattamento con infliximab o etanercept. In uno studio è stata evidenziata una riduzione della densità cellulare nella sinovia a distanza di 48 ore dalla somministrazione di infliximab, ma non è stato osservato un aumento delle cellule apoptotiche (Smeets et al., 2003). Per contro, in uno studio successivo è stata osservata l'induzione di apoptosi nei macrofagi sinoviali, ma non nei linfociti, dopo trattamento sia con infliximab che con etanercept (Catrina et al., 2005). Anche gli studi sulla psoriasi hanno fornito risultati discordanti. Infatti, dopo somministrazione di infliximab è stata osservata l'induzione di apoptosi nei cheratinociti, linfociti e cellule dendritiche nelle placche psoriasiche (Malaviya et al., 2006a). In un altro studio su pazienti con psoriasi, il trattamento con etanercept per circa 1 mese è stato seguito da un incremento dell'induzione di caspasi-3 nelle cellule mieloidi dendritiche del derma (Malaviya et al., 2006b). Tuttavia, un terzo studio su biopsie cutanee e sinoviali da pazienti con artrite psoriasica, dopo 48 ore dal trattamento con etanercept, non ha evidenziato alcun incremento rilevante di apoptosi in entrambi i siti tissutali (Goedkoop et al., 2004). Nell'insieme quindi, sulla base delle evidenze disponibili, l'importanza dell'apoptosi nell'azione terapeutica svolta dai farmaci anti-TNF nelle malattie infiammatorie immuno-mediate rimane un punto ancora da chiarire.

5.2.6. Interazione con i recettori Fc γ -R

Alcune differenze tra i farmaci anti-TNF dipendono dalla presenza o assenza della regione Fc nella loro struttura molecolare. Questo aspetto è rilevante soprattutto in merito alla capacità di alcuni farmaci anti-TNF di indurre in maniera differenziale processi di citotossicità anticorpo-dipendente e/o di citotossicità complemento-dipendente. Nei macrofagi e nei linfociti NK la citotossicità anticorpo-dipendente può essere attivata in seguito

all'interazione dei recettori Fc γ R espressi sulla membrana cellulare con i domini C_H2 presenti nella regione Fc di diverse molecole anticorpali legate alla superficie cellulare. Questa interazione promuove un legame di tipo *cross-link* dei recettori Fc γ R che, a sua volta, attiva processi enzimatici in grado di innescare la lisi cellulare. La citotossicità complemento-dipendente può invece essere attivata dal legame del fattore C1q al dominio C_H2 della regione Fc degli anticorpi legati alla superficie cellulare. In particolare, i legami di tipo *cross-link* che si instaurano tra le molecole di C1q e le regioni Fc degli anticorpi legati alla superficie cellulare danno l'avvio alla cascata di attivazione del complemento, inducendo la formazione del complesso di attacco cellulare, che, a sua volta, provoca la formazione di pori abnormi sulla membrana e l'attivazione del processo di lisi cellulare (Tracey et al., 2008).

Infliximab, adalimumab e golimumab sono dotati di una regione Fc completa, e pertanto essi possono interagire con i recettori Fc γ -R e attivare tutti gli effetti Fc-dipendenti, tra i quali la citotossicità anticorpo-dipendente e la citotossicità complemento-dipendente (Thalayasingam et al., 2011; Ueda et al., 2013). Etanercept è anch'esso dotato della regione Fc, ma non possiede il dominio C_H1, in quanto è privo delle due regioni Fab. Etanercept è quindi in grado di svolgere attività citotossica anticorpo-dipendente, ma, secondo alcuni autori, la mancanza del dominio C_H1 non gli consente di indurre in maniera ottimale attività citotossica complemento-dipendente. È stato osservato che, in assenza di sTNF, etanercept è in grado di legare sia i recettori Fc γ -RI che Fc γ -RII espressi su una linea cellulare monocitica umana con un'affinità 2-3 volte più bassa rispetto all'affinità di infliximab o adalimumab. Inoltre è stato evidenziato che i complessi costituiti da infliximab-TNF e adalimumab-TNF si legano al fattore C1q del complemento con maggiore affinità rispetto ai complessi a base di etanercept-TNF (Kohno et al., 2007; Tracey et al., 2008). Certolizumab è completamente privo della regione Fc e, come tale, non può svolgere tutte le azioni biologiche dipendenti dalla stimolazione dei recettori Fc γ -R, tra le quali la citotossicità anticorpo- e complemento-

dipendente (Tracey et al., 2008; Mewar & Wilson, 2011). A conferma di queste affermazioni, studi in vitro hanno mostrato che infliximab, adalimumab ed etanercept sono in grado di indurre citotossicità anticorpo-dipendente nelle linee cellulari che iperesprimono tmTNF, mentre certolizumab è privo di questo effetto (Nesbitt al., 2007). Altri studi, che hanno posto a confronto la capacità dei diversi farmaci anti-TNF di attivare i processi di citotossicità complemento-dipendente e anticorpo-dipendente, hanno evidenziato che, pur condividendo tutti la capacità di interagire con tmTNF, infliximab e adalimumab sono risultati più attivi di etanercept nell'indurre i processi suddetti, mentre certolizumab è risultato privo di effetto (Nesbitt et al., 2007; Tracey et al., 2008).

5.3. Differenze farmacocinetiche

I farmaci anti-TNF differiscono marcatamente tra loro in termini di dosi, schemi di somministrazione, profili farmacocinetici (Tabella 3) e capacità di evocare la produzione di anticorpi contro sé stessi (attività immunogena), e queste differenze possono influenzare i profili di efficacia e di sicurezza di tali farmaci (Nestorov, 2005; Tracey et al., 2008). Per quanto riguarda in particolare le proprietà farmacocinetiche, le differenze più importanti tra i farmaci anti-TNF sono quelle relative alla via di somministrazione (endovenosa o sottocutanea), alla durata dell'emivita di eliminazione plasmatica, e al rapporto tra concentrazione massima e concentrazione minima (*peak-trough ratio*) del farmaco nel plasma. Secondo il paradigma della 'finestra terapeutica', le variazioni delle concentrazioni plasmatiche di un farmaco allo stato stazionario (*steady state*) dovrebbero essere mantenute entro limiti tali da risultare adeguate a neutralizzare l'eccesso di TNF, senza, allo stesso tempo, risultare troppo elevate (compromissione della sicurezza del trattamento per eccessiva inibizione del TNF e conseguente compromissione dei sistemi di difesa immunitaria) o troppo basse (compromissione dell'efficacia della terapia a causa di un'inibizione insufficiente del TNF). Pertanto, i farmaci anti-TNF dovrebbero essere somministrati in modo da ottenere

bassi valori dei *peak-trough ratio* delle loro concentrazioni plasmatiche, e da evitare escursioni al di fuori della finestra terapeutica che potrebbero aumentare il rischio di insorgenza di reazioni avverse o di perdita della loro efficacia (Nestorov, 2005; Tracey et al., 2008).

Alcuni autori, utilizzando i dati raccolti in vari studi sulle concentrazioni plasmatiche dei farmaci anti-TNF nei pazienti e applicando particolari algoritmi matematici, sono riusciti ad estrapolare i profili farmacocinetici di questi farmaci allo stato stazionario e a confrontarli. Sulla base di queste analisi è stato stimato che infliximab, essendo somministrato per via endovenosa, raggiunge picchi di concentrazione plasmatica molto elevati (118-192 mg/L), cui fanno seguito marcate riduzioni dei livelli circolanti, fino a raggiungere livelli inferiori a 1 mg/L in prossimità della somministrazione successiva. Per contro, adalimumab, golimumab, etanercept e certolizumab, essendo somministrati per via sottocutanea, raggiungono picchi di concentrazione plasmatica (rispettivamente: 4,7-7,7; 5-6; 1,1-2,4; 43-49 mg/L) che, pur essendo più bassi rispetto a quelli di infliximab, sono soggetti ad una minore fluttuazione e garantiscono concentrazioni plasmatiche più stabili tra una concentrazione e l'altra (Nestorov, 2005; Furst et al., 2006; Tracey et al., 2008).

Un parametro importante, che influisce in maniera significativa sulla durata dell'azione anti-infiammatoria dei farmaci anti-TNF, è rappresentato dal tempo di emivita plasmatica, che riflette la capacità di ciascun farmaco di permanere più o meno a lungo nel circolo ematico. A questo riguardo, per quanto i dati della letteratura siano alquanto eterogenei (infliximab, 7,7-12 giorni; adalimumab, 10-20 giorni; golimumab, 7-20 giorni; etanercept, 3-4 giorni; certolizumab, 14 giorni), etanercept risulta caratterizzato da un'emivita più breve rispetto agli altri farmaci della classe, per ragioni che, secondo alcuni autori, sembrano riconducibili alla diversa affinità di legame dei farmaci anti-TNF per i recettori Fc-Rn dell'endotelio vascolare (Rigby, 2007; Tracey et al., 2008). Infatti i farmaci anti-TNF dotati di struttura anticorpale completa (infliximab, adalimumab, golimumab) possono legarsi in maniera

reversibile ai recettori Fc-Rn, espressi sulle cellule endoteliali dei vasi ematici, e questa interazione consente un prolungamento della loro permanenza in circolo, ovvero un allungamento della loro emivita plasmatica. A questo riguardo è stato ipotizzato, ma non dimostrato in maniera conclusiva, che la regione Fc di etanercept possa interagire con i recettori Fc-Rn con un'affinità di legame inferiore rispetto a quella degli anticorpi monoclonali, e che la sua breve emivita possa dipendere in gran parte da questa caratteristica (Rigby, 2007; Thalayasingam et al., 2011). Inoltre, la mancanza di regione Fc impedisce a certolizumab di interagire con i recettori Fc-Rn dell'endotelio vascolare. Quest'ultima circostanza dovrebbe favorire la clearance ematica di certolizumab con conseguente riduzione della sua emivita plasmatica. Tuttavia, questo problema è stato superato grazie all'aggiunta di due catene di PEG, che consentono a certolizumab di permanere in circolo con un'emivita plasmatica paragonabile a quella di infliximab, adalimumab e golimumab (Thalayasingam et al., 2011).

Nestorov (2004) ha analizzato i profili farmacocinetici di infliximab, adalimumab ed etanercept con l'obiettivo di stimare tre parametri estrapolati (concentrazione minima, media e massima allo stato stazionario) che possono predire l'attività terapeutica e la sicurezza di impiego dei tre farmaci suddetti. In questa analisi, assumendo adalimumab come termine di riferimento, Nestorov (2004) ha stabilito che la concentrazione minima di infliximab allo stato stazionario raggiunge livelli troppo bassi, che rischiano di diventare terapeuticamente insufficienti verso la fine di ciascun intervallo di somministrazione. Per contro, analizzando i dati relativi alla concentrazione media allo stato stazionario, è stato evidenziato che il rischio di iper-esposizione (rischio di effetti avversi) è alto per infliximab, intermedio per adalimumab e basso per etanercept. Infine, la stima della concentrazione massima allo stato stazionario ha permesso di evidenziare per infliximab un rischio significativo di iper-esposizione, ovvero un rischio di neutralizzazione eccessiva di TNF, con conseguente rischio di complicanze infettive (Nestorov, 2004).

5.4. Differenze inerenti all'attività immunogena

I dati clinici disponibili indicano che l'impiego dei farmaci anti-TNF in pazienti naive affetti da malattie infiammatorie immuno-mediate consente di ottenere risposte terapeutiche favorevoli in circa il 60-70% dei casi. Ciò implica che la popolazione dei pazienti naive comprende un numero rilevante di individui nei quali i farmaci anti-TNF non risultano efficaci (fallimento terapeutico primario) o non sono tollerati a causa di effetti avversi gravi. Inoltre è noto che alcuni pazienti, dopo aver mostrato una buona risposta ai farmaci anti-TNF nella fase iniziale della terapia, possono perdere la sensibilità a questi farmaci nelle fasi più avanzate del trattamento (fallimento terapeutico secondario). In assenza di risposta terapeutica al primo farmaco anti-TNF utilizzato, possono essere attuate strategie alternative per tentare di recuperare l'efficacia del trattamento. Queste comprendono: a) aumento della dose senza modificazione della frequenza di somministrazione; b) aumento della frequenza di somministrazione senza aumento della dose (soprattutto nel caso dell'infliximab); c) sostituzione del primo farmaco con un altro farmaco anti-TNF; d) sostituzione con un altro farmaco dotato di meccanismo di azione differente rispetto al blocco del TNF. Tuttavia è importante notare che non sono stati al momento definiti criteri razionali per la gestione appropriata dei fallimenti terapeutici primari o secondari associati ai farmaci anti-TNF, e questo rimane un argomento di discussione molto dibattuto per le sue notevoli implicazioni sia di natura clinica che socio-economica (Chaparro et al., 2012; Vincent et al., 2013).

Le evidenze attuali suggeriscono che, tra i fattori che possono giustificare un fallimento terapeutico secondario durante trattamento con un farmaco anti-TNF, uno dei più importanti è rappresentato dalla formazione di anticorpi anti-farmaco (*anti-drug antibodies*, ADAAb) (Chaparro et al., 2012; Vincent et al., 2013). E' opportuno precisare che, in letteratura, gli ADAAb vengono anche designati come 'anticorpi antichimerici umani' (*human antichimeric antibodies*, HACA), se il loro sviluppo è indotto da farmaci biotecnologici contenenti frazioni proteiche di origine sia umana che murina (per esempio, infliximab), oppure come 'anticorpi

anti-uomo umani' (*human anti-human antibodies*, HAHA), se il loro sviluppo è indotto da farmaci biotecnologici contenenti solo frazioni polipeptidiche di origine umana (per esempio, adalimumab, golimumab). Di fatto è stato dimostrato che tutti i farmaci biotecnologici, indipendentemente dalla loro struttura proteica 'umana', 'umanizzata' o 'chimerica', hanno una certa propensione a favorire lo sviluppo di ADAbs, a causa del fatto che porzioni specifiche della loro molecola (epitopi) vengono riconosciute come estranee dal sistema immunitario dell'organismo umano (Aikawa et al., 2010).

In generale, si ritiene che la tendenza dei farmaci biotecnologici a stimolare la produzione di ADAbs sia maggiore per i farmaci che nella propria struttura contengono frazioni molecolari di origine murina, rispetto a quelli costituiti per intero da molecole di origine umana (Aikawa et al., 2010). La produzione di ADAbs può sia causare l'insorgenza di reazioni avverse di tipo immunitario che determinare la neutralizzazione degli effetti terapeutici dei farmaci biotecnologici (Cassinotti and Travis, 2009; Chaparro et al., 2012). Per quanto riguarda le reazioni avverse, è stato osservato che lo sviluppo di ADAbs specifici contro i farmaci anti-TNF è stato associato all'insorgenza di reazioni acute da infusione, che si manifestano entro 1-2 ore dalla somministrazione e comprendono febbre, nausea, respiro dispnoico e cefalea (Cassinotti and Travis, 2009). Nessuna associazione è stata invece evidenziata tra gli ADAbs rivolti contro i farmaci anti-TNF e le reazioni da ipersensibilità ritardata, che si manifestano da 3 a 12 giorni dopo l'infusione e sono caratterizzate da mialgia, artralgia, prurito, edema faciale o periferico, mal di gola (Chaparro et al., 2012). Sul versante invece dell'attività neutralizzante, gli ADAbs possono bloccare l'azione terapeutica del rispettivo farmaco anti-TNF. Infatti, gli ADAbs neutralizzanti, legandosi al farmaco, possono impedirgli di interagire con il proprio bersaglio molecolare (il TNF) (Van Schouwenburg et al., 2013) e, allo stesso tempo, ne facilitano la rimozione dal circolo ematico, con conseguente abbassamento delle concentrazioni di farmaco al di sotto dei livelli necessari per espletare l'effetto terapeutico atteso (Van der Laken et al., 2007; Vincent et al., 2013). Gli ADAbs

possono quindi interferire non solo a livello farmacocinetico, riducendo le concentrazioni attive del farmaco anti-TNF, ma anche a livello farmacodinamico, impedendo al farmaco anti-TNF di legarsi al TNF per neutralizzarlo (Vincent et al., 2013).

Alcuni studi hanno evidenziato che pazienti diversi, trattati con lo stesso farmaco biotecnologico, possono mostrare una diversa suscettibilità allo sviluppo di ADAb, a causa di un'ampia serie di fattori, che al momento sono stati solo in parte identificati o caratterizzati, e che sembrano essere rappresentati da: a) malattia di fondo; b) durata e gravità della malattia; c) terapia concomitante con farmaci immunosoppressivi (una incidenza più elevata di ADAb nella spondilite anchilosante rispetto all'artrite reumatoide può dipendere dall'uso meno frequente di immunosoppressori nella spondilite anchilosante; infatti è stato ripetutamente osservato che il trattamento concomitante con metotrexato riduce la formazione di ADAb rivolti contro i farmaci anti-TNF [Vermeire et al., 2007; Radstake et al., 2009]); d) frequenza di somministrazione (per esempio, è stato suggerito che l'ampliamento dell'intervallo che intercorre tra due somministrazioni consecutive di farmaco anti-TNF possa aumentare il rischio di sviluppo di ADAb, ma mancano evidenze solide a sostegno di questa ipotesi (Vincent et al., 2013); e) trattamenti di breve durata; f) bassa dose o bassa concentrazione del farmaco anti-TNF (il confronto di 2 studi, nei quali i pazienti con artrite reumatoide erano stati trattati con infliximab, ha evidenziato una frequenza di induzione di ADAb minore nei pazienti che erano stati trattati con alte dosi di infliximab; analogamente nella malattia di Crohn è stato osservato che la terapia di mantenimento continuativa con infliximab si associa ad una minore frequenza di sviluppo di ADAb rispetto alle modalità di trattamento di natura episodica) (Hanauer et al., 2004; Wolbink et al., 2006; Vermeire et al., 2007); g) fattori genetici (per esempio, lo sviluppo di ADAb anti-adalimumab sembra essere influenzato da polimorfismi del gene che codifica per l'interleuchina 10, IL-10 [Bartelds et al., 2009; Wolbink et al., 2009]). Allo stesso tempo è molto importante ricordare che la presenza di ADAb non può, di per sé, essere considerata una condizione necessariamente associata a

perdita o riduzione dell'efficacia del rispettivo farmaco biotecnologico, dal momento che alcuni pazienti che sviluppano ADAb contro un determinato farmaco anti-TNF mostrano una buona persistenza della risposta terapeutica al trattamento con lo stesso farmaco (Chaparro et al., 2012; Vincent et al., 2013).

Malgrado numerosi studi abbiano dimostrato che lo sviluppo di ADAb può associarsi alla perdita/riduzione dell'azione terapeutica dei farmaci anti-TNF, questi dati devono essere considerati con notevole cautela a causa principalmente di problemi di ordine metodologico legati alle tecniche utilizzate per l'identificazione e misurazione della concentrazione degli ADAb (Aikawa et al., 2010; Vincent et al., 2013). Gli ADAb possono infatti essere identificati e dosati per mezzo di metodiche diverse, alcune delle quali sono poco affidabili a causa di importanti limitazioni. I metodi ELISA (*enzyme-linked immuno-sorbent assay*), sia diretti che indiretti, se da un lato consentono di dosare numeri consistenti di campioni a costo relativamente basso, hanno una certa tendenza a generare risultati falsi positivi o a legare in maniera aspecifica molecole diverse dall'analita specifico. Due metodi più affidabili per identificare gli ADAb comprendono l'ELISA a due siti e il test di legame dell'antigene (*antigen binding test*, ABT) per mezzo di dosaggio radioimmunologico (*radioimmunoassay*, RIA). L'ELISA a due siti è molto specifico e sensibile, ma può favorire anche il dosaggio delle IgM e può non essere in grado di identificare anticorpi monovalenti di tipo IgG4 (Hart et al., 2011). La metodica ABT-RIA è in grado di identificare con elevata sensibilità e basso grado di specificità gli ADABb di tipo IgG1 e IgG4 clinicamente rilevanti, ma comporta l'uso della radioattività e questa può essere una limitazione significativa (Aarden et al., 2008). È importante sottolineare che, poiché tutti i saggi suddetti si basano sull'uso di anticorpi, l'identificazione degli ADAb può essere confusa dalla presenza di elevate concentrazioni del fattore reumatoide (FR) o del farmaco anti-TNF stesso nel siero del paziente. Il FR è costituito da anticorpi di tipo IgM che formano complessi molecolari con la regione Fc degli anticorpi di tipo IgG, in maniera tale che questi legami possono mascherare gli epitopi che

dovrebbero essere specificamente riconosciuti dagli anticorpi anti-ADAb utilizzati in questi saggi (Aarden et al., 2008). D'altra parte, la presenza del farmaco anti-TNF in un campione di siero che contiene anche ADAb contro quel farmaco può dare luogo alla formazione di complessi immuni (farmaco-ADAb) che possono causare due conseguenze negative: a) in vivo, i complessi farmaco-ADAb accelerano la clearance sia del farmaco che dell'ADAb ad esso legato; b) in vitro, i complessi farmaco-ADAb mascherano l'ADAb che non può quindi essere riconosciuto e legato dall'anticorpo anti-ADAb utilizzato nel metodo di dosaggio (Jannitski et al., 2012). Su tali basi è quindi probabile che la presenza di ADAb possa essere sottostimata dalle metodiche analitiche correntemente utilizzate, dal momento che gli ADAb possono essere identificati solo se la concentrazione molare dell'anticorpo eccede quella del farmaco anti-TNF nel siero del paziente (Wolbink et al., 2006; Hart et al., 2011). Di conseguenza, sia negli studi clinici che nella corrente pratica clinica, i test di dosaggio degli ADAb dovrebbero essere condotti prendendo in considerazione sia la dose che i tempi della somministrazione del farmaco anti-TNF, nel contesto del profilo farmacocinetico del farmaco.

Le considerazioni suddette da un lato giustificano il fatto che i dati di prevalenza degli ADAb, nei pazienti affetti da una determinata malattia immuno-mediata e trattati con un determinato farmaco anti-TNF, siano estremamente variabili in ragione delle metodologie impiegate per la loro identificazione, dall'altro lato limita in misura notevole la credibilità dei dati generati nell'ambito degli studi clinici, nei quali gli ADAb sono stati valutati per mezzo di saggi sviluppati dai produttori del farmaco, senza informazioni complete in merito alla metodologia impiegata. Tenendo presenti queste importanti limitazioni, i dati disponibili sullo sviluppo di ADAb in seguito a trattamento con specifici farmaci anti-TNF possono essere riassunti come segue (Tabella 4):

1) Infliximab è considerato il farmaco dotato di maggiore potere immunogeno tra gli anti-TNF attualmente utilizzabili, a causa del fatto che la sua molecola è costituita per il 25% da proteine di origine murina. Indipendentemente dalla patologia di fondo, i dati degli studi

clinici indicano che la percentuale di pazienti che sviluppa ADAb anti-infliximab è compresa tra 6% e 61%. Lo sviluppo di ADAb anti-infliximab generalmente si associa ad una riduzione delle concentrazioni ematiche di infliximab, con conseguente riduzione dell'efficacia clinica e aumento della frequenza di eventi avversi. Tuttavia i dati su questo punto sono discordanti. In particolare, nessun studio ha finora riportato associazioni significative tra le concentrazioni ematiche di infliximab e la presenza di ADAb anti-infliximab nell'artrite psoriasica o nella malattia di Crohn, e uno studio ha evidenziato l'assenza di associazione tra la presenza di ADAb anti-infliximab e l'efficacia clinica di questo farmaco nella malattia di Crohn (Hanauer et al., 2004; Vincent et al., 2013).

2) I dati della letteratura suggeriscono che etanercept è il farmaco dotato di minore attività immunogena nell'ambito della classe degli anti-TNF. Per quanto riguarda la struttura molecolare, l'unica frazione proteica non umana di etanercept è rappresentata dalla regione cerniera che connette i due recettori umani TNF-R2 con il frammento anticorpale umano Fc, ed è quindi tale regione cerniera ad avere la possibilità di evocare la formazione di ADAb anti etanercept. Di fatto, negli studi clinici la presenza di ADAb anti-etanercept nel siero dei pazienti trattati con questo farmaco è stata riscontrata con una frequenza compresa tra 0% e 18%. Tuttavia, tali anticorpi non sembrano svolgere attività neutralizzante (De Vries et al., 2009; Aikawa et al., 2010), e la loro presenza non è stata associata a riduzioni significative dei livelli minimi (*trough*) o dell'efficacia terapeutica di etanercept, anche in studi a lungo termine della durata di oltre 3 anni (Klareskog et al., 2011; Vincent et al., 2013).

3) Sebbene la struttura molecolare di adalimumab sia di origine completamente umana, esso può comunque indurre la formazione di ADAb, e la frequenza con cui gli ADAb anti-adalimumab vengono evidenziati nel siero dei pazienti è compresa tra 0,04% e 87%. È opportuno, tuttavia, notare, che lo studio che ha riportato una frequenza di ADAb anti-ADA dello 0,04% aveva una durata di sole 4 settimane, e che lo studio che ha evidenziato una frequenza di ADAb anti-ADA dell'87%, pur avendo una durata di 45 settimane, è stato

condotto solo su 15 pazienti (Hanauer et al., 2006; Bender et al., 2007). Alcuni studi hanno associato la presenza in circolo di ADAb anti-adalimumab con concentrazioni minime (*trough*) di adalimumab basse o non misurabili o con riduzioni della risposta terapeutica ad adalimumab (West et al., 2008; Karmiris et al., 2009; Lecluse et al., 2010; Vincent et al., 2013).

4) Analogamente ad adalimumab, anche la struttura molecolare di golimumab è di natura completamente umana, e la frequenza di formazione di ADAb anti-golimumab nei pazienti trattati con questo farmaco oscilla tra 0% e 7%. Tuttavia, la maggior parte degli studi clinici condotti su golimumab è stata di breve durata e, di conseguenza, la frequenza con cui si sono formati gli ADAb anti-golimumab è risultata così bassa da non consentire un'analisi di associazione affidabile con i livelli circolanti di golimumab e la sua efficacia clinica (Vincent et al., 2013)

5) La molecola di certolizumab pegol contiene frazioni di origine murina, nella misura del 10%, e può indurre la formazione di ADAb con una frequenza compresa tra 3% e 25%. Gli ADAb anti-certolizumab sono stati associati con una modesta riduzione della risposta terapeutica nei pazienti con artrite reumatoide (Fleischmann et al., 2009), ma tale associazione non è stata riscontrata nei pazienti con psoriasi (Reich et al., 2012; Vincent et al., 2013).

I dati presentati nella Tabella 4 evidenziano una notevole eterogeneità delle informazioni disponibili in letteratura in merito alla formazione di ADAb. Tale eterogeneità è ulteriormente sottolineata dal confronto dei risultati della revisione sistematica di Vincent et al. (2013; Tabella 4) con i dati degli studi clinici riportati nelle schede tecniche dei singoli farmaci anti-TNF e riassunti nella tabella 5. E' importante inoltre sottolineare che, allo stato attuale delle conoscenze, non sono disponibili evidenze a sostegno della possibilità che gli ADAb indotti dal trattamento con un determinato farmaco anti-TNF possano in qualche modo interferire con l'azione terapeutica di altri farmaci anti-TNF somministrati come seconda o terza linea di trattamento.

6. Conclusioni

I farmaci anti-TNF disponibili per l'impiego clinico sono accomunati dal meccanismo d'azione principale, che consiste nella loro capacità di legarsi al TNF, impedire la sua interazione con i recettori del TNF e bloccare un'ampia serie di risposte cellulari. Queste comprendono processi di attivazione e proliferazione cellulare, produzione di citochine e chemochine, e la regolazione di numerose funzioni ad esse correlate, quali la chemiotassi cellulare, l'infiammazione, il controllo delle risposte immunitarie, l'angiogenesi e la degradazione della matrice extracellulare. Tuttavia, nonostante la condivisione di tali meccanismi, i farmaci anti-TNF non possono essere considerati una classe terapeutica omogenea. Infatti, sebbene gli studi clinici randomizzati, condotti per saggiare l'attività terapeutica di questi farmaci nei pazienti con artrite reumatoide, abbiano mostrato livelli simili di efficacia, non è possibile trarre conclusioni attendibili su questo aspetto a causa della mancanza di studi di efficacia comparativi diretti. D'altra parte, i dati ottenuti nella fase di osservazione post-marketing (per esempio, registri), per quanto soggetti a notevoli limitazioni metodologiche, suggeriscono che nell'impiego a lungo termine i farmaci anti-TNF esibiscano profili differenti in termini di efficacia e sicurezza di impiego. L'eterogeneità dei farmaci anti-TNF è sostenuta da due importanti considerazioni: 1) i farmaci anti-TNF mostrano profili di efficacia diversi nei confronti delle malattie infiammatorie croniche a carattere granulomatoso; 2) pazienti che non rispondono al trattamento o che sono costretti ad interrompere la terapia con un farmaco anti-TNF a causa della perdita di efficacia o dell'insorgenza di reazioni avverse gravi, possono trarre giovamento dalla somministrazione di un altro farmaco anti-TNF.

I dati discussi nel presente *position paper* suggeriscono che l'eterogeneità terapeutica dei farmaci anti-TNF dipenda in maniera significativa da differenze di ordine strutturale, dalle quali discendono proprietà di tipo farmacodinamico e farmacocinetico significativamente diverse. I farmaci anti-TNF sono infatti molecole biotecnologiche altamente complesse,

caratterizzate da strutture chimiche diverse, che giustificano ampiamente le loro differenze in termini di attività farmacodinamica, farmacocinetica e, conseguentemente, terapeutica. Nell'insieme, quindi, la complessità biologica del sistema del TNF unitamente all'eterogeneità dei profili farmacodinamici e farmacocinetici dei farmaci anti-TNF possono spiegare le loro differenze nel contesto clinico in termini di efficacia e sicurezza di impiego.

Tabella 1. Indicazioni terapeutiche dei farmaci anti-TNF approvate in Italia.

Indicazione terapeutica	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Artrite reumatoide	+	+	+	+	+
Spondilite anchilosante	+	+	+	+	
Spondiloartrite assiale			+		
Artrite giovanile poliarticolare idiopatica		+	+		
Malattia di Crohn (adulto)	+		+		
Malattia di Crohn (pediatrica)	+		+		
Colite ulcerosa	+		+		
Colite ulcerosa (pediatrica)	+				
Psoriasi (adulto)	+	+	+		
Psoriasi (pediatrica)		+			
Artrite psoriasica	+	+	+	+	

+, indicazione terapeutica approvata

Tabella 2. Principali caratteristiche molecolari e proprietà farmacodinamiche dei farmaci anti-TNF.

	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Struttura molecolare	Anticorpo monoclonale chimerico	Proteina di fusione	Anticorpo monoclonale umano	Anticorpo monoclonale umano	Frammento ab di anticorpo monoclonale umanizzato
Peso molecolare (kDa)	150	150	150	150	91
Bersagli molecolari	sTNF, mTNF (sTNF monomero)	sTNF, mTNF (LT)	sTNF, mTNF	sTNF, mTNF	sTNF, mTNF
Modalità di legame con i bersagli molecolari	Bivalente	Monovalente	Bivalente	Bivalente	Monovalente
Presenza della regione Fc	Si	Si	Si	Si	No
Stabilità dei complessi farmaco-TNF	Elevata	Bassa	Elevata	ND	Bassa
Clearance ematica dei complessi farmaco-sTNF	Rapida	Lenta	Rapida	ND	Lenta
Cinetica di dissociazione di sTNF dai complessi farmaco-sTNF	Lenta	Rapida	Lenta	ND	Rapida
Capacità di attivazione del <i>reverse signaling</i>	Elevata	Moderata	Elevata	Moderata	Moderata
Capacità di indurre apoptosi	Elevata	Moderata	Elevata	Moderata	Moderata
Capacità di indurre CDC Fc-dipendente	Buona	Moderata	Buona	Buona	Assente
Capacità di indurre ADCC Fc-dipendente	Buona	Moderata	Buona	Buona	Assente

ND, informazione non disponibile; LT, linfotossina; mTNF, TNF espresso sulla membrana cellulare; sTNF, TNF circolante

Tabella 3. Dosi, modalità di somministrazione e principali parametri farmacocinetici dei farmaci anti-TNF.

	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Dose (mg)	3-10	25-50	40	50-100	100-200-400
Via di somministrazione	endovena	sottocutanea	sottocutanea	sottocutanea	sottocutanea
Frequenza di somministrazione (settimane)	4-8	0,5-1	1-2	2-4	4
C _{max} (mg/L)	118 -192	Monovalente	Bivalente	Bivalente	4,7-7,7
T _{max} (ore)	ND	70	130	3-4	50-170
t _{1/2} (giorni)	7-12	3-4	10-20	7-20	14

C_{max}: concentrazione massima raggiunta nel siero dopo la somministrazione del farmaco

T_{max}: tempo che intercorre tra la somministrazione e il raggiungimento di C_{max}

t_{1/2}: intervallo di tempo durante il quale la concentrazione sierica del farmaco si riduce della metà rispetto a C_{max}

ND, informazione non disponibile

Tabella 4. Frequenza di sviluppo di ADAb in pazienti sottoposti a trattamento con farmaci anti-TNF (adattato da: Vincent et al., 2013)

	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Artrite reumatoide	18-106 (10-50%)	40-549 (0-6%)	15-434 (0,7-87%)	16-613 (0-7%)	111-982 (5-8%)
Spondilite anchilosante	38 (18%)	53 (0%)	35 (31%)	278-356 (1-7%)	ND
Malattia di Crohn	33-573 (6-61%)	ND	30-269 (0,04-17)	ND	209-668 (3-18%)
Artrite psoriasica	200 (15%)	205 (0%)	22 (18%)	292 (4-5%)	ND
Psoriasi	15-198 (19-51%)	583-652 (1-18%)	29-825 (6-45%)	ND	34-60 (4-25%)

Nota: ciascuna casella riporta il numero di pazienti trattati e valutati per ciascuna patologia e, tra parentesi, la percentuale di pazienti trattati che ha sviluppato ADAb

ADAb, anticorpo antifarmaco (*anti-drug antibody*); ND, informazione non disponibile

Tabella 5. Frequenza di sviluppo di ADAb in pazienti sottoposti a trattamento con farmaci anti-TNF (dati riportati in RCP)

	Infliximab	Etanercept	Adalimumab	Golimumab	Certolizumab
Artrite reumatoide	8%	6%	5,5%	5%	7,7%
Spondilite anchilosante	ND	2%	8,3%		ND
Artrite psoriasica	15%	7,5%	10%		ND
Psoriasi	28%	7%	8,4%	ND	ND
Malattia di Crohn	3,3-13,3%	ND	2,6%	ND	ND

Nota: ciascuna casella riporta la percentuale di pazienti trattati che ha sviluppato ADAb per ciascuna indicazione terapeutica approvata.

ADAb, anticorpo antifarmaco (*anti-drug antibody*); ND, informazione non disponibile; RCP, riassunto delle caratteristiche del prodotto

Bibliografia

- Aarden L, Ruuls SR, Wolbink G. Immunogenicity of anti-tumor necrosis factor antibodies-toward improved methods of anti-antibody measurement. *Curr Opin Immunol* 20, 431-435, 2008.
- Aikawa NE, de Carvalho JF, Silva CAA, Bonfá E. Immunogenicity of anti-TNF- α agents in autoimmune diseases. *Clinic Rev Allerg Immunol* 38, 82–89, 2010.
- Albanesi M, Daëron M. The interactions of therapeutic antibodies with Fc receptors. *Immunol Lett* 143, 20-27, 2012.
- Anolik JH, Ravikumar R, Barnard J, Owen T, Almudevar A, Milner EC, Miller CH, Dutcher PO, Hadley JA, Sanz I. Cutting edge: anti-tumor necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis inhibits memory B lymphocytes via effects on lymphoid germinal centers and follicular dendritic cell networks. *J Immunol* 180, 688-692, 2008.
- Arora T, Padaki R, Liu L, Hamburger AE, Ellison AR, Stevens SR, Louie JS, Kohno T. Differences in binding and effector functions between classes of TNF antagonists. *Cytokine* 45, 124-131, 2009.
- Askling J, Fored CM, Brandt L, Baecklund E, Bertilsson L, Cöster L, Geborek P, Jacobsson LT, Lindblad S, Lysholm J, Rantapää-Dahlqvist S, Saxne T, Romanus V, Klareskog L, Feltelius N. Risk and case characteristics of tuberculosis in rheumatoid arthritis associated with tumor necrosis factor antagonists in Sweden. *Arthritis Rheum* 52, 1986-1992, 2005.
- Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, de Vries N, Tak PP, Dijkmans BA, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis Rheum* 60, 2541-2542, 2009.
- Baud V, Karin M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11, 372-377, 2001.
- Baughman RP, Lower EE, du Bois RM. Sarcoidosis. *Lancet* 361, 1111-1118, 2003.
- Baughman RP, Lower EE, Bradley DA, Raymond LA, Kaufman A. Etanercept for refractory ocular sarcoidosis: results of a double-blind randomized trial. *Chest* 128, 1062-1047, 2005.
- Baughman RP, Drent M, Kavuru M, Judson MA, Costabel U, du Bois R, Albera C, Brutsche M, Davis G, Donohue JF, Müller-Quernheim J, Schlenker-Herceg R, Flavin S, Lo KH, Oemar B, Barnathan ES; Sarcoidosis Investigators. Infliximab therapy in patients with

- chronic sarcoidosis and pulmonary involvement. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 795-802, 2006.
- Baughman RP, Lower EE, Ingledue R, Kaufman AH. Management of ocular sarcoidosis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis* 29, 26-33, 2012.
- Bender NK, Heilig CE, Dröll B, Wohlgemuth J, Armbruster FP, Heilig B. Immunogenicity, efficacy and adverse events of adalimumab in RA patients. *Rheumatol Int* 27, 269-274, 2007.
- Bieber J, Kavanaugh A. Consideration of the risk and treatment of tuberculosis in patients who have rheumatoid arthritis and receive biologic treatments. *Rheum Dis Clin North Am* 30, 257-270, 2004.
- Blonski W, Buchner AM, Lichtenstein GR. Inflammatory bowel disease therapy: current state-of-the-art. *Curr Opin Gastroenterol* 27, 346-357, 2011.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V. Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *J Am Med Assoc* 295, 2275-2285, 2006 (Erratum in: *J Am Med Assoc* 295, 2482, 2006).
- Carmona L, Gómez-Reino JJ; BIOBADASER Group. Survival of TNF antagonists in spondylarthritis is better than in rheumatoid arthritis. Data from the Spanish registry BIOBADASER. *Arthritis Res Ther* 8, R72. 2006.
- Cassinotti A, Travis S. Incidence and clinical significance of immunogenicity to infliximab in Crohn's disease: a critical systematic review. *Inflamm Bowel Dis* 15, 1264-1275, 2009.
- Catrina AI, Trollmo C, af Klint E, Engstrom M, Lampa J, Hermansson Y, Klareskog L, Ulfgren AK. Evidence that anti-tumor necrosis factor therapy with both etanercept and infliximab induces apoptosis in macrophages, but not lymphocytes, in rheumatoid arthritis joints: extended report. *Arthritis Rheum* 52, 61-72, 2005.
- Chaparro M, Guerra I, Muñoz-Linares P, Gisbert JP. Systematic review: antibodies and anti-TNF- α levels in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2012.
- De Vries MK, van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT, Aarden LA, Stapel SO, Peters MJ, van Denderen JC, Dijkmans BA, Wolbink GJ. Immunogenicity does not influence treatment with etanercept in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 68, 531-535, 2009.

- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Cinque B, Millimaggi D, Morera R, Ricevuti L, Cifone MG, Corazza GR. Defective mucosal T cell death is sustainably reverted by infliximab in a caspase dependent pathway in Crohn's disease. *Gut* 53, 70-77, 2004.
- Du Pan SM, Dehler S, Ciurea A, Ziswiler HR, Gabay C, Finckh A; Swiss Clinical Quality Management Physicians. Comparison of drug retention rates and causes of drug discontinuation between anti-tumor necrosis factor agents in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 61, 560-568, 2009.
- Eissner G, Kolch W, Scheurich P. Ligands working as receptors: reverse signaling by members of the TNF superfamily enhance the plasticity of the immune system. *Cytokine Growth Factor Rev* 15, 353-366, 2004.
- Fleischmann R, Vencovsky J, van Vollenhoven RF, Borenstein D, Box J, Coteur G, Goel N, Brezinschek HP, Innes A, Strand V. Efficacy and safety of certolizumab pegol monotherapy every 4 weeks in patients with rheumatoid arthritis failing previous disease-modifying antirheumatic therapy: the FAST4WARD study. *Ann Rheum Dis* 68, 805-811, 2009.
- Flood J. Tumor necrosis factor inhibitors in the treatment of chronic inflammatory diseases. A review of immunogenicity and potential implications. *Manag Care* 18 (Suppl. 3), 1-5, 2009.
- Friedmann E, Hauben E, Maylandt K, Schleegeer S, Vreugde S, Lichtenthaler SF, Kuhn PH, Stauffer D, Rovelli G, Martoglio B. SPPL2a and SPPL2b promote intramembrane proteolysis of TNFalpha in activated dendritic cells to trigger IL-12 production. *Nat Cell Biol* 8, 843-848, 2006.
- Furst DE, Keystone EC, Braun J, Breedveld FC, Burmester GR, De Benedetti F, Dörner T, Emery P, Fleischmann R, Gibofsky A, Kalden JR, Kavanaugh A, Kirkham B, Mease P, Sieper J, Singer NG, Smolen JS, Van Riel PL, Weisman MH, Winthrop K. Updated consensus statement on biological agents for the treatment of rheumatic diseases. 2011. *Ann Rheum Dis* 71 (Suppl. 2), i2-45, 2012.
- Goedkoop AY, Kraan MC, Teunissen MB, Picavet DI, de Rie MA, Bos JD, Tak PP. Early effects of tumour necrosis factor alpha blockade on skin and synovial tissue in patients with active psoriasis and psoriatic arthritis. *Ann Rheum Dis* 63, 769-773, 2004.
- Gniadecki R, Kragballe K, Dam TN, Skov L. Comparison of drug survival rates for adalimumab, etanercept and infliximab in patients with psoriasis vulgaris. *Br J Dermatol* 164, 1091-6. 2011.

- Greenberg JD, Reed G, Decktor D, Harrold L, Furst D, Gibofsky A, Dehoratius R, Kishimoto M, Kremer JM; CORRONA Investigators. A comparative effectiveness study of adalimumab, etanercept and infliximab in biologically naive and switched rheumatoid arthritis patients: results from the US CORRONA registry. *Ann Rheum Dis* 71, 1134-42, 2012.
- Grell M, Douni E, Wajant H, Löhden M, Clauss M, Maxeiner B, Georgopoulos S, Lesslauer W, Kollias G, Pfizenmaier K, Scheurich P. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 83, 793-802, 1995.
- Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, Mayer L, Travers S, Diamond RH, Olson A, Bao W, Rutgeerts P. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2, 542-553, 2004.
- Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, Panaccione R, Wolf D, Pollack P. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology* 130, 323-333, 2006.
- Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink GJ, Killestein J, de Groot ER, Aarden LA, Rispen T. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *J Immunol Methods* 372, 196-203, 2011.
- Herenius MM, Thurlings RM, Wijbrandts CA, Bennink RJ, Dohmen SE, Voermans C, Wouters D, Izmailova ES, Gerlag DM, van Eck-Smit BL, Tak PP. Monocyte migration to the synovium in rheumatoid arthritis patients treated with adalimumab. *Ann Rheum Dis* 70, 1160-1162, 2011.
- Hetland ML, Christensen IJ, Tarp U, Dreyer L, Hansen A, Hansen IT, Kollerup G, Linde L, Lindegaard HM, Poulsen UE, Schlemmer A, Jensen DV, Jensen S, Hostenkamp G, Østergaard M; All Departments of Rheumatology in Denmark. Direct comparison of treatment responses, remission rates, and drug adherence in patients with rheumatoid arthritis treated with adalimumab, etanercept, or infliximab: results from eight years of surveillance of clinical practice in the nationwide Danish DANBIO registry. *Arthritis Rheum* 62, 22-32, 2010.
- Higuchi M, Aggarwal BB. TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor. *J Immunol* 152, 3550-3558, 1994.

- Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T. Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49, 1215-1228, 2010.
- Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DP, Silman AJ; British Society for Rheumatology Biologics Register. Outcomes after switching from one anti-tumor necrosis factor alpha agent to a second anti-tumor necrosis factor alpha agent in patients with rheumatoid arthritis: results from a large UK national cohort study. *Arthritis Rheum* 56, 13-20, 2007.
- Jacobs P, Bissonnette R, Guenther LC. Socioeconomic burden of immune-mediated inflammatory diseases--focusing on work productivity and disability. *J Rheumatol* 88 (Suppl.), 55-61, 2011.
- Jamnitski A, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, Hart MH, Dijkmans BA, Aarden L, Voskuyl AE, Wolbink GJ. Patients non-responding to etanercept obtain lower etanercept concentrations compared with responding patients. *Ann Rheum Dis* 71, 88-91, 2012.
- Judson MA, Baughman RP, Costabel U, Flavin S, Lo KH, Kavuru MS, Drent M; Centocor T48 Sarcoidosis Investigators. Efficacy of infliximab in extrapulmonary sarcoidosis: results from a randomised trial. *Eur Respir J* 31, 1189-1196, 2008.
- Kamphuis LS, Lam-Tse WK, Dik WA, van Daele PL, van Biezen P, Kwekkeboom DJ, Kuijpers RW, Hooijkaas H, van Laar JA, Bastiaans J, Baarsma GS, van Hagen PM. Efficacy of adalimumab in chronically active and symptomatic patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* 184, 1214-1216, 2011.
- Karmiris K, Paintaud G, Noman M, Magdelaine-Beuzelin C, Ferrante M, Degenne D, Claes K, Coopman T, Van Schuerbeek N, Van Assche G, Vermeire S, Rutgeerts P. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of adalimumab therapy in Crohn's disease. *Gastroenterology* 137, 1628-1640, 2009.
- Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Bose S, Scesney S, Xiong L, Hanzatian DK, Salfeld J, Sasso EH. Comparisons of affinities, avidities, and complement activation of adalimumab, infliximab, and etanercept in binding to soluble and membrane tumor necrosis factor. *Clin Immunol* 131, 308-316, 2009.
- Keystone EC. Safety of biologic therapies--an update. *J Rheumatol Suppl* 74, 8-12, 2005.
- Kimball AB, Bensimon AG, Guerin A, Yu AP, Wu EQ, Okun MM, Bao Y, Gupta SR, Mulani PM. Efficacy and safety of adalimumab among patients with moderate to severe psoriasis with co-morbidities: Subanalysis of results from a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial. *Am J Clin Dermatol* 12, 51-62, 2011.

- Kirchner S, Holler E, Haffner S, Andreesen R, Eissner G. Effect of different tumor necrosis factor (TNF) reactive agents on reverse signaling of membrane integrated TNF in monocytes. *Cytokine* 28, 67-74, 2004.
- Klareskog L, Gaubitz M, Rodríguez-Valverde V, Malaise M, Dougados M, Wajdula J; Etanercept Study 301 Investigators. Assessment of long-term safety and efficacy of etanercept in a 5-year extension study in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 29, 238-247, 2011.
- Kohno T, Tam LT, Stevens SR, Louie JS. Binding characteristics of tumor necrosis factor receptor-Fc fusion proteins vs anti-tumor necrosis factor mAbs. *J Invest Dermatol Symp Proc* 12, 5-8, 2007.
- Kozuch PL, Hanauer SB. General principles and pharmacology of biologics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 35, 757-773, 2006.
- Ksontini R, MacKay SL, Moldawer LL. Revisiting the role of tumor necrosis factor alpha and the response to surgical injury and inflammation. *Arch Surg* 133, 558-567, 1998.
- Lecluse LL, Driessen RJ, Spuls PI, de Jong EM, Stapel SO, van Doorn MB, Bos JD, Wolbink GJ. Extent and clinical consequences of antibody formation against adalimumab in patients with plaque psoriasis. *Arch Dermatol* 146, 127-132, 2010.
- Malaviya R, Sun Y, Tan JK, Magliocco M, Gottlieb AB. Induction of lesional and circulating leukocyte apoptosis by infliximab in a patient with moderate to severe psoriasis. *J Drugs Dermatol* 5, 890-893, 2006a
- Malaviya R, Sun Y, Tan JK, Wang A, Magliocco M, Yao M, Krueger JG, Gottlieb AB. Etanercept induces apoptosis of dermal dendritic cells in psoriatic plaques of responding patients. *J Am Acad Dermatol* 55, 590-597, 2006b
- Mease PJ, Kivitz AJ, Burch FX, Siegel EL, Cohen SB, Ory P, Salonen D, Rubenstein J, Sharp JT, Tsuji W. Etanercept treatment of psoriatic arthritis: safety, efficacy, and effect on disease progression. *Arthritis Rheum* 50, 2264-2272, 2004.
- Mease PJ, Gladman DD, Ritchlin CT, Ruderman EM, Steinfeld SD, Choy EH, Sharp JT, Ory PA, Perdok RJ, Weinberg MA; Adalimumab Effectiveness in Psoriatic Arthritis Trial Study Group. Adalimumab for the treatment of patients with moderately to severely active psoriatic arthritis: results of a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 52, 3279-3289, 2005.
- Mewar D, Wilson AG. Treatment of rheumatoid arthritis with tumour necrosis factor inhibitors. *Br J Pharmacol* 162, 785-791, 2011.

- Milman N, Graudal N, Loft A, Mortensen J, Larsen J, Baslund B. Effect of the TNF- α inhibitor adalimumab in patients with recalcitrant sarcoidosis: a prospective observational study using FDG-PET. *Clin Respir J* 6, 238-247, 2012.
- Mitoma H, Horiuchi T, Hatta N, Tsukamoto H, Harashima S, Kikuchi Y, Otsuka J, Okamura S, Fujita S, Harada M. Infliximab induces potent anti-inflammatory responses by outside-to-inside signals through transmembrane TNF-alpha. *Gastroenterology* 128, 376-392, 2005.
- Mitoma H, Horiuchi T, Tsukamoto H, Tamimoto Y, Kimoto Y, Uchino A, To K, Harashima S, Hatta N, Harada M. Mechanisms for cytotoxic effects of anti-tumor necrosis factor agents on transmembrane tumor necrosis factor alpha-expressing cells: comparison among infliximab, etanercept, and adalimumab. *Arthritis Rheum* 58, 1248-1257, 2008.
- Nesbitt A, Fossati G, Bergin M, Stephens P, Stephens S, Foulkes R, Brown D, Robinson M, Bourne T. Mechanism of action of certolizumab pegol (CDP870): in vitro comparison with other anti-tumor necrosis factor alpha agents. *Inflamm Bowel Dis* 13, 1323-1332, 2007.
- Nestorov I. Clinical pharmacokinetics of TNF antagonists: how do they differ? *Semin Arthritis Rheum* 34 (Suppl. 1), 12-18, 2004.
- Papadakis KA, Shaye OA, Vasilias EA, Ippoliti A, Dubinsky MC, Birt J, Paavola J, Lee SK, Price J, Targan SR, Abreu MT. Safety and efficacy of adalimumab (D2E7) in Crohn's disease patients with an attenuated response to infliximab. *Am J Gastroenterol* 100, 75-79, 2005.
- Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. T cell apoptosis and inflammatory bowel disease. *Gut* 53, 1556-1558, 2004.
- Piérard GE, Piérard-Franchimont C, Szepietuk G, Paquet P, Quatresooz P. The therapeutic potential of TNF-alpha antagonists for skin psoriasis comorbidities. *Expert Opin Biol Ther* 10, 1197-1208, 2010.
- Radstake TR, Svenson M, Eijsbouts AM, van den Hoogen FH, Enevold C, van Riel PL, Bendtzen K. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 68, 1739-1745, 2009.
- Raval K, Lofland JH, Waters H, Piech CT. Disease and treatment burden of psoriasis: examining the impact of biologics. *J Drugs Dermatol* 10, 189-196, 2011.
- Reich K, Ortonne JP, Gottlieb AB, Terpstra IJ, Coteur G, Tasset C, Mease P. Successful treatment of moderate to severe plaque psoriasis with the PEGylated Fab' certolizumab

- pegol: results of a phase II randomized, placebo-controlled trial with a re-treatment extension. *Br J Dermatol* 167, 180-190, 2012.
- Remouchamps C, Boutaffala L, Ganef C, Dejardin E. Biology and signal transduction pathways of the Lymphotoxin- $\alpha\beta$ /LT β R system. *Cytokine Growth Factor Rev* 22, 301-310, 2011.
- Rigby WF. Drug insight: different mechanisms of action of tumor necrosis factor antagonists-passive-aggressive behavior? *Nat Clin Pract Rheumatol* 3, 227-233, 2007.
- Roux-Lombard P, Punzi L, Hasler F, Bas S, Todesco S, Gallati H, Guerne PA, Dayer JM. Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum* 36, 485-489, 1993.
- Salomon-Escoto KI, Gravallesse EM, Kay J. Assessment of control of rheumatoid arthritis disease activity. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25, 497-507, 2011.
- Sands BE. Why do anti-tumor necrosis factor antibodies work in Crohn's disease? *Rev Gastroenterol Disord* 4 (Suppl 3), S10-7, 2004.
- Sandborn WJ, Hanauer SB, Katz S, Safdi M, Wolf DG, Baerg RD, Tremaine WJ, Johnson T, Diehl NN, Zinsmeister AR. Etanercept for active Crohn's disease: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 121, 1088-1094, 2001.
- Santora LC, Kaymakcalan Z, Sakorafas P, Krull IS, Grant K. Characterization of noncovalent complexes of recombinant human monoclonal antibody and antigen using cation exchange, size exclusion chromatography, and BIAcore. *Anal Biochem* 299, 119-129, 2001.
- Scallon B, Cai A, Solowski N, Rosenberg A, Song XY, Shealy D, Wagner C. Binding and functional comparisons of two types of tumor necrosis factor antagonists. *J Pharmacol Exp Ther* 301, 418-246, 2002.
- Shen C, Assche GV, Colpaert S, Maerten P, Geboes K, Rutgeerts P, Ceuppens JL. Adalimumab induces apoptosis of human monocytes: a comparative study with infliximab and etanercept. *Aliment Pharmacol Ther* 21, 251-258, 2005.
- Smith JA, Thompson DJ, Whitcup SM, Suhler E, Clarke G, Smith S, Robinson M, Kim J, Barron KS. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 53, 18-23, 2005.
- Smeets TJ, Kraan MC, van Loon ME, Tak PP. Tumor necrosis factor alpha blockade reduces the synovial cell infiltrate early after initiation of treatment, but apparently not by induction of apoptosis in synovial tissue. *Arthritis Rheum* 48, 2155-2162, 2003.

- Soliman MM, Ashcroft DM, Watson KD, Lunt M, Symmons DP, Hyrich KL; British Society for Rheumatology Biologics Register. Impact of concomitant use of DMARDs on the persistence with anti-TNF therapies in patients with rheumatoid arthritis: results from the British Society for Rheumatology Biologics Register. *Ann Rheum Dis* 70, 583-589, 2011.
- Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol* 155, 5038-5045, 1995.
- Tak PP. Effects of infliximab treatment on rheumatoid synovial tissue. *J Rheumatol Suppl* 74, 31-34, 2005.
- Taylor PC. Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis and other chronic inflammatory diseases. *Curr Opin Pharmacol* 10, 308-315, 2010.
- Ten Hove T, van Montfrans C, Peppelenbosch MP, van Deventer SJ. Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease. *Gut* 50, 206-211, 2002.
- Thalayasingam N, Isaacs JD. Anti-TNF therapy. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 25, 549-567, 2011.
- Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol Ther* 117, 244-279, 2008.
- Ueda N, Tsukamoto H, Mitoma H, Ayano M, Tanaka A, Ohta S, Inoue Y, Arinobu Y, Niino H, Akashi K, Horiuchi T. The cytotoxic effects of certolizumab pegol and golimumab mediated by transmembrane tumor necrosis factor α . *Inflamm Bowel Dis* 19, 1224-1231, 2013.
- Utz JP, Limper AH, Kalra S, Specks U, Scott JP, Vuk-Pavlovic Z, Schroeder DR. Etanercept for the treatment of stage II and III progressive pulmonary sarcoidosis. *Chest* 124, 177-185, 2003.
- Van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, Stigter van Walsum M, de Groot ER, Wolbink G, Dijkmans BA, Aarden LA. Imaging and serum analysis of immune complexformation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 66, 253-256, 2007.
- Van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EE, Kruithof S, de Groot E, Hart M, van Ham SM, Rispens T, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Ann Rheum Dis* 72, 104-109, 2013.

- Vermeire S, Noman M, Van Assche G, Baert F, D'Haens G, Rutgeerts P. Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut* 56, 1226-1231, 2007.
- Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Ann Rheum Dis* 72, 165-178, 2013.
- Vujanovic NL. Role of TNF superfamily ligands in innate immunity. *Immunol Res* 50, 159-174, 2011.
- Wallis RS, Ehlers S. Tumor necrosis factor and granuloma biology: explaining the differential infection risk of etanercept and infliximab. *Semin Arthritis Rheum* 34 (Suppl. 1), 34-38, 2005.
- Ware CF. Network communications: lymphotoxins, LIGHT, and TNF. *Annu Rev Immunol* 23, 787-819, 2005.
- Wegener's Granulomatosis Etanercept Trial (WGET) Research Group. Etanercept plus standard therapy for Wegener's granulomatosis. *N Engl J Med*. 2005 Jan 27;352(4):351-61.
- Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, Bloomfield G, Wallach D, Roufogalis BD, Chaudhri G. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J* 18, 2119-2126, 1999.
- Weir N, Athwal D, Brown D, Foulkes R, Kollias G, Nesbitt A, Popplewell A, Spitali M, Stephens S. A new generation of high-affinity humanized PEGylated Fab'' fragment anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibodies. *Therapy* 3, 535-545, 2006.
- West RL, Zelinkova Z, Wolbink GJ, Kuipers EJ, Stokkers PC, van der Woude CJ. Immunogenicity negatively influences the outcome of adalimumab treatment in Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 28, 1122-1126, 2008.
- Williams-Abbott L, Walter BN, Cheung TC, Goh CR, Porter AG, Ware CF. The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J Biol Chem* 272, 19451-19456, 1997.
- Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B. Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 54, 711-715, 2006.

- Wolbink GJ, Aarden LA, Dijkmans BA. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. *Curr Opin Rheumatol* 21, 211-215, 2009.
- Woof JM, Burton DR. Human antibody-Fc receptor interactions illuminated by crystal structures. *Nat Rev Immunol* 4, 89-99, 2004.