



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE CLINICHE

**Indirizzo in Medicina Clinica e Sperimentale**

CICLO XXVI

Coordinatore Prof. Laffi Giacomo

**Immunogenicità dei Farmaci Biologici:  
Analisi dei Meccanismi Fisiopatologici e Sviluppo di Test *in vitro*  
per il suo Monitoraggio**

Settore Scientifico Disciplinare MED/09

**Dottorando**  
Dott. Petroni Giulia

**Tutore**  
Prof. Maggi Enrico

**Coordinatore**  
Prof. Laffi Giacomo

Anni 2011/2013

# INDICE

## **INTRODUZIONE.....Pag. 4**

1. Farmaci biologici
  - 1.1 Anticorpi monoclonali
2. Farmaci biologici per il trattamento delle malattie immunomediate
  - 2.1. Tumor necrosis factor alpha e Anti-TNF- $\alpha$
  - 2.2. Anti-CD20
  - 2.3. Nuovi farmaci biologici per il trattamento delle malattie immunomediate
3. Immunogenicità dei farmaci biologici
  - 3.1. Immunità cellulare e umorale nei confronti dei farmaci biologici
  - 3.2. Conseguenze cliniche dell'immunogenicità
  - 3.3. Immunogenicità degli anticorpi monoclonali per il trattamento delle malattie immunomediate
4. Test *in vitro* per lo studio della risposta umorale e cellulare ai farmaci biologici
  - 4.1. Dosaggio degli anticorpi anti-farmaco (ADA)
  - 4.2. Studio della risposta immune anti-farmaco di tipo cellulo-mediata

## **SCOPO DELLA TESI.....Pag. 27**

## **MATERIALI E METODI.....Pag. 28**

1. Pazienti
2. Metodi di rivelazione degli anticorpi anti-infliximab (ATI), anti-adalimumab (AAA) e anti-rituximab (anti-RTX)
3. Requisiti di validazione
4. Studio *in vitro* della risposta immune anti-farmaco di tipo cellulo-mediata

**RISULTATI.....Pag.32**

1. Messa a punto di un test ELISA “Bridging Assay” per il dosaggio di anticorpi anti-farmaco
  - 1.1. Scelta del test
  - 1.2. Il protocollo del test
2. Validazione dei test diagnostici
3. Analisi degli anticorpi anti-farmaco in pazienti affetti da malattie immunomediate e trattati con antagonisti del TNF- $\alpha$ 
  - 3.1. Correlazione tra presenza di anticorpi anti-farmaco perdita di efficacia del trattamento e sviluppo di reazioni avverse al farmaco
  - 3.2. Associazione tra sviluppo di anticorpi anti-farmaco, livelli di farmaco circolante ed efficacia terapeutica
4. Ricerca degli anticorpi anti-infliximab di isotipo IgE in pazienti che hanno sviluppato una reazione avversa a infliximab
5. Studio della risposta immune di tipo umorale e cellulare a rituximab
  - 5.1. Analisi degli anticorpi anti-farmaco in pazienti affetti da malattie ematologiche e reumatologiche in trattamento con rituximab
  - 5.2. Reazioni avverse a rituximab: dimostrazione di un meccanismo IgE-mediato e di una risposta immune anti-farmaco di tipo Th2.
    - 5.2.1. Case report
    - 5.2.2. Ricerca degli anticorpi anti-RTX di tipo IgE in un paziente che ha sviluppato una reazione avversa a rituximab
    - 5.2.3. Studio della presenza di cellule circolanti specifiche per rituximab mediante test di proliferazione *in vitro*

**DISCUSSIONE.....Pag. 47**

**REFERENZE.....Pag. 54**

# INTRODUZIONE

## 1. FARMACI BIOLOGICI

Negli ultimi 30 anni, i farmaci biologici hanno assunto un ruolo sempre più importante per la terapia di molte patologie, come malattie oncologiche, immunomediate, infezioni virali, e così via. Così chiamati poiché replicano l'azione di sostanze naturali presenti nel nostro organismo (come enzimi, anticorpi o ormoni), diversamente dai farmaci tradizionali non vengono prodotti chimicamente, ma mediante tecniche biotecnologiche, come ad esempio la tecnica del DNA ricombinante o la tecnica dell'ibridoma. Isolati da differenti sorgenti naturali (cellule umane, animali, lieviti o batteri) sono principalmente composti da zuccheri, proteine o acidi nucleici, e possono anche essere rappresentati da entità viventi, come cellule e tessuti.

I farmaci biologici sono solitamente considerati sicuri e non tossici per il paziente, e spesso più efficaci rispetto ai farmaci convenzionali. Quest'ultima caratteristica è dovuta al fatto che sono estremamente selettivi, essendo in grado di colpire un singolo target terapeutico (recettore, proteina, sequenza di DNA), riducendo così gli effetti collaterali e aumentando l'efficacia della terapia. Tuttavia, la somministrazione dei tali farmaci può indurre reazioni immuni e altri effetti collaterali relativi al target specifico, tra cui infezioni, cancro, malattie autoimmuni e eventi avversi organo-specifici, come cardiotossicità.

Il primo farmaco biologico approvato per l'uso terapeutico è l'insulina, prodotto nel 1982 utilizzando la tecnica del DNA ricombinante e utilizzato dai diabetici per tenere sotto controllo la glicemia. Dal 1990 sono stati fatti notevoli progressi nel processo di produzione dei farmaci biologici e ad oggi ne sono stati approvati più di 200.

Circa un terzo dei farmaci biologici è rappresentato da anticorpi monoclonali, oltre a questi troviamo citochine umane ricombinanti (ad esempio gli interferoni), enzimi, vaccini, fattori di crescita cellulare e ematopoietica (GM-CSF, eritropoietina), ormoni (glucagone, insulina, gonadotropina), antagonisti neuromuscolari (tossina botulinica), prodotti del sangue (fattore VII e IX), terapie cellulari (somministrazione di cellule staminali) e oligonucleotidi antisenso.

### **1.1. Anticorpi monoclonali**

Il primo anticorpo monoclonale approvato nel 1986 dalle autorità internazionali per l'uso clinico sull'uomo è muromomab-CD3 (Orthoclone OKT3®). Anticorpo monoclonale di origine murina, attivo sulla molecola CD3 espressa dalle cellule T, per la sua attività di immunosoppressione è utilizzato per il trattamento di soggetti sottoposti a trapianto d'organo.

La prima reale fonte per la produzione di anticorpi monoclonali è rappresentata dagli ibridomi murini: cellule ingegnerizzate risultanti dalla fusione di linfociti B splenici murini (sensibilizzati per l'antigene di interesse) con cellule di mieloma umano, capaci di secernere grandi quantità di anticorpi monoclonali. Scoperta da Kohler e Milstein nel 1975, la tecnica dell'ibridoma ha permesso di superare i limiti delle metodiche classiche d'immunizzazione degli animali e di isolare grandi quantità di anticorpi monoclonali (mAbs) murini ad alta affinità e specifici per un solo target terapeutico.

Nonostante gli anticorpi monoclonali murini (suffisso *-omab*) presentino notevoli potenzialità terapeutiche, tale tecnica ha però subito alcune critiche dovute al fatto che la componente murina, per la presenza di xenoantigeni, può stimolare le risposte immuni del paziente, attraverso la produzione di anticorpi specifici (*human anti-mouse antibodies: HAMA*). La limitazione di un anticorpo monoclonale dovuta alla sua capacità di indurre una risposta immune (immunogenicità), è stata in parte superata attraverso la sostituzione di porzioni murine con la controparte umana, inizialmente grazie alla produzione di anticorpi monoclonali chimerici (suffisso *-ximab*) e, successivamente, umanizzati (suffisso *-zumab*). Nel primo caso gli anticorpi sono modificati attraverso la fusione della regione variabile murina (specifico per il target terapeutico) con una regione

costante umana, riducendo così la componente murina a meno del 35% della molecola. Il primo anticorpo monoclonale umanizzato è stato prodotto nel 1989 mediante tecniche di ingegneria genetica: i geni che codificano per le regioni murine ipervariabili specifiche per l'antigene vengono inseriti in cDNA codificanti proteine mielomatose umane, cosicché la proteina prodotta è un ibrido per il 95% umano, definito, appunto, anticorpo umanizzato. La deplezione della componente murina ha come conseguenza una riduzione del rischio di risposta immune al mAb: la produzione di anticorpi diretti verso i mAbs umanizzati (*human anti-humanized antibodies: HAAH*) risulta infatti pari al 9%, rispetto al 40% nel caso della produzione di anticorpi anti-chimerici (*human anti-chimeric antibodies: HACA*) e all'84% nel caso della produzione di HAMA. L'umanizzazione può però portare a una riduzione, fino a cento volte, dell'affinità per l'antigene specifico, rispetto al relativo anticorpo murino. Questo problema è stato risolto sostituendo alcuni amminoacidi umani con amminoacidi murini nella regione complementare all'antigene (CDR) e lasciando gli amminoacidi umani solo nella parte esposta.

Qualche anno dopo, la tecnica dell'ibridoma è stata rimpiazzata dall'avvento dei topi transgenici e dalla phage display per la produzione degli anticorpi monoclonali umani, i così detti "*fully human*" (suffisso *-umab*). La produzione di mAbs da parte di topi transgenici esprimenti i geni per le immunoglobuline umane e sensibilizzati per l'antigene desiderato, ha permesso di ottenere anticorpi monoclonali umani ad alta affinità e ridotta, ma non assente, immunogenicità [1,2].

Per valutare le potenzialità terapeutiche di un anticorpo monoclonale dobbiamo tenere conto non solo della sua immunogenicità, ma anche di altri fattori, quali affinità, funzioni effettrici, penetrazione nei tessuti e farmacocinetica. Dagli anni '90 ad oggi, l'avvento di numerose nuove tecniche ha permesso di modificare gli anticorpi monoclonali in modo da potenziarne ulteriormente l'efficacia terapeutica, migliorarne la sua farmacocinetica e ridurre l'immunogenicità, rendendoli così dei reali candidati per la pratica clinica [3].

## **2. FARMACI BIOLOGICI PER IL TRATTAMENTO DELLE MALATTIE IMMUNOMEDiate**

Prima dell'avvento dei farmaci biologici, le malattie immunomediate, quali Artrite Reumatoide (RA), Spondilite Anchilosante, Psoriasi e Malattie Infiammatorie Croniche dell'intestino (BID), erano trattate con farmaci anti-infiammatori non-steroidi (NSAIDs), corticosteroidi e farmaci anti-reumatici modificanti la malattia (DMARDs).

Negli ultimi anni sono stati fatti notevoli progressi nella comprensione della patogenesi delle malattie immunomediate. Per molte malattie infiammatorie croniche a varia estrinsecazione clinica (gastrointestinale, articolare, oculare) è stato ben descritto il pool cellulare e il network di citochine coinvolti nell'induzione e nel mantenimento della flogosi tissutale e sistemica. Questo ha permesso di individuare nuovi bersagli terapeutici e il successivo sviluppo di farmaci biologici ha consentito di migliorare notevolmente la prognosi di pazienti affetti da malattie immunomediate, spesso refrattarie ai trattamenti immunosoppressori convenzionali.

I farmaci biologici più utilizzati nel trattamento delle malattie immunomediate sono gli antagonisti del TNF- $\alpha$ . A questi si aggiungono i farmaci che neutralizzano gli effetti della interleuchina 1 (anakinra), citochina pro-infiammatoria simile al TNF- $\alpha$ , gli antagonisti dell'interleuchina 6 (tocilizumab) e quelli che agiscono riducendo il numero di linfociti B circolanti (rituximab) o riducendo l'attivazione dei linfociti T (abatacept). Anche se alcuni di questi farmaci vengono utilizzati nel trattamento di molte patologie, altri sono specifici per il trattamento di una singola malattia [4].

### **2.1. Tumor necrosis factor alpha e Anti-TNF- $\alpha$**

Il tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) è una citochina pleiotropica che esplica funzioni sia di tipo pro-infiammatorio che immunoregolatorio. Prodotta principalmente da fagociti mononucleati attivati, ma anche da cellule T attivate, neutrofili, NK e mastociti, esiste in due forme: una di membrana (mTNF) ed una solubile (sTNF). Entrambe svolgono le loro attività attraverso il legame con due distinti recettori, p55/TNF-RI e p75/TNF-RII, espressi da una grande varietà di cellule e che, attraverso l'attivazione di due separate vie di segnale, inducono differenti effetti biologici. Il TNF- $\alpha$  stimola macrofagi e altre cellule a secernere citochine pro-infiammatorie, come interleuchina (IL)-1, IL-6 e IL-8, induce l'attivazione dei linfociti T e l'espressione di molecole di adesione da parte delle cellule

endoteliali. Rappresenta il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta ai batteri gram-negativi e ad altri microrganismi patogeni; se però viene prodotto in modo eccessivo, può provocare reazioni infiammatorie locali dannose per l'organismo o addirittura entrare in circolo e provocare complicanze sistemiche. Il TNF- $\alpha$  è inoltre coinvolto nella differenziazione e maturazione degli osteoclasti e stimola fibroblasti, osteoclasti e condrociti a rilasciare proteine che distruggono la cartilagine articolare e le ossa.

Il TNF- $\alpha$  gioca un ruolo chiave in varie patologie autoimmuni e infiammatorie croniche. Attraverso una serie di studi preclinici (mediante l'analisi del liquido sinoviale di pazienti affetti da RA), l'utilizzo di modelli animali e trials clinici, è stato identificato come il primo target terapeutico per il trattamento dell'Artrite Reumatoide [5].

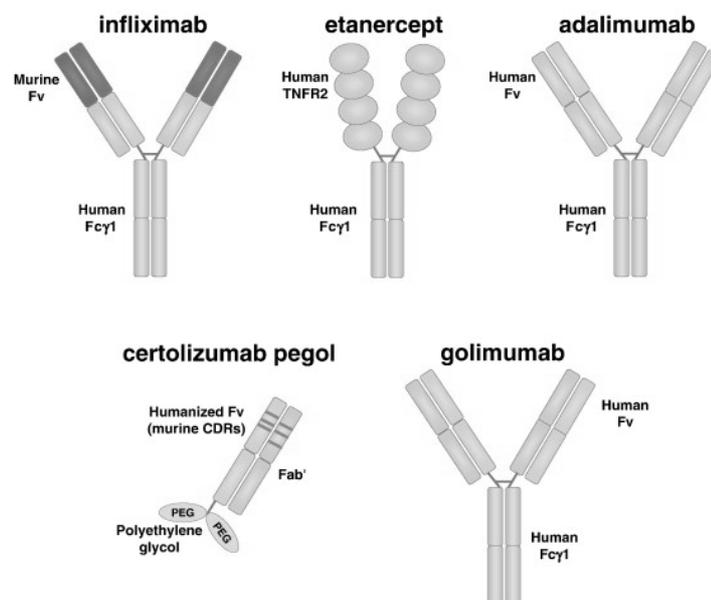
Negli ultimi anni sono state sviluppate terapie biologiche che, attraverso l'uso di antagonisti della citochina stessa, sono in grado di inibire l'attività del TNF- $\alpha$ . Gli antagonisti possono essere rappresentati da anticorpi anti-TNF- $\alpha$  o da recettori solubili ricombinanti che legano il TNF- $\alpha$ , impedendone l'interazione con i singoli recettori sulle cellule target e prevenendone così la risposta infiammatoria.

Ad oggi in Europa sono stati approvati 5 inibitori del TNF- $\alpha$  per il trattamento di malattie immunomediate. Questi differiscono per struttura, proprietà farmacologiche e morfologiche, e attività. Tre sono anticorpi monoclonali (infliximab, adalimumab e golimumab), uno è un Fab umanizzato PEGilato (certolizumab pegol) ed il quinto è una proteina di fusione (etanercept) (Fig. 1).

- **Infliximab (Remicade®)**

Il primo anti-TNF- $\alpha$  ad essere stato introdotto sul mercato farmacologico nel 1998 è infliximab. Anticorpo monoclonale chimerico di tipo IgG1, contiene una porzione murina (Fab) pari al 25% della molecola, ed una parte umana (Fc) appartenente all'isotipo IgG1. Somministrato generalmente ogni 8 settimane alla dose di 3-5 mg/Kg a seconda della patologia, possiede una emivita di 9-10 giorni. Lega sia il TNF- $\alpha$  di membrana sia quello solubile. Ogni molecola di farmaco è capace di legarne due di citochina e fino a 6 anticorpi possono reagire con lo stesso TNF- $\alpha$ , così da occultarne tutti i siti di legame per il suo

recettore naturale. E' inoltre capace di sequestrare i monomeri di TNF- $\alpha$  così da impedire la formazione della citochina matura (trimero). Studi hanno dimostrato che infliximab è capace di indurre apoptosi stimolando la via JNK, di mediare citotossicità anticorpo-dipendente (ADCC) e citotossicità complemento-mediata (CDC) verso le cellule che esprimono TNF- $\alpha$  di membrana. Come effetti secondari e minori provoca una riduzione dell'espressione di TNF-RII e un aumento della secrezione di TNF-RII da parte dei monociti. E' indicato per la terapia dell'Artrite Reumatoide in fase attiva in associazione al DMARD metotrexato (MTX), per il Morbo di Chron e la Colite Ulcerosa in pazienti non responsivi al trattamento standard con corticosteroidi, per la Psoriasi, l'Artrite Psoriatca e la Spondilite Anchilosante in pazienti che non hanno tratto benefici dal trattamento di prima linea. Trova inoltre un utilizzo *off-label*, ovvero al di fuori delle sue indicazioni, per il morbo di Behçet e per le Vasculiti Sistemiche [6,7].



**Figura 1:** Struttura degli anti-TNF- $\alpha$

- **Adalimumab (Humira®)**

Adalimumab un anticorpo monoclonale *fully human* di classe IgG1. E' stato creato grazie a tecniche di selezione guidata (phage display technology), metodiche che

riproducono il naturale riarrangiamento dei geni codificanti per le immunoglobuline. Vengono somministrati in media 40 mg di farmaco ogni due settimane per via sottocutanea. E' difficilmente distinguibile dalle IgG1 umane e condivide con queste le caratteristiche strutturali e funzionali e anche il tempo di emivita (circa 2 settimane). Possiede alta specificità e affinità solo per il TNF- $\alpha$ , infatti non lega né il TNF- $\beta$  né altre citochine. Interagisce sia col TNF- $\alpha$  solubile che con quello di membrana, agisce impedendone l'interazione con i recettori di superficie e può dare ADCC e CDC. Viene usato nella terapia della RA, sia in associazione a MTX che in monoterapia; ma anche nella Psoriasi e nell'Artrite Psoriatica nei pazienti non responsivi a cure precedenti, nelle Malattie Infiammatorie Croniche dell'intestino (IBD) e nella Spondilite Anchilosante [6,8].

- **Golimumab (Simponi®)**

Golimumab è un anticorpo monoclonale "fully human", derivato da topi modificati geneticamente esprimenti il gene per le IgG1 umane, ed immunizzati con TNF- $\alpha$  umano. E' capace di legare entrambe le forme del TNF- $\alpha$  ed ha dimostrato di avere un'affinità maggiore per la forma in soluzione rispetto ai due anticorpi precedentemente descritti. Per la presenza della porzione Fc può indurre anch'esso ADCC e CDC. La somministrazione di 50 mg per via sottocutanea viene effettuata una volta al mese. In Europa, Canada e Stati Uniti ne è indicato l'uso per l'Artrite Reumatoide, Spondilite Anchilosante e Artrite Psoriatica, come terapia sostitutiva ad una prima cura inefficace [9].

- **Certolizumab Pegol (Cimzia®)**

Approvato sia dalla EMA che dalla FDA nel 2009 è un frammento Fab PEGilato di un anticorpo monoclonale umanizzato. Esso viene prodotto per "umanizzazione" della regione Fab di un anticorpo monoclonale murino. Il frammento Fab modificato viene successivamente legato a due code di polietilenglicole, ciascuna del peso molecolare di 20 KD. Lega e neutralizza sia il TNF- $\alpha$  di membrana che quello solubile, impedendone il legame con i recettori di membrana, mentre l'assenza della porzione Fc riduce la possibilità di indurre citotossicità (ADCC e CDC). La PEGilazione incrementa l'emivita del farmaco, migliorandone biodisponibilità e farmacocinetica, e ne permette una maggiore

penetrazione e permanenza nei tessuti infiammati. La posologia consigliata è di una dose di 200 mg ogni due settimane per via sottocutanea, dopo tre prime iniziali dosi di carico di 400 mg ciascuna. Attualmente è indicato solamente per la terapia dell'Artrite Reumatoide [10].

- **Etanercept (Enbrel®)**

L'ultimo anti-TNF- $\alpha$  è rappresentato da una proteina dimerica di fusione tra la porzione solubile (p75) del recettore del TNF- $\alpha$  ed il frammento Fc di una immunoglobulina IgG1 umana. Funziona come recettore solubile del TNF- $\alpha$  e ne neutralizza l'attività attraverso un meccanismo di competitività recettoriale. Il farmaco possiede un'emivita di 4-5 giorni e viene somministrato per via sottocutanea ogni tre giorni (25 mg) o ogni sette giorni (50 mg). Nella maggior parte delle patologie di natura infiammatoria questa concentrazione non è sufficiente a prevenire il danno. È utilizzato per il trattamento di Artrite Reumatoide, Psoriasi e Spondilite Anchilosante, mentre non trova indicazioni nelle BID [11].

## **2.2. Anti-CD20**

Il rituximab (Rituxan®) è un anticorpo monoclonale chimerico diretto verso la proteina CD20, presente sulle cellule B, naïve, mature e della memoria. I linfociti B possono partecipare nella patogenesi della RA in vari modi, attraverso la loro azione come cellule presentanti, la produzione del fattore reumatoide e la secrezione di citochine pro-infiammatorie. Il meccanismo di azione del rituximab consiste in una deplezione delle cellule B, sia presenti in circolo che a livello tissutale, mediante apoptosi, citotossicità cellulo-mediata e complemento-mediata. Impiegato principalmente nel trattamento delle Malattie Linfoproliferative, dal 2006 il suo utilizzo in combinazione con MTX è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) nel trattamento di pazienti affetti da RA, non responsivi a DMARDs e agli anti-TNF- $\alpha$ . Sembra avere dei benefici anche nei pazienti affetti da SLE, nella cui patogenesi le cellule B svolgono un ruolo centrale. Il protocollo più utilizzato prevede la somministrazione di rituximab (1000 mg/m<sup>2</sup>) in combinazione con MTX per via endovenosa, ogni 15 giorni per 4 infusioni e

successivamente ogni 24 settimane[12,13]. Uno studio recente ha dimostrato un miglioramento dell'esito clinico di pazienti affetti da RA, non responsivi a MTX, e trattati con Ofatumumab (Azerra®), un anticorpo anti-CD20 monoclonale fully human [14].

### **2.3. Nuovi farmaci biologici per il trattamento delle malattie immunomediate**

Negli ultimi 5 anni sono stati messi a disposizione della pratica clinica per il trattamento delle malattie immunomediate nuovi farmaci biologici diretti verso altri target terapeutici.

Tra questi troviamo:

- Il tocilizumab (Actemra®): anticorpo umanizzato monoclonale IgG1 diretto verso il recettore della IL-6 utilizzato nel trattamento di pazienti affetti da RA non responsivi al trattamento con DMARDs o con anti-TNF- $\alpha$ . L'interleuchina 6 è una citochina che possiede sia un'azione di tipo anti-infiammatorio che pro-infiammatorio e svolge un ruolo patogenetico in molte malattie tra cui l'Artrite Reumatoide. Questa agisce legando un recettore, presente sia nella forma transmembrana che solubile. Tale interazione dà il via alla cascata infiammatoria, inducendo angiogenesi e amplificando l'attività delle molecole di adesione e l'attivazione degli osteoclasti. L'interleuchina 6 è inoltre responsabile dell'attivazione sia delle cellule B che T ed è coinvolta nella differenziazione delle cellule B [15].
- L'abatacept (Orencia®): immunoglobulina CTLA-4 IgG1 che agisce inibendo un secondo segnale necessario per l'attivazione di linfociti T. Utilizzato per il trattamento dell'Artrite Reumatoide, dell'Artrite Idiopatica Giovanile e del Lupus Sistemico Eritematoso (SLE), lega la molecola DC80/86 presente sulle cellule presentanti, inibendo così la co-stimolazione del CD28 presente sulle cellule T.
- Tra gli inibitori della interleuchina-1 troviamo anakinra (Kineret®), canakinumab (Ilaris®) e rilonacept (Arcalyst®). Mentre il primo è approvato per il trattamento della RA, gli altri due sono indicati nel trattamento di quelle malattie che sono conosciute come CAPS (cryopyrin-associated periodic syndromes) [12].

### 3. IMMUNIGENICITA' DEI FARMACI BIOLOGICI

L'introduzione dei farmaci biologici ha permesso di migliorare notevolmente la prognosi di pazienti affetti da malattie immunomediate e non solo. Tuttavia, la somministrazione dei tali farmaci può indurre reazioni immuni e altri effetti collaterali relativi al target specifico, tra cui infezioni, cancro, malattie autoimmuni e eventi avversi organo-specifici, come cardiotossicità.

La capacità di indurre una risposta immunitaria anti-farmaco, caratterizzata dallo sviluppo di anticorpi specifici (*anti-drug antibodies: ADA*), è posseduta da tutti i farmaci biologici e viene definita immunogenicità [2].

Molti sono i fattori determinanti l'immunogenicità dei farmaci biologici, primi fra tutti le caratteristiche strutturali. Si tratta infatti di molecole ad alto peso molecolare, strutturalmente complesse, con porzioni glicosilate e spesso contenenti porzioni murine in percentuali variabili. I monoclonali chimerici, come infliximab, per la loro componente murina pari al 25% dell'intera molecola, possiedono una maggiore immunogenicità rispetto agli anticorpi monoclonali umanizzati o completamente umani, come adalimumab. Recentemente è stato però dimostrato che anche questi agenti biologici sono in grado di indurre una risposta immune e di stimolare la produzione di anticorpi farmaco-specifici.

Il potere immunogenico può essere influenzato anche da fattori estrinseci, tra cui la formazione di immunocomplessi e le impurità organiche (DNA e proteine) e inorganiche (gocce di olio, metallo-derivati e frammenti di vetro).

Un altro fattore è il regime di somministrazione del farmaco stesso: mentre da un lato somministrazioni episodiche di farmaco stimolano l'insorgere di una immunizzazione, anche un contatto troppo costante dovuto a somministrazioni eccessivamente vicine tra loro possono dare lo stesso risultato. Solitamente somministrazioni per via sottocutanea o intradermica influenzano maggiormente l'immunogenicità di un farmaco rispetto a somministrazioni per via intramuscolare o endovenosa.

Altri fattori determinanti l'immunogenicità dei farmaci biologici sono quelli paziente-correlati, tra cui la predisposizione genetica, l'età ed il sesso, ma soprattutto il tipo di

patologia ed il suo grado di attività, nonché le concomitanti terapie immunomodulatorie e/o immunosoppressive in atto [16,17].

### **3.1. Immunità cellulare ed umorale nei confronti dei farmaci biologici**

La risposta immune indotta da un farmaco biologico coinvolge sia la produzione di anticorpi anti-farmaco, e quindi una risposta di tipo umorale, sia una risposta di tipo cellulare.

E' ormai avvalorata la teoria che la risposta umorale a un farmaco biologico sia prevalentemente dovuta all'attivazione di una risposta adattiva che porta all'espansione di cellule T della memoria, cellule T regolatorie e cellule B, specifiche per gli epitopi dominanti del farmaco. La produzione degli ADA e l'attivazione dei linfociti B sembrano essere una conseguenza di un meccanismo sia T-dipendente, sia T-indipendente, quest'ultimo dovuto alla diretta attivazione da parte del farmaco. L'attivazione T-dipendente dei linfociti B induce una risposta immune più potente, che comprende lo switching idiotipico degli ADA e l'induzione di cellule B della memoria. La modalità con cui gli anticorpi terapeutici riescono ad evocare questo tipo di risposta non è ancora del tutto chiara. Nello studio di Delluc et al. [18] sono stati identificati linfociti specifici per vari tipi di farmaci biologici (infliximab, adalimumab, etanercept) in donatori sani mai esposti al farmaco. Cellule specifiche sono state trovate anche verso anticorpi interamente umani, come adalimumab; questo si spiega probabilmente alla luce del fatto che durante la selezione negativa dei linfociti nel timo le regioni ipervariabili delle immunoglobuline possono essere completamente ignorate. In che modo poi le sequenze umane delle CRD dei prodotti biologici interferiscano con la tolleranza immunologica non è ancora stato spiegato. Il risultato ad ogni modo è l'immissione in circolo di linfociti T CD4+ specifici verso farmaci anche completamente umani.

L'instaurarsi di questa risposta segue lo sviluppo classico della via umorale. Il primo incontro dei linfociti B naïve specifici per l'antigene, nel nostro caso il farmaco, avviene a livello dei linfonodi e dei tessuti linfoidei. Essendo questi antigeni proteici, i linfociti B li internalizzano e li processano, dopodiché li presentano ai linfociti T helper in associazione alle molecole MHC di classe II. Tramite il legame tra CD40 e CD40-ligando e anche

attraverso l'azione di varie citochine prodotte dai linfociti T helper, si arriva all'attivazione dei linfociti B. Si ha quindi la risposta primaria alla esposizione con l'antigene, dove avviene la secrezione di anticorpi prevalentemente di classe IgM e IgD. Parallelamente alla differenziazione dei linfociti B nei follicoli avviene lo switch isotipico, in cui viene sostituita la catena pesante dell'anticorpo sintetizzato dalla plasmacellula, cambiando così la classe di immunoglobuline prodotte. A seconda della natura dell'antigene, proteico, polisaccaridico o lipidico, i linfociti T helper possono intervenire contribuendo al viraggio della produzione di anticorpi verso una classe precisa. Per quanto riguarda gli ADA, lo switch isotipico porta prevalentemente alla produzione di IgG, e in minor misura di IgE. Anche per quanto riguarda gli antagonisti del TNF- $\alpha$  è stato dimostrato che gli ADA appartengono prevalentemente all'isotipo IgG, anche se la presenza di IgE farmaco-specifiche è stata ormai confermata, per infliximab, adalimumab ed etanercept, sia mediante l'uso di metodiche *in vivo* (skin testing) che *in vitro*. Alla fine del primo incontro restano in circolo linfociti B della memoria, che intanto hanno maturato la loro affinità per l'antigene, e che intervengono in modo più massiccio ed immediato ad una esposizione successiva [19].

### **3.2. Conseguenze cliniche dell'immunogenicità**

L'induzione di una risposta immune al farmaco può spaziare da una comparsa temporanea di ADA nel siero del paziente senza alcuna rilevanza clinica, fino a effetti clinicamente significativi, quali le reazioni avverse al farmaco e la diminuzione della sua efficacia terapeutica.

- **Riduzione dell'efficacia del farmaco (Loss Of Response - LOR)**

Lo sviluppo di anticorpi anti-farmaco può indurre una perdita di efficacia del farmaco stesso, che può essere parziale, con necessità di incrementare il dosaggio e/o la frequenza di somministrazione, o completa, con conseguente interruzione del ciclo terapeutico. Gli anticorpi anti-farmaco inibiscono l'efficacia terapeutica in due modi diversi: bloccando l'interazione del farmaco con il suo target (anticorpi neutralizzanti) o alterandone la farmacocinetica e favorendone l'eliminazione (anticorpi clearanti). La produzione di ADA

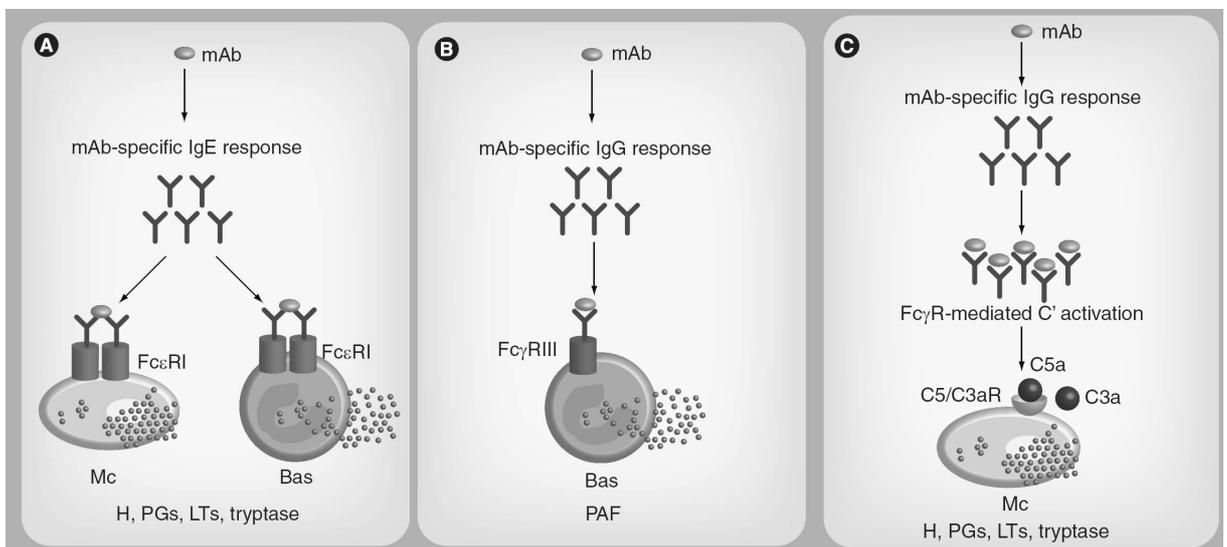
è stata associata a una LOR di tipo secondario, ovvero quando si osserva ricomparsa dei sintomi precedentemente ben controllati, ma non alla LOR primaria. Studi clinici hanno dimostrato che quest'ultima sembra essere dovuta a diverse variabili, come a differenze individuali nel metabolismo, nel background genetico e sierologico del paziente. È stato ipotizzato che i meccanismi patogenetici in questione non siano TNF- $\alpha$ -dipendenti, oppure che sia coinvolto un *pathway* alternativo di citochine capaci di ovviare alla mancanza di TNF- $\alpha$  [20,21].

- **Reazioni avverse al farmaco (Adverse Drug Reactions - ADR)**

Le reazioni immediate, o acute, solitamente si manifestano entro un'ora dall'assunzione del farmaco e comportano rischi variabili a seconda della gravità della reazione, da lievi a pericolose per la vita del paziente. Il meccanismo patogenetico alla base delle reazioni avverse ai mAbs non è ancora stato ben definito e, secondo una classificazione proposta da Pichler nel 2006 [22], possono essere suddivise in reazioni di ipersensibilità IgE- e non IgE-mediate (tipo  $\beta$ ) e Sindromi da Rilascio di Citochine (*Cytokine Release Syndrome: CRS*; tipo  $\alpha$ ).

Le reazioni di ipersensibilità sono definite di tipo I quando sono mediate da anticorpi di tipo IgE. Durante la fase di sensibilizzazione, la prima esposizione all'allergene induce una risposta Th2 con conseguente lieve produzione di IgE che interagiscono con i recettori specifici (Fc $\epsilon$ RI) espressi da mastociti e basofili circolanti [23,24]. Le successive esposizioni all'allergene vedono la comparsa dei sintomi, quali orticaria, rash cutaneo, angioedema, broncospasmo e ipotensione: il legame tra le IgE e i recettori specifici inducono il rilascio di istamina e di nuovi mediatori pro-infiammatori, capaci di indurre a loro volta contrazione muscolare, dilatazione capillare e permeabilità vascolare (Fig. 2). Poiché è richiesta una prima esposizione all'antigene, le reazioni di ipersensibilità di tipo I non avvengono durante la prima somministrazione del farmaco, anche se per cetuximab sono state descritte IgE specifiche preesistenti nel 68% di pazienti che avevano sviluppato una reazione avversa al farmaco (32.8%) [25]. Poiché IgE preesistenti non sono state descritte per nessuna altro mAbs, pare che in questo caso siano dovute ad una sensibilizzazione a xenoantigeni murini o a additivi.

Studi effettuati su modelli murini hanno dimostrato che le reazioni immediate ai bioterapeutici possono essere sostenute non solo da IgE, FcεRI, mastociti e istamina, ma anche da un meccanismo non IgE-mediato che coinvolge IgG, FcγRIII, macrofagi, basofili e il fattore attivante le piastrine (PAF) [26]. Per quest'ultimo è stato dimostrato nell'uomo che esiste una diretta correlazione tra i suoi livelli sierici e la severità della reazione, confermando l'ipotesi che la patogenesi della reazione possa essere sostenuta da un meccanismo non mastocita-mediato. Ipotesi confermata dall'assenza nel siero dell'incremento della triptasi (mediatore classico per l'attivazione dei mastociti), marker tipico di una reazione IgE-mediata. Mentre nel topo si è visto che elevati livelli di IgG specifiche sono conseguenza dell'esposizione a grandi quantità di antigene, nonostante siano state individuate ADA di isotipo IgG nel siero di pazienti trattati con infliximab [27], il meccanismo patogenetico alla base delle reazioni non-IgE mediate nell'uomo non è ancora chiaro. La produzione di ADA di tipo IgG potrebbe portare ad un meccanismo effetore che coinvolge l'attivazione o di basofili o del complemento, con conseguente produzione di anafilotossine e attivazione non specifica dei mastociti (Fig. 2) [26].



**Figura 2:** Reazioni di ipersensibilità a mAb: meccanismo IgE- (A) e non IgE-mediato (B,C)

Le caratteristiche cliniche di alcune reazioni acute suggeriscono, inoltre, un meccanismo anticorpo-indipendente, dovuto a un rilascio massivo di citochine da parte di diverse cellule del sistema immunitario, come monociti o macrofagi, cellule B, linfociti T e

NK. Questo tipo di reazione acuta, definita come Sindrome da Rilascio di Citochine, può essere clinicamente indistinguibile dalle reazioni di ipersensibilità di tipo I, anche se nel maggiore dei casi avviene alla prima infusione. Nonostante ancora non sia ben chiaro il meccanismo alla base delle CRS, studi *in vivo* ed *in vitro* hanno dimostrato che i principali attori sono citochine quali TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-8 and IL-6. Il rilascio di citochine e chemochine è il risultato di un meccanismo che prevede il cross-link dei mAbs con le cellule target, la successiva attivazione del complemento e la lisi delle cellule target. Le chemochine richiamano le cellule effettrici (monociti, macrofagi, cellule NK e linfociti T citotossici) capaci di fagocitare le cellule target, amplificandone così l'eliminazione ed il rilascio di citochine. Al rilascio delle citochine contribuiscono anche i macrofagi, attivati mediante il legame diretto tra l'Fc $\gamma$ R con l'Fc degli anticorpi monoclonali [26,28].

### **3.3. Immunigenicità degli anticorpi monoclonali per il trattamento delle malattie immunomediate**

Per quanto riguarda gli anti-TNF- $\alpha$ , la produzione di ADA in pazienti trattati con infliximab è stata ampiamente analizzata in pazienti affetti da varie patologie di base. La percentuale di anticorpi anti-infliximab (ATI) varia dal 10 al 60%, e in particolare dal 12 al 44% in pazienti affetti da Artrite Reumatoide e dal 6 al 61% in pazienti affetti da Morbo di Crohn. Anticorpi anti-adalimumab sono stati descritti nel 5% di pazienti affetti da Artrite Reumatoide, mentre l'uso di etanercept è invece associato allo sviluppo di anticorpi anti-etanercept nel 3% di pazienti. Per il trattamento di queste malattie autoimmuni è stato recentemente introdotto anche un altro anticorpo monoclonale "fully human" anti-TNF $\alpha$ , golimumab, per il quale sono stati descritti ADA nel 16% di pazienti affetti da Artrite Reumatoide.

Gli ADA complessandosi con il farmaco ne neutralizzano l'azione o ne determinano una clearance accelerata. Tale dato è stato dimostrato per infliximab in modelli animali e confermato in pazienti affetti da Artrite Reumatoide e morbo di Crohn: pazienti con elevati livelli sierici di ATI mostravano ridotti livelli sierici del farmaco e una correlata perdita di risposta al trattamento. In un recente studio condotto su 272 pazienti affetti da artrite reumatoide e trattati con adalimumab è stata monitorata la produzione di anticorpi anti-adalimumab durante il trattamento (156 settimane). Mediante ELISA e

radio immunoassay sono stati misurati rispettivamente i livelli sierici del farmaco e degli ADA specifici: dalla ricerca è emerso che i pazienti ADA positivi (28%) mostravano ridotti livelli sierici del farmaco rispetto ai pazienti senza anticorpi anti-adalimumab. Anche in questo caso, inoltre, la produzione di ADA specifici era associata a una perdita di risposta al trattamento. Il 63% di pazienti ADA positivi ha, infatti, dovuto interrompere il trattamento durante il follow-up per varie ragioni: il 38% per un fallimento del trattamento, il 10% per aver sviluppato una reazione avversa al farmaco, il 3% per il fallimento del trattamento combinato allo sviluppo di una reazione avversa, ed il 9% per altri motivi.

Per quanto riguarda le reazioni di ipersensibilità indotte dagli anti-TNF- $\alpha$ , la frequenza delle reazioni infusionali a infliximab è bassa, queste si sono infatti osservate in circa il 5% dei pazienti trattati. Uno studio condotto analizzando i dati clinici di più di 1600 pazienti affetti da Artrite Reumatoide ha mostrato che le reazioni infusionali a infliximab avvengono nel 4,8% dei casi. Reazioni a infliximab si sono inoltre osservate nel 3,8% dei pazienti trattati con infliximab e affetti da morbo di Crohn e nell'1% di pazienti affetti da Artrite Psoriasica. Le reazioni di tipo I avvengono principalmente tra la terza e la quarta infusione di infliximab, in relazione temporale alla comparsa degli ATI [29-35].

Per quanto riguarda il rituximab le reazioni avvengono prevalentemente alla prima infusione e sono rappresentate da reazioni infusionali indotte da rilascio di citochine. Nonostante ciò, sono stati descritti anticorpi anti-RTX nell'1% di pazienti affetti da tumori maligni a cellule B, nel 4% di pazienti affetti da Artrite Reumatoide, nel 25% di pazienti affetti da sindrome di Sjorgen e nel 40% di pazienti affetti da SLE [36-38].

#### **4. TEST *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA RISPOSTA UMORALE E CELLULARE AI FARMACI BIOLOGICI**

Lo studio dell'immunogenicità può essere effettuato mediante test *in vivo* (skin tests) e *in vitro*. I test *in vitro* prevedono lo studio della risposta immune anti-farmaco cellulo-mediata e della risposta immune umorale, mediante la detezione e caratterizzazione di anticorpi anti-farmaco (*anti-drug antibodies: ADA*) indotti dal trattamento. Per la

detezione degli ADA esistono attualmente alcune tecniche, come tecniche di dosaggio ELISA, dosaggio radioimmunologico (RIA) o tecniche di radioimmunoprecipitazione (RIPA), surface plasmon resonance (SPR) e elettrochemiluminescenza (ECL), ognuna delle quali presenta benefici e limitazioni [39].

#### **4.1. Dosaggio anticorpi anti-farmaco (ADA)**

- **ELISA**

ELISA è un acronimo derivato dall'espressione inglese Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay. Si tratta di un insieme di metodiche utilizzate per rivelare la presenza di una sostanza mediante uno o due anticorpi, uno dei quali marcato con un enzima, generalmente la perossidasi. L'aggiunta di un substrato che reagisce con tale enzima permette poi la quantificazione del segnale in densità ottica in spettrofotometria. Esistono anche altri tipi di marcatura oltre a quella enzimatica, ad esempio fluorescente o chemiluminescente.

I test ELISA esistono in due forme, diretti e indiretti; i metodi diretti servono a determinare la presenza dell'antigene in una soluzione, mentre quelli indiretti indicano la presenza di anticorpi contro l'antigene in studio. E' importante ricordare che tutti i saggi immunologici usati negli studi sugli ADA sono test di tipo semi-quantitativo dato che ancora non sono disponibili materiali di riferimento standardizzati e specie-specifici.

Nell'ambito della detezione degli ADA il primo ad essere usato è stato il format dell'ELISA diretto non competitivo. E' un test qualitativo e semi-quantitativo, che non fornisce un valore effettivo ma accerta la presenza o l'assenza della molecola nella soluzione. In questo format il farmaco viene adsorbito sul supporto e ha la funzione di catturare gli ADA. Dopo l'incubazione col siero e i dovuti lavaggi, gli ADA che legano il farmaco vengono evidenziati con un anticorpo anti-immunoglobulina coniugato con un enzima. Il complesso finale viene evidenziato con l'aggiunta del substrato, che fornisce un segnale la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione degli ADA. Il vantaggio principale di questa tecnica è la possibilità di processare numerosi campioni in un arco di tempo ridotto. Tra gli svantaggi più rilevanti, invece, è noto che il coating del

farmaco sul pozzetto può mascherare o alterare alcuni epitopi, e la determinazione dell'isotipo dell'anticorpo dipende dal coniugato usato. Inoltre gli anticorpi a bassa affinità, generalmente presenti nella risposta precoce, si perdono a causa dei numerosi lavaggi richiesti.

Nei metodi indiretti il farmaco viene legato da anticorpi monoclonali, o da biotina, con cui precedentemente si è effettuato il coating; questo permette di tenere il farmaco in un prestabilito orientamento, con una chiara e forte esposizione dei determinanti antigenici. Si esegue l'incubazione con il siero in esame, e dopo il lavaggio si effettua la misurazione grazie a un reagente secondario marcato diretto contro gli ADA che si stanno ricercando. Anche qui la maggior parte degli anticorpi a minor affinità vanno persi con i lavaggi, e viene rilevato solo l'isotipo verso cui è diretto l'anticorpo secondario; lo svantaggio maggiore di questa tecnica risiede però nel fatto che sono necessari numerosi studi al fine di appurare che l'anticorpo monoclonale o la biotina adesi sul supporto non alterino l'accessibilità agli epitopi, ad eccezione di quello con cui reagiscono, il quale deve essere accertato come non rilevante clinicamente.

Le tecniche ELISA classiche si sono spesso dimostrate inefficaci nella determinazione dei livelli sierici di farmaci anti-TNF- $\alpha$  e di ADA: molte sostanze presenti nel sangue sono capaci di alterare e impedire le interazioni tra l'anticorpo ricercato e l'antigene. Cercando di ovviare a queste limitazioni è stata sviluppata la metodica del Double Antigen Bridging-ELISA, ovvero un test ELISA in cui il farmaco viene utilizzato sia per immobilizzare sia per rilevare gli ADA specifici. Questa duplice interazione è possibile grazie alla caratteristica di bivalenza degli anticorpi, ovvero alla presenza di due siti di legame. Questo test è attualmente il metodo più utilizzato come test di screening per determinare la positività o la negatività di un paziente per gli ADA, essendo caratterizzato da una buona sensibilità e poichè permette di dosare tutti gli ADA in modo non isotipo-specifico.

La sensibilità e specificità di questo test possono essere influenzate da vari fattori. I livelli sierici del farmaco stesso possono, ad esempio, interferire con il dosaggio degli ADA determinandone una sottostima (*drug interference*), in quanto il farmaco circolante legato agli ADA impedisce il realizzarsi del "bridging" causando risultati falsamente negativi. Per questo motivo è raccomandato eseguire il test a tempi distanti dall'infusione considerando l'emivita del farmaco. Recentemente sono state sviluppate nuove

procedure quale, per esempio, un trattamento con acido acetico del campione di siero prima di procedere al bridging ELISA, al fine di ottenere una dissociazione acida degli immunocomplessi ADA-farmaco. Un diverso ma altrettanto importante “effetto matrice” in grado di influenzare le performance del test per gli ADA, è costituito dalla presenza di autoanticorpi con attività di fattore reumatoide e di anticorpi eterofili che possono condurre sia a risultati falsamente negativi (per ingombro sterico) che falsamente positivi (poiché partecipano alla formazione del bridging). Per questo motivo è estremamente importante la disponibilità per ciascun paziente di un suo siero “pre-terapia” per verificare questa possibile interferenza, così come avere a disposizione un test ELISA in cui la procedura di coating sia effettuata solo con la porzione Fab o F(ab)<sub>2</sub> del monoclonale. Infine, tra le possibili problematiche associate alla determinazione degli anticorpi anti-farmaco, vi è sicuramente quella della necessità di dover detectare anche anticorpi a bassa affinità, i quali possono avere conseguenze sull’attività metabolizzante. È sicuramente da sottolineare come la disponibilità di un test ELISA con un limitato numero di “washing steps” potrebbe essere molto utile in questa prospettiva [39].

Una volta appurata la positività agli ADA nel siero del paziente è possibile andare a caratterizzare la classe e la sottoclasse degli anticorpi maggiormente coinvolta nella risposta al farmaco. Per fare questo generalmente viene usata la metodica del Modified-ELISA: dopo aver fatto aderire il farmaco sul fondo del pozzetto di reazione, si procede con l’incubazione del siero in esame. Una volta che si è formato il legame antigene-anticorpo, la classe che si vuole valutare viene poi evidenziata grazie all’incubazione successiva con un anticorpo monoclonale isotipo-specifico marcato. Come per l’ELISA normale, anche qui la rivelazione viene eseguita tramite la misurazione colorimetrica del segnale emesso, la cui intensità è direttamente proporzionale alla concentrazione della classe di anticorpi studiata.

Per la classe delle IgE viene usata sia la metodica dell’ImmunoCAP che il RAST (Radio Allergo Sorben Test), utilizzate entrambe in ambito clinico di allergologia per la determinazione delle IgE specifiche per un certo allergene. Nel RAST l’allergene è disposto su una membrana, solitamente cellulosa, vi viene aggiunto il siero e il complesso che si forma viene evidenziato attraverso un anticorpo secondario anti-IgE marcato radioattivamente. Misurando l’intensità della radiazione emessa dopo i lavaggi si risale

alla concentrazione serica degli ADA di tipo IgE. Il metodo ImmunoCAP (Phadia Diagnostics, Uppsala, Svezia) permette la quantificazione di questa classe applicando una tecnica ELISA in chimica secca in modo completamente automatizzato. Il principio di base è lo stesso, ma qui l'antigene in questione, invece che sul fondo di un pozzetto, viene immobilizzato su un supporto tridimensionale che consente una migliore esposizione dei determinanti antigenici. Il farmaco così disposto viene poi stabilizzato per la conservazione a lungo termine attraverso una saturazione con albumina, poi rimossa all'inizio del test attraverso dei lavaggi. Inoltre l'anticorpo secondario anti-IgE non è marcato con molecole radioattive, ma con l'enzima  $\beta$ -Galattosidasi; aggiungendo poi la soluzione di sviluppo contenente un substrato fluorogenico si ottiene il segnale letto in fluorescenza

- **Altre tecniche**

Nel corso degli ultimi anni lo sviluppo delle tecnologie ha permesso a nuove metodiche di emergere, quali la risonanza plasmonica di superficie (Surface Plasmon Resonance - SPR) e la elettrochemioluminescenza (ElectroChemiluminescence - ECL).

La SPR è una tecnica che permette di identificare e caratterizzare anticorpi diretti contro proteine terapeutiche misurandone direttamente l'attività di legame, se questo avviene. Il farmaco immobilizzato su un biosensore, metallico o di vetro, viene fatto reagire con il siero in esame. Se gli anticorpi contro il farmaco sono presenti, il loro legame con la molecola, assieme all'uso di un fascio di elettroni o di luce, provoca l'eccitazione dei plasmoni; i plasmoni di superficie, detti anche polaritoni, sono onde elettromagnetiche che si propagano parallelamente al supporto, e sono molto sensibili a qualsiasi cambiamento del biosensore, come ad esempio all'assorbimento di molecole sulla sua superficie. Le alterazioni si presentano come cambiamenti dell'indice di rifrazione del fascio, e sono direttamente proporzionali alla massa presente sul biosensore; queste oscillazioni vengono successivamente trasformate in un segnale proporzionale alla massa degli anticorpi che si sono legati. La misurazione in tempo reale consentita da questa tecnica permette di identificare anche anticorpi a bassa affinità, tipici della risposta umorale precoce, che si dissociano facilmente e non sono identificabili con le tecniche ELISA classiche. La caratterizzazione degli ADA, ovvero lo studio degli

isotipi presenti, è possibile in SPR grazie all'uso di reagenti isotipo-specifici. La limitazione principale di questa metodica è la dispendiosità della strumentazione necessaria [39].

La ECL sfrutta invece la capacità di sostanze quali il rutenio di emettere fotoni se sottoposti ad una variazione di potenziale elettrico. In questo test due quote uguali di farmaco vengono coniugate una con la biotina e una con il rutenio (Ru), un metallo di transizione della famiglia del ferro. Dopo aver fatto legare gli ADA serici con entrambe le molecole marcate, il complesso trimerico viene immobilizzato in pozzetti su cui è stata precedentemente fatta aderire streptavidina. L'applicazione di un campo elettrico tramite degli elettrodi collegati alla piastra attiva lo ione  $Ru^{2+3}$ , provocando l'eccitazione degli elettroni di valenza necessaria alla successiva emissione dei fotoni. L'intensità della radiazione luminosa viene infine quantificata e confrontata con una curva standard così da risalire alla concentrazione dell'analita in esame.

#### **4.2. Studio della risposta immune anti-farmaco di tipo cellulo-mediata**

La presenza di una risposta di tipo umorale sottende la presenza di una risposta cellulare T antigene-specifica. L'attivazione delle cellule T avviene in seguito alla presentazione dell'antigene da parte del complesso di MHC al recettore TCR espresso sulle cellule T. Questo segnale scatena il rilascio di  $Ca^2$  a livello intracellulare, che induce a sua volta l'attivazione dei geni necessari al riconoscimento dell'antigene. Entro poche ore i geni codificano per citochine (IL-2, 3, 4, 5 e 6, IFN- $\gamma$  e TGF- $\beta$ ) e vengono espressi vari marker di attivazione (CD40L, CD69, CD25, CD71). Entro 1-2 giorni dall'attivazione, l'interleuchina-2 induce la proliferazione delle cellule T che, entro 3-5 giorni, si differenziano a livello funzionale, attraverso la produzione di diversi pattern citochinici. Il fenotipo e quindi le funzioni effettrici dipendono dal tipo di cellule T specifiche che si sono generate nella fase di sensibilizzazione all'antigene.

Test *in vitro* hanno lo scopo di studiare la presenza di cellule T della memoria farmaco-specifiche, che si sono originate durante lo sviluppo di una reazione immune indotta dal trattamento.

Il test *in vitro* comunemente più utilizzato per lo studio della risposta immune T-mediata è il test di proliferazione (Lymphocyte transformation test: LTT) su cellule

mononucleate (PBMC) di sangue periferico. PBMCs ottenuti dal sangue di un paziente trattato con il farmaco, vengono messi in coltura con dosi crescenti del farmaco di interesse. Dopo 5 giorni si studia l'attivazione e la proliferazione delle cellule T mediante l'aggiunta di timidina  $^3\text{H}$ . Lo studio delle citochine prodotte, mediante test ELISA o tecniche di ELISPOT, permette inoltre di caratterizzare la risposta T: una elevata produzione di citochine di tipo Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) pare essere associata alle reazioni ritardate, mentre pazienti con reazioni immediate producono principalmente IL-4, caratteristica di una risposta di tipo Th2. Oltre a valutare la proliferazione e la produzione delle citochine, l'attivazione delle cellule T può essere inoltre studiata determinando l'up-regolazione di marker di superficie (CD40L, CD69) o l'espressione di mediatori citotossici (granzima B, CD107a) [40].

In un sistema di questo tipo, sono però coinvolte molte cellule della risposta immune e quello che si ottiene è una risposta specifica eterogenea che può essere sostenuta da monociti, cellule B e cellule T. Per aumentare la specificità del test sono stati messi a punto nuovi test *in vitro* in grado di amplificare la risposta T-specifica, come il test di amplificazione della risposta antigene-specifica mediante induzione di linee cellulari (TCL) e cloni o la cocoltura *in vitro* di APC e cellule T.

Nel primo caso PBMCs del paziente vengono messi in coltura con il farmaco di interesse, la proliferazione antigene-specifica viene amplificata grazie all'aggiunta di IL-2 nel terreno di coltura. Dopo 14 giorni le linee cellulari sono clonate attraverso diluizioni seriali e i cloni T-specifici vengono studiati a 3 giorni con l'aggiunta di APC autologhe "pulsate" con l'antigene. La valutazione della proliferazione può essere implementata dalla caratterizzazione dei cloni T, che può essere effettuata in termini di fenotipo CD (CD4+ o CD8+), repertorio V $\beta$  e espressione del recettore CLA [41].

Negli ultimi anni i progressi della ricerca scientifica hanno permesso di ottenere test sempre più purificati per lo studio della risposta T antigene specifica. Attraverso citoflorimetria o utilizzando biglie magnetiche, è possibile isolare cellule T CD4+ purificate e APC. In uno studio per valutare l'immunogenicità di differenti formulazioni di interferon- $\beta$ 1a, approvate per il trattamento delle sclerosi multipla, Dc sono isolate da monociti di sangue periferico e fatte maturare *in vitro*. Dopo essere incubate con l'antigene per 6 ore, le divengono in grado di funzionare come cellule presentanti e quindi

sono messe in coltura con le cellule T, inducendone un'attivazione antigene-specifica. Tale tecnica ha permesso di eliminare l'azione diretta dell'interferone sulle cellule T, consistente in una inibizione della loro attivazione e proliferazione [42]. Lo studio della risposta T di tipo effettore può essere inoltre migliorata eliminando le Treg CD4+/CD25+.

La sensibilità dei test *in vitro* dipende da alcuni fattori, come il tipo di farmaco biologico studiato (principalmente per le sue funzioni effettrici) e il momento in cui viene effettuato il test rispetto alla reazione al farmaco. La riuscita di un test *in vitro* richiede la presenza di cellule T specifiche per il farmaco nel sangue del paziente reattivo, la permanenza e la frequenza di queste cellule in circolo ha un impatto fondamentale per lo studio dell'immunogenicità. Se il test viene effettuato troppo vicino alla fase acuta della reazione, il sistema immunitario è ancora fortemente attivato e si possono ottenere elevati livelli di background con una conseguente sottostima del risultato del test. Il problema però sussiste anche se ci si allontana troppo dalla reazione: la permanenza delle cellule T può infatti variare da mesi a anni e dipende dalla gravità delle manifestazioni cliniche della reazione.

## SCOPO DELLA TESI

La tesi si prefigge due scopi:

- 1) Lo sviluppo di test in grado di analizzare sia la risposta umorale che cellulare indotte dalla terapia con farmaci biologici in soggetti affetti da malattie immunomediate.
- 2) L'analisi mediante studi *in vitro* su cellule umane dei meccanismi fisiopatologici che sottendono l'immunogenicità dei farmaci biologici.

In particolare sono stati presi in esame pazienti trattati con i seguenti anticorpi monoclonali: infliximab, adalimumab e rituximab. Successivamente sono state effettuate correlazioni cliniche tra lo sviluppo di anticorpi anti-farmaco e la perdita di efficacia e/o comparsa di reazioni avverse, con il fine di poter utilizzare i suddetti test a scopo preventivo per incrementare la sicurezza del trattamento.

## MATERIALI E METODI

### 1. Pazienti

Per lo studio sono stati arruolati 245 pazienti (121 maschi e 124 femmine) affetti da patologia cronica immunomediata (48 pazienti con AR, 67 con Spondiloartriti Sieronegative, 95 con Malattie Infiammatorie Croniche dell'Intestino [IBD], 35 con Vasculiti Sistemiche) in trattamento con infliximab (n=216) o con adalimumab (n=29). I farmaci sono stati somministrati in associazione a metotrexato (MTX) a seconda delle indicazioni cliniche.

Ai pazienti trattati con infliximab sono stati somministrati 3 mg/kg o 5 mg/kg ogni 6-8 settimane. I pazienti trattati con adalimumab hanno ricevuto 40 mg di farmaco ogni 2 settimane. I campioni di siero sono stati prelevati immediatamente prima della somministrazione del farmaco e congelati a -20°.

Al momento dell'analisi i pazienti trattati con infliximab sono stati suddivisi nei seguenti sottogruppi basandosi su dati clinici:

- *Pazienti Responder*: 104 soggetti che presentavano una risposta al farmaco, valutabile tramite indici validi per la singola patologia, per tutta la durata dell'intervallo tra le somministrazioni durante la terapia di mantenimento (8 settimane per infliximab e 2 per adalimumab).

- *Pazienti Non Responder*: 71 pazienti che non presentavano alcuna risposta al farmaco durante la terapia di mantenimento, anche se venivano ridotti gli intervalli tra le somministrazioni.

- *Pazienti Reattivi (ADR)*: 33 pazienti che presentavano reazioni immediate o ritardate all'infusione o alla iniezione sia durante la terapia di induzione che durante la terapia di mantenimento. Le reazioni sistemiche sono classificate come lievi, moderate o gravi in

accordo al sistema di gradazione per le reazioni da ipersensibilità generalizzata proposto da *Brown et al. [Brown SG, 2004]*.

- *Pazienti ADR/Non responder*: 9 pazienti che hanno sviluppato una risposta parziale o nulla in concomitanza con un evento avverso al farmaco (ADR).

La ricerca degli anticorpi anti-farmaco è stata effettuata anche su un ristretto gruppo di pazienti trattati con rituximab (n=33) e affetti da malattie linfoproliferative (n=16) e autoimmuni (n=17), come Artrite Reumatoide, Anemia Emolitica, LES e Piastrinopenia autoimmune.

## **2. Dosaggio degli anticorpi anti-infliximab (ATI), anti-adalimumab (AAA) e anti-rituximab (anti-RTX)**

E' stato messo a punto un assay di screening in grado di identificare la presenza di ADA non isotipo-specifici nel siero di soggetti in trattamento con infliximab, adalimumab e rituximab. Si tratta di un test ELISA di tipo "bridging-assay", il cui protocollo viene descritto in modo dettagliato nei risultati.

Su sieri di pazienti trattati con infliximab e rituximab è stata inoltre effettuata una caratterizzazione isotipica: i sieri risultati positivi al test di screening sono stati analizzati al fine di identificarne l'isotipo (IgE) mediante ImmunoCAP Phadia.

## **3. Requisiti di validazione**

La validazione è il processo che dimostra, attraverso l'uso di indagini specifiche di laboratorio, che un metodo ha le caratteristiche necessarie ad assicurarne l'attendibilità in ambito analitico. Per quanto riguarda la validazione di tecniche immunologiche per l'identificazione di anticorpi anti-farmaco i requisiti minimi a cui deve rispondere il test sono:

- Screening Cut-Point: viene definito come il livello di risposta al test di screening sopra il quale il campione è definito potenzialmente positivo, per la presenza di anticorpi anti-farmaco (ADA), e sotto il quale è probabilmente negativo. Questo

valore viene stabilito in studi di pre-validazione con una valutazione statistica e sistematica eseguita su un numero di campioni (generalmente 50), ritenuti rappresentativi di una popolazione di pazienti affetti non trattati col farmaco. Lo Screening Cut-Point si ottiene applicando la seguente formula: **Valori Medi + (Deviazione Standard X 1.645)**. Il Cut-Point così calcolato è tale da ridurre ad un valore di circa il 5% i risultati falsi positivi.

- **Confirmatory Cut-Point**: al fine di confermare che il test di screening individuati i campioni veri positivi è stato introdotto il Confirmatory Cut-Point, che corrisponde al grado di inibizione dato dall'aggiunta del farmaco ad un campione positivo. Per individuare questo valore vengono messe in piastra due aliquote di 15 campioni già usati per la determinazione dello screening; a 30 µl di una delle aliquote si aggiunge 10 µl di farmaco a una concentrazione di 1 mg/ml, all'altra 10 µl di buffer. Si esegue il test, e dal confronto dei due valori si calcola la singola inibizione percentuale: **100 X [1-(Segnale siero addizionato / Segnale siero non addizionato)]**. Si calcola la media e la deviazione standard delle inibizioni percentuali. Il valore finale del Confirmatory Cut-Point viene poi così determinato: **Valore Medio + (Deviazione Standard X 3.09)**. Durante l'esame di campioni clinici, per confermare eventuali positività, si effettua lo stesso procedimento di inibizione sugli ADA del campione; se la percentuale di inibizione del segnale è uguale o superiore al Confirmatory Cut-Point si raggiunge la certezza della SPECIFICITA' degli ADA verso il farmaco.
- **Precisione Inter-Assay**: la precisione Inter-Assay di un controllo positivo e di uno negativo identifica la variazione casuale delle medie dei controlli, analizzati in più test durante uno specifico arco di tempo. Il valore finale della precisione, ovvero il coefficiente di variazione (CV%), viene così calcolato per entrambi i controlli: **CV%= (Deviazione Standard/Media) X 100**
- **Precisione Intra-assay**: la precisione Intra-Assay quantifica la variazione casuale del segnale di un controllo positivo analizzato più volte nello stesso test. Permette di identificare la variabilità di un test ripetuto più volte con gli stessi reagenti in una medesima piastra. Viene calcolato effettuando più misurazioni su un certo numero di diluizioni del controllo positivo. Poi, come sopra, si calcola la media, la SD e infine il

CV%. Sia per la Inter-Assay che per la Intra-Assay Precision il CV% deve rimanere al di sotto del 25%.

- Sensibilità del test: la sensibilità di un saggio viene definita come la più bassa concentrazione di un controllo positivo che genera un segnale uguale o appena superiore allo Screening Cut-Point. La sensibilità si basa esclusivamente sulle caratteristiche del controllo positivo, specialmente sulla sua capacità di interagire con la molecola tale da permettere la rilevazione del segnale. Questa valutazione è usata solo per stimare la sensibilità del test in unità di massa, e non deve essere usata per calcolare la concentrazione di campioni clinici. Per trovare questo valore è preferibile usare un anticorpo monoclonale o un anticorpo anti-farmaco purificato per cromatografia di affinità (“affinity-purified antibody”) a concentrazione nota. Si effettuano misurazioni del controllo positivo a diluizioni scalari, tali da permettere l’identificazione della concentrazione che emette il segnale pari al Cut-Point [43].

#### **4. Studio *in vitro* della risposta immune anti-farmaco di tipo cellulo-mediata**

La presenza di cellule T specifiche per rituximab è stata studiata mediante un test di proliferazione a duplice step. PBMCs di sangue periferico di pazienti trattati con rituximab, sono stati inizialmente messi in coltura ( $10^6$  cellule/pozzetto; 48 wells) con terreno completo con il 5% di siero umano scomplementato, in assenza o presenza di rituximab (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Dopo 7 giorni le cellule (150.000 cell/pozzetto; 96 wells) sono state trasferite in 96 wells, con cellule mononucleate autologhe irradiate (50.000 cellule/pozzetto) e ristimate per altri 5gg con terreno, in assenza o presenza di rituximab a dosi crescenti (0.1, 1, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) o PMA/ionomicina.

La caratterizzazione della risposta cellulare è stata effettuata tramite il dosaggio di citochine quali IL-13 e INF- $\gamma$  nei surnatanti ottenuti a 5 giorni, mediante kit ELISA commerciali (R&D Systems, Minneapolis, MN).

## RISULTATI

### 1. MESSA A PUNTO DI UN TEST ELISA “BRIDGING ASSAY” PER IL DOSAGGIO DI ANTICORPI ANTI-FARMACO

#### 1.1. Scelta del test

Durante il nostro studio abbiamo inizialmente messo a punto un “double antigen bridging immunoassay” per identificare la presenza di anticorpi anti-farmaco nel siero di soggetti trattati con infliximab (IFX). I test ELISA di tipo “bridging” prevedono che gli anticorpi anti-farmaco facciano da ponte a due molecole di farmaco stesso, una legata al fondo del pozzetto e una coniugata, permettendo di individuare la presenza di anticorpi in modo non isotipo-specifico (Fig. 3). Per aumentare la performance e la sensibilità del test, abbiamo, inoltre, preferito utilizzare un “one-step format assay”. Questo ci ha permesso, infatti, di ridurre l’effetto della variabilità di concentrazione del coating e di aumentare l’abilità del test nel detectare anticorpi a bassa affinità, che potrebbero essere persi nei molteplici lavaggi richiesti da un “double-step format assay”. Poiché non possedevamo un controllo positivo umano, abbiamo “settato” il nostro assay utilizzando un anticorpo “affinity purified” (rabbit anti-human IgG (H+L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA).

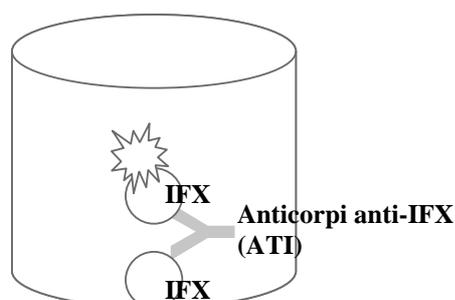


Figura 3: Bridging Assay.

Per la messa a punto del test in particolare:

- Abbiamo effettuato diluzioni seriali di IFX (100, 10 e 1 ng/well) per determinare quale fosse la concentrazione ottimale di antigene per il coating delle piastre. La concentrazione di 10 ng/well è stata scelta per le analisi successive.
- L'affinity purified è stato testato a differenti concentrazioni (31, 63, 125 e 250 ng/ml) per determinare la sua abilità nel formare il "bridge"
- L'IFX è stato coniugato con l'enzima perossidasi (Horseradish peroxidase, HRP) utilizzando l'EZ-link Plus Activated Peroxidase Kit (Pierce Biotechnology) mediante una coniugazione a pH 9.4 in Buffer Carbonato-Bicarbonato
- Abbiamo utilizzato l'IFX-coniugato alla diluzione di 1:8.000

Gli stessi step sono stati seguiti per la messa a punto di un test diagnostico in grado di detectare i livelli sierici di anticorpi anti-adalimumab e anti-rituximab.

## **1.2. Il protocollo del test**

Piastre Nunc (96 wells) sono state coatate con il farmaco biologico (10 ng/well) in Buffer Carbonato-Bicarbonato pH 9.4 (100 µl/well) e incubate overnight a 4°C. Dopo l'incubazione abbiamo aspirato il contenuto e aggiunto una soluzione di PBS + BSA al 3% (200 µl/well) per saturare. Dopo un'incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, le piastre sono state lavate con una soluzione di TBS + TWEEN 0.05% e sono quindi stati aggiunti i campioni di siero da analizzare (50 µl/well, diluiti 1:100) contemporaneamente al farmaco-coniugato (50 µl/well, diluito 1:8000 in Buffer Carbonato-Bicarbonato). Dopo un'ulteriore incubazione di 2 ore a temperatura ambiente, abbiamo lavato nuovamente le piastre e aggiunto 100 µl/well di TMB (tetramethyl benzidine), substrato della perossidasi per la colorazione. Dopo 30 minuti di incubazione a temperatura ambiente, abbiamo terminato la reazione colorimetrica con 50 µl/well di acido fosforico 2mM. Le piastre sono state analizzate mediante spettrofotometro (lettura a 450nm).

## **2. VALIDAZIONE DEI TEST DIAGNOSTICI:**

La validazione dei test per la rivelazione di anticorpi anti-infliximab e anti-adalimumab è stata eseguita mediante la valutazione dei seguenti parametri di performance diagnostica:

- Screening Cut-Point: 50 sieri di pazienti affetti da patologie immunomediate, non trattati con farmaci biologici anti-TNF- $\alpha$ , sono stati sottoposti al dosaggio degli anticorpi anti-farmaco, per 3 volte e in 3 giorni distinti. Lo Screening Cut-Point è stato calcolato applicando la seguente formula: **Valori Medi + (Deviazione Standard\*1.645)**. Il valore definitivo, individuato dalla media dei tre risultati, corrisponde ad un valore di densità ottica (OD) pari a 0.091 per il test per la ricerca degli anticorpi anti-infliximab e a 0.638 per gli anticorpi anti-adalimumab.
- Confirmatory Cut-Point: per la determinazione di questo parametro abbiamo utilizzato 15 sieri *naïve*, ognuno dei quali è stato suddiviso in due aliquote: ad una è stato aggiunto il farmaco (1 mg/ml) e all'altra un volume equivalente di tampone. Dopo aver eseguito il test, dal confronto dei due valori ottenuti ci siamo calcolati la singola inibizione percentuale: **100\*[1-(OD siero addizionato/OD siero non addizionato)]**. Mediante la media delle singole inibizioni percentuali abbiamo determinato il valore finale del Confirmatory Cut-Point utilizzando la seguente formula: **Valore medio + (Deviazione Standard\*3.09)**. Il calcolo effettuato ha consentito di assumere come Confirmatory Cut-Point per infliximab una percentuale pari al 21% e per adalimumab pari al 24%.
- Variabilità inter- e intra-assay: sulla base di 10 misurazioni distinte effettuate nell'arco di 28 mesi, la variabilità inter-assay è stata calcolata come coefficiente di variazione **CV% = (Deviazione Standard/Media)\*100**. Per il test di detezione degli anticorpi anti-infliximab è stato identificato un coefficiente di variabilità per il controllo positivo di 11.6% e per il negativo di 20.4%, per adalimumab rispettivamente di 14.4% e 22.3%. Un controllo positivo ed uno negativo, dosati per otto replicati nell'ambito dello stesso dosaggio, sono stati impiegati per la determinazione della variabilità intra-assay. Ottenute la media e la deviazione standard ci siamo calcolati il CV%: per la ricerca degli anticorpi anti-infliximab è

risultato 8.3% per il controllo positivo e 24.8% per il controllo negativo, per adalimumab rispettivamente 7.1% e 20.8%

- Sensibilità del test: per la determinazione della sensibilità analitica dei test diagnostici abbiamo effettuato la misurazione del segnale in OD emesso da diluzioni seriali di un anticorpo di coniglio “affinity purified” di concentrazione nota. La più bassa concentrazione ancora in grado di fornire un segnale di OD superiore al Cut-Point è risultata pari a 0.06 ng/ml e 15.6 ng/ml rispettivamente per il test per la detezione degli anticorpi anti-infliximab e anti-adalimumab. Tali valori sono stati assunti come sensibilità dei due test.

Nella Tabella 1 sono riportati i valori ottenuti dalla procedura di validazione dei 2 test presi in esame nello studio.

**Tabella 1. Schema riassuntivo dei valori individuati per la validazione dei due test.**

	ELISA Ig anti-infliximab	ELISA Ig anti-adalimumab
<b>Screening Cut-Point (OD)</b>	0,091	0,638
<b>Confirmatory Cut-Point (Inibizione %)</b>	21%	24%
<b>Precisione Inter-Assay (CV)</b>	K+ 11,6% K- 20,4%	K+ 14,4% K- 22,3%
<b>Precisione Intra-Assay (CV)</b>	K+ 8,3% K- 24,8%	K+ 7,1% K- 20,8%
<b>Sensibilità (ng/ml)</b>	0,06	15,6

*OD: densità ottica; CV: coefficiente di variazione percentuale; K+: controllo positivo; K-: controllo negativo*

### 3. ANALISI SIERICA DEGLI ANTICORPI ANTI-FARMACO IN PAZIENTI AFFETTI DA MALATTIE IMMUNOMEDIATE E TRATTATI CON ANTAGONISTI DEL TNF- $\alpha$

#### 3.1. Correlazione tra presenza di anticorpi anti-farmaco, perdita di efficacia del trattamento e sviluppo di reazioni avverse al farmaco

Inizialmente abbiamo verificato l'incidenza di anticorpi anti-farmaco in pazienti trattati con infliximab e adalimumab. Nell'ambito della casistica dei 216 pazienti trattati con infliximab, 67 (31%) soggetti sono risultati positivi alla ricerca degli anticorpi anti-farmaco non isotipo-specifici (Tabella 2).

**Tabella 2: Incidenza degli anticorpi anti-infliximab (ATI) in pazienti trattati con infliximab**

	<b>AR (44)</b>	<b>Spondiloartrite (64)</b>	<b>BID (75)</b>	<b>Vasculite (35)</b>	<b>Totali (216)</b>
<b>ATI+</b>	13 (29.5%)	15 (29.5%)	29 (39.7%)	10 (28.6%)	<b>67 (31%)</b>
<b>ATI-</b>	31 (70.5%)	49 (76.6%)	44 (60.3%)	25 (71.4%)	<b>149 (68%)</b>

Successivamente abbiamo analizzato l'eventuale correlazione tra sviluppo di immunogenicità e possibili conseguenze cliniche, come la perdita di efficacia del farmaco e lo sviluppo di eventi avversi infusionali.

Nell'ambito dei pazienti trattati con infliximab il 32.9% (71 su 216) ha dimostrato perdita di efficacia al trattamento. Di questi pazienti non responder, il 31% (22 su 71) è risultato positivo agli anticorpi anti-infliximab. Tale percentuale si è dimostrata significativamente maggiore ( $p=0.0018$ ) rispetto a quella evidenziata tra i soggetti responder (12 su 104, 11.5%). L'incidenza di anticorpi anti-infliximab è stata, infine, valutata nei 41 (19%) pazienti che hanno sviluppato reazioni infusionali al farmaco di tipo lieve, moderato o severo. Di questi la maggior parte (33 su 41, 80.5%;  $p<0.0001$ ) ha presentato positività agli anticorpi anti-infliximab non isotipo-specifici. In 9 dei 41 soggetti la reazione infusione si è associata inoltre ad una resistenza al trattamento. La totalità di questo sottogruppo (ADR/Non responder) ha presentato positività per li anticorpi anti-infliximab (Tabella 3).

**Tabella 3: Presenza di anticorpi anti-infliximab (ATI) e conseguenze cliniche**

	<b>Responder (104)</b>	<b>Non Responder Parziali (30)</b>	<b>Non Responder Totali (41)</b>	<b>ADR (32)</b>	<b>ADR/Non Responder (9)</b>
<b>ATI+</b>	12 (11.5%)	5 (16.7%)	17 (41.5%)	24 (75%)	9 (100%)
<b>ATI-</b>	92 (88.5%)	25 (83.3%)	24 (58.5%)	8 (25%)	0 (0%)

Per quanto concerne il trattamento con adalimumab, 5 (17.2%) soggetti dei 29 pazienti analizzati sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-adalimumab non isotipo-specifici (Tabella 4).

**Tabella 4: Incidenza degli anticorpi a anti-adalimumab (AAA) in pazienti trattati con adalimumab**

	<b>AR (4)</b>	<b>Spondiloartrite (3)</b>	<b>BID (22)</b>	<b>Totali (29)</b>
<b>AAA+</b>	1 (25%)	2 (66.7%)	2 (9.1%)	<b>5 (17.2%)</b>
<b>AAA-</b>	3 (75%)	1 (33.3%)	20 (90.9%)	<b>24 (82.8%)</b>

### **3.2. Associazione tra sviluppo di anticorpi anti-farmaco, livelli di farmaco circolante ed efficacia terapeutica.**

In considerazione del fatto che gli anticorpi anti-farmaco possono modificare la farmacocinetica degli antagonisti del TNF- $\alpha$ , abbiamo valutato in una parte (n=168) dei nostri pazienti trattati con infliximab la correlazione tra presenza nel siero di anticorpi anti-farmaco, livelli di farmaco circolante e risposta clinica al trattamento.

I soggetti non responder al trattamento hanno dimostrato minori livelli di farmaco circolante rispetto ai soggetti responder ( $8.83 \pm 1.83$  vs  $10.37 \pm 1.38$   $\mu\text{g/ml}$ ), sebbene tale differenza non abbia raggiunto la significatività statistica

Tuttavia dividendo la nostra casistica in due gruppi sulla base della presenza o assenza di anticorpi anti-infliximab, è emerso che i livelli medi di farmaco circolante sono risultati significativamente più bassi nei soggetti con ATI rispetto a coloro risultati negativi a tali anticorpi ( $2.48 \pm 0.14$  vs  $11.6 \pm 1.36$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0.00001$ ).

Una diminuzione significativa di farmaco circolante è emersa anche per adalimumab nei pazienti AAA positivi rispetto ai pazienti negativi per AAA ( $6.9 \pm 2.7$  vs  $36.1 \pm 5.8$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0.01$ ).

Questi dati dimostrano che la formazione di immunocomplessi induce un aumento del metabolismo del farmaco.

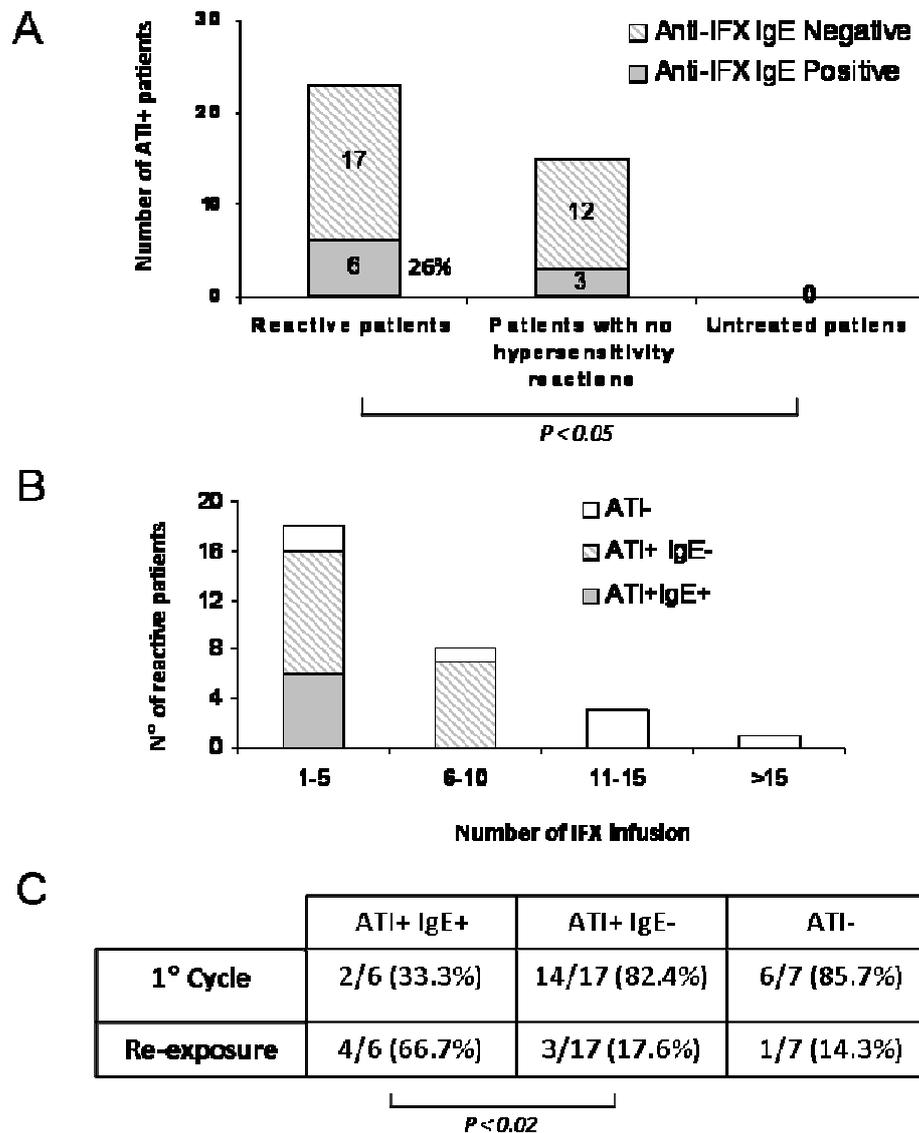
#### **4. RICERCA DEGLI ANTICORPI ANTI-INFLIXIMAB DI ISOTIPO IgE IN PAZIENTI CHE HANNO SVILUPPATO UNA REAZIONE AVVERSA A INFLIXIMAB**

In un gruppo ristretto di pazienti abbiamo studiato la presenza di ATI di tipo IgE mediante ImmunoCAP Phadia. Per l'analisi sono stati presi in esame 30 pazienti reattivi a infliximab, 20 controlli di malattia non trattati, 15 pazienti responsivi alla terapia e 15 pazienti che avevano manifestato una perdita di risposta al trattamento con infliximab.

Per prima cosa abbiamo valutato le caratteristiche cliniche delle reazioni e abbiamo osservato che nella maggior parte dei casi i pazienti mostravano principalmente sintomi cutanei e respiratori. Abbiamo inoltre osservato la stessa incidenza (33.3%) del tipo di reazione, lieve, moderata o severa. La maggior parte dei pazienti reattivi sono risultati positivi per ATI non isotipo-specifici, (23 su 30; 76.6%) e la presenza delle IgE IFX-specifiche è stata riscontrata in 6 di questi (26%). L'incidenza di pazienti positivi per ATI è simile nel gruppo dei pazienti non responder (11 su 15; 73.3%), mentre cala significativamente nei pazienti responsivi al trattamento (4 su 15; 26.6%.  $p < 0.003$ ). Mentre i soggetti non trattati sono risultati negativi per ATI, IgE anti-IFX sono state inoltre trovate in 3 dei 30 pazienti non reattivi, ma trattati con infliximab (10%) (Fig. 4A).

Abbiamo successivamente studiato la cinetica dell'insorgenza delle reazioni avverse correlandole alla presenza degli anticorpi anti-infliximab anche della classe IgE. La maggior parte (26 casi su 29; 89.6%) delle reazioni si è verificata entro la 10° infusione, mentre nessun evento avverso è stato registrato alla prima infusione del farmaco. Infine è

emerso che i soggetti reattivi con dimostrata positività per anticorpi della classe IgE hanno sviluppato le reazioni in tempi significativamente più precoci ( $2.4 \pm 0.2$  infusioni) rispetto sia ai soggetti IgE-negativi ( $5.3 \pm 0.7$ ;  $p < 0.02$ ) sia a coloro che non avevano anticorpi anti-infliximab ( $6.6 \pm 0.6$ ;  $p < 0.02$ ) (Fig. 4B). Inoltre la maggior parte delle reazioni IgE mediate avvengono alla riesposizione ad infliximab, dopo un periodo di interruzione del trattamento (66.7% vs 17.6%;  $p < 0.02$ ) (Fig. 4C).



**Figura 4:** (A) Incidenza dei pazienti anti-IFX IgE positivi.  
 (B) Cinetica dell'insorgenza delle reazioni avverse.  
 (C) La maggior parte delle reazioni IgE mediate avvengono alla riesposizione ad infliximab.

**Tabella 5: Informazioni cliniche e risultato ai test in vivo e in vitro dei pazienti reattivi**

Paziente (malattia)	Grado della reazione	Numero di infusione alla reazione	ADA non isotipo-specifici	ADA IgE	IgE Totali (kU/L)	Prick test	IDT
1 (BID)	severa	2nd (ri-esposizione)	pos	pos	24.4	neg	pos
2 (BID)	moderata	6th	pos	neg	22.4	neg	neg
3 (BID)	lieve	2nd (ri-esposizione)	pos	neg	79.1	neg	neg
4 (BID)	moderata	7th	pos	neg	4.9	neg	neg
5 (BID)	moderata	3rd	pos	neg	15.6	neg	neg
6 (BID)	moderata	5th	pos	neg	68	ND	ND
7 (BID)	severa	2nd (ri-esposizione)	neg	neg	9.5	ND	ND
8 (BID)	lieve	2nd	pos	neg	14	neg	neg
9 (BID)	lieve	14th	neg	neg	26.5	ND	ND
10 (BID)	severa	3rd (ri-esposizione)	pos	neg	18.8	pos	pos
11 (BID)	severa	4th (ri-esposizione)	pos	neg	51.5	neg	neg
12 (RA)	severa	2nd (ri-esposizione)	pos	pos	58.8	neg	pos
13 (RA)	moderata	7th	pos	neg	68,3	neg	neg
14 (RA)	moderata	2nd	pos	neg	15,7	neg	neg
15 (RA)	moderata	3rd	pos	neg	25.1	neg	neg
16 (RA)	moderata	4th	pos	neg	<2	neg	neg
17 (RA)	lieve	3rd	pos	pos	276	neg	pos
18 (RA)	lieve	6th	neg	neg	2.8	ND	ND
19 (RA)	lieve	4th	neg	neg	18.3	ND	ND
20 (SPA)	lieve	9th	pos	neg	48	neg	neg
21 (SPA)	lieve	3rd (ri-esposizione)	pos	pos	39.4	neg	pos
22 (SPA)	lieve	9th	pos	neg	21.1	neg	neg
23 (SPA)	severa	2nd (ri-esposizione)	pos	pos	16.7	neg	pos
24 (SPA)	moderata	4th	pos	neg	91.2	neg	neg
25 (VAS)	severa	9th	pos	neg	529	neg	neg
26 (VAS)	severa	2nd	pos	pos	12.3	neg	pos
27 (VAS)	severa	11th	neg	neg	<2	ND	ND
28 (VAS)	moderata	12th	neg	neg	36.4	neg	neg
29 (VAS)	lieve	23th	neg	neg	4.1	neg	neg
30 (VAS)	severa	9th	pos	neg	1431	ND	ND

*BID: Malattie Infiammatorie Croniche dell'Intestino; RA: Artrite Reumatoide; SPA: Spondilite Anchilosante; VAS: Vasculite; ADAs: anti-drug antibodies; IDT: intradermal test; ND: non disponibile*

Contemporaneamente su 23 pazienti reattivi e sui controlli sono stati effettuati test cutanei intradermici (IDT) utilizzando 0.02 ml di una soluzione contenente infliximab a concentrazioni crescenti (0.01 mg/ml – 10 mg/ml). La positività al test è stata valutata come la comparsa di un ponfo di diametro maggiore a 3 mm. Ai test cutanei sono risultati positivi i 6 pazienti reattivi positivi per IgE e un paziente reattivo che non presentava IgE

specifiche per infliximab (Tabella 5). Tale risultato rinforza l'ipotesi che la reazione al farmaco sia sostenuta da un meccanismo IgE-mediato. Analizzando le caratteristiche cliniche delle reazioni manifestate dai pazienti presi in esame, abbiamo inoltre osservato che i pazienti che hanno sviluppato reazioni severe mostrano una significativa maggiore incidenza di positività ai test cutanei rispetto a quelli che hanno sviluppato reazioni moderate o lievi (71.4% vs 12.5%;  $p<0.02$ ). Nei soggetti cuti-positivi non è stata evidenziata nessuna positività ai test cutanei dopo 8 mesi, né per ADA IgE.

## 5. STUDIO DELLA RISPOSTA IMMUNE DI TIPO UMORALE E CELLULARE A RITUXIMAB

### 5.1. Analisi sierica degli anticorpi anti-farmaco in pazienti affetti da malattie ematologiche e autoimmuni in trattamento con rituximab.

Successivamente abbiamo studiato l'immunogenicità di un altro farmaco biologico chimerico, il rituximab, utilizzato principalmente per il trattamento di malattie linfoproliferative e, recentemente, delle malattie immunomediate. Grazie ad un test ELISA "Bridging Assay" sviluppato in proprio nel laboratorio come in precedenza per l'identificazione degli anticorpi anti-infliximab e anti-adalimumab, abbiamo studiato la presenza di anticorpi anti-rituximab non isotipo-specifici in sieri di pazienti affetti da malattie linfoproliferative e autoimmuni, trattati con rituximab.

Nell'ambito della casistica dei 33 pazienti trattati con rituximab 2 soggetti (6.1%) sono risultati positivi alla ricerca degli anticorpi anti-farmaco non isotipo-specifici (Tabella 6).

**Tabella 6: Incidenza degli anticorpi anti-rituximab (anti-RTX) in pazienti trattati con rituximab**

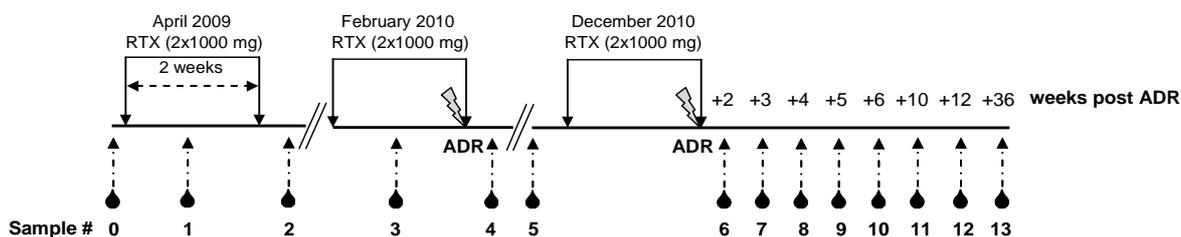
	Malattie Linfoproliferative (16)	Malattie autoimmuni (17)
Anti-RTX+	0 (0%)	2 (11.8%)
Anti-RTX-	16 (100%)	15 (88.2%)

Successivamente, come abbiamo fatto in precedenza per infliximab, abbiamo voluto dimostrare l'associazione tra reazioni avverse a rituximab e sviluppo di anticorpi anti-RTX di isotipo IgE.

## 5.2. Reazioni avverse a rituximab: dimostrazione di un meccanismo IgE-mediato e di una risposta immune anti-farmaco di tipo Th2.

### 5.2.1. Case report

Per valutare l'ipotesi che le reazioni avverse a rituximab potessero essere sostenute anche da un meccanismo IgE-mediato, abbiamo studiato il caso di una donna di 46 anni affetta da una sindrome overlap (Sclerosi Sistemica e Artrite Reumatoide) e che ha cominciato il trattamento con rituximab nell'Aprile del 2006 (2 somministrazioni da 1000 mg). Dopo 10 mesi ha iniziato un secondo ciclo di somministrazioni di rituximab e alla fine della seconda somministrazione ha manifestato prurito, nausea, dolori addominali e lievi problemi respiratori. Nel Dicembre 2010, in seguito ad un peggioramento della malattia, le è stato somministrato un terzo ciclo di rituximab. Dopo pochi minuti l'inizio della seconda infusione, la paziente ha sviluppato una reazione severa immediata a rituximab caratterizzata da broncospasmo, ipotensione, orticaria e dolore addominale (Fig. 5).



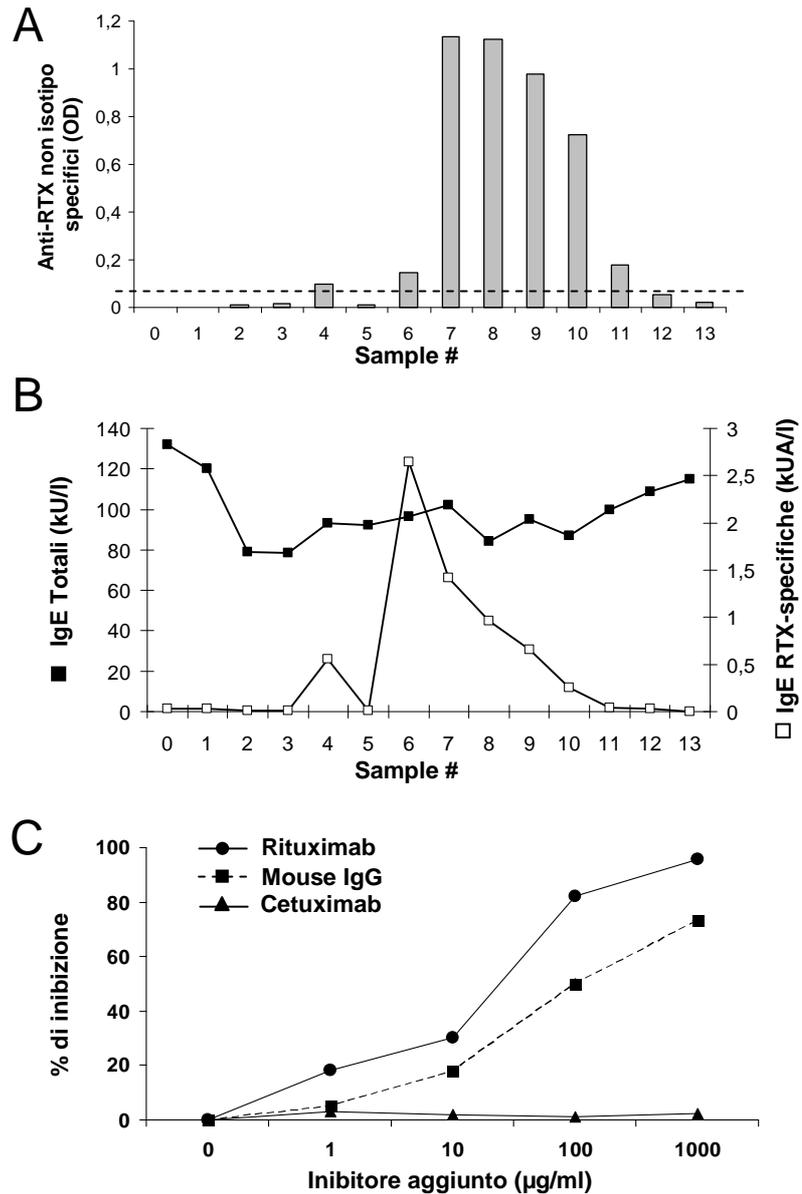
**Figura 5:** Cinetica della terapia con rituximab (RTX), reazioni avverse, campionamento del siero.  
◆: campionamento sierico; ADR (adverse drug reaction).

### **5.2.2. Ricerca degli anticorpi anti-RTX di tipo IgE in un paziente che ha sviluppato una reazione avversa a rituximab**

Abbiamo inizialmente studiato l'andamento degli anticorpi anti-RTX non isotipo-specifici nel tempo: gli anticorpi anti-RTX sono detectabili nel siero della paziente dopo la prima (a basso titolo) e dopo la seconda (ad alto titolo) reazione al farmaco. Il loro monitoraggio ne evidenzia, inoltre, una progressiva riduzione del titolo, fino al loro azzerarsi 12 settimane dopo la seconda reazione (Fig. 6A).

Successivamente mediante ImmunoCAP è stata dimostrata la presenza di anticorpi anti-RTX di isotipo IgE (2,65 kUA/l) (Fig 6B). Attraverso un test di inibizione abbiamo evidenziato una diminuzione dose-dipendente dei livelli di IgE in seguito all'aggiunta di dosi crescenti di RTX e di IgG murine, ma non di cetuximab, confermando la specificità del test (Fig. 6C).

Il monitoraggio nel tempo dei livelli di IgE specifiche ha dimostrato una progressiva e rapida diminuzione del titolo anticorpale.



**Figura 6:** (A) Andamento degli anticorpi anti-RTX nel siero del paziente reattivo a rituximab. (B) IgE totali e RTX-specifiche nel siero del paziente reattivo a rituximab. (C) Test di inibizione delle IgE RTX-specifiche.

A conferma che la reazione era sostenuta da un meccanismo IgE-mediato, tre settimane dopo la seconda reazione sono stati effettuati test cutanei. Il paziente reattivo anche se negativo al prick test con rituximab (10 mg/ml), è risultato positivo al test intradermico (RTX diluito 1:100 e 1:10) (Tabella 7), ma non al reattivo di controllo (diluyente), mostrando un ponfo di 12 mm di diametro.

**Tabella 7: Risultati ai test cutanei del paziente reattivo a rituximab**

Diluizione	Prick test	IDT
1:1000	Neg	Neg
1:100	Neg	<b>Pos</b>
1:10	Neg	<b>Pos</b>
SF	Neg	Neg

### **5.2.3. Studio della presenza di cellule circolanti specifiche per rituximab mediante test di proliferazione *in vitro***

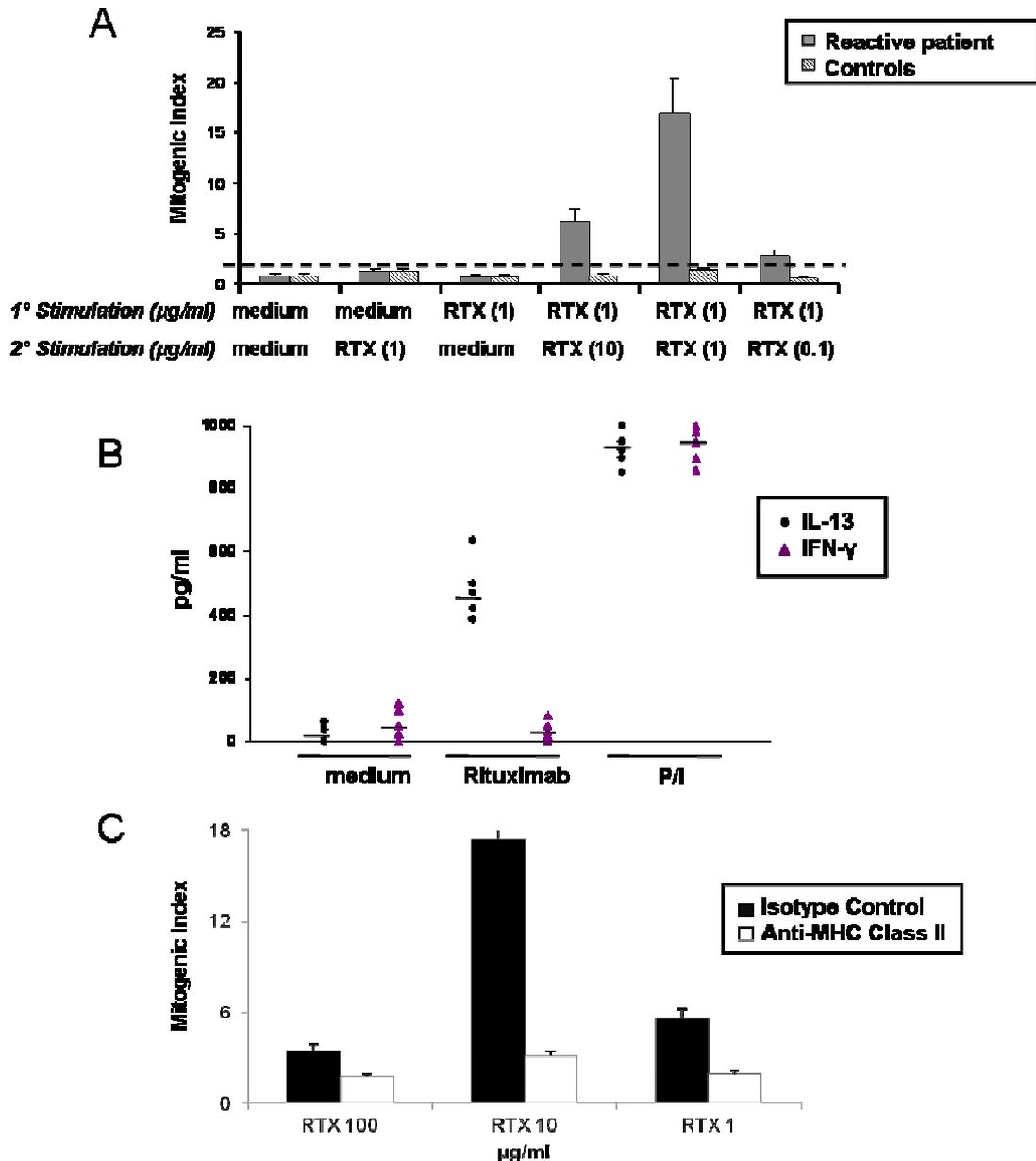
Dopo aver dimostrato la presenza di una risposta anticorpale anti-RTX, ci siamo chiesti se nel sangue del paziente reattivo fosse possibile determinare la presenza di linfociti T della memoria.

Mediante test di proliferazione *in vitro* a duplice step abbiamo valutato la presenza di cellule circolanti specifiche per rituximab: PBMCs del paziente reattivo e di pazienti di controllo sono state coltivate per 7gg in presenza di medium o rituximab per una prima fase di amplificazione, dopo 7 gg le cellule sono quindi state ristimate con dosi crescenti di rituximab per 5 gg. Tale procedura è stata effettuata ogni settimana per 2 mesi.

È stata evidenziata una risposta proliferativa dose-dipendente in seguito a stimolazione con rituximab, per i PBMCs ottenuti dal sangue periferico del paziente reattivo. Questa presenta un picco di proliferazione 7 settimane dopo la reazione, mentre scompare alla dodicesima settimana. Non si è osservata proliferazione rituximab-specifica né per gli 8 soggetti trattati con rituximab, né per i soggetti sani (n=10) (Fig. 7A).

La caratterizzazione della risposta cellulare è stata effettuata mediante dosaggio delle citochine presenti nel surnatante a 5 giorni recuperato dopo il secondo step di stimolazione. Surnatanti di PBMCs del soggetto reattivo, stimolati con rituximab, mostrano elevati livelli di IL-13, ma non di IFN- $\gamma$ , mentre nessuna citochina è stata trovata nei surnatanti dei controlli (Fig. 7B).

L'aggiunta di un anticorpo anti-MHC di classe II (10 µg/ml, Becton Dickinson, San Jose, CA), ma non del suo isotipo di controllo, inibisce inoltre sia la risposta proliferativa che la produzione di IL-13 indotte dal rituximab (Fig. 7C).



**Figura 7:** (A) Risposta proliferativa a rituximab di PBMC del paziente reattivo e di controlli. (B) Livelli di citochine (IL-13 e IFN-γ) nei surnatanti di PBMC del paziente reattivo, ottenuti con il test di proliferazione a duplice step. (C) Inibizione della proliferazione rituximab-specifica mediante l'aggiunta in coltura di un anticorpo anti-MHC di classe II.

## DISCUSSIONE

Lo studio, oggetto della tesi, ha avuto lo scopo di mettere a punto un test ELISA per la determinazione degli anticorpi anti-farmaco biologico in pazienti in trattamento con infliximab, adalimumab e rituximab e di analizzare le correlazioni tra comparsa di anticorpi anti-farmaco (ADA) ed efficacia terapeutica o comparsa di eventi avversi. Successivamente sono stati studiati i meccanismi patogenetici che sottendono l'immunogenicità dei farmaci biologici mediante test *in vitro* su cellule umane di un paziente reattivo a rituximab. Infine è stata verificata l'applicazione clinica di questi test col fine di poterli utilizzare a scopo preventivo per incrementare la sicurezza del trattamento.

La correlazione tra l'immunogenicità di un farmaco e le sue conseguenze cliniche dipende strettamente dalla rilevazione e dalla caratterizzazione di anticorpi diretti contro il farmaco biologico in studi clinici e pre-clinici. La ricerca di anticorpi anti-farmaco nel siero di pazienti in trattamento può essere effettuata attraverso varie tecniche (ELISA, RIA, Surface Plasmon Resonance), opportunamente sviluppate e validate prima di essere impiegate nella diagnostica clinica. Al fine di valutare la risposta umorale provocata dai due farmaci anti-TNF- $\alpha$  sono stati validati due test ELISA, sviluppati in proprio, del tipo "Bridging". Questa tecnica sfrutta il doppio legame che l'eventuale anticorpo anti-farmaco presente nel siero forma tra una molecola di anticorpo terapeutico legato sul fondo di un pozzetto e un'altra molecola libera, marcata con enzimi, aggiunta nella fase di rilevazione degli ADA. La validazione è definita come la dimostrazione, attraverso l'uso di specifiche indagini laboratoristiche, che le caratteristiche di un metodo analitico sono adatte al suo specifico uso clinico. Nel caso di metodi di rilevazione di anticorpi anti-farmaci biologici, la validazione dimostra che la tecnica è capace di identificare bassi livelli di anticorpi farmaco-specifici in una complessa matrice biologica, come siero o plasma.

Lo Screening Cut-Point è definito come il valore soglia sopra il quale il campione in esame viene ritenuto potenzialmente positivo. Nel nostro studio sono emersi valori di Cut-Point piuttosto diversi per i due test analizzati, in quanto il test per anticorpi anti-adalimumab si caratterizza per un maggiore segnale di background non specifico. Ogni positività individuata mediante il test di screening deve successivamente essere confermata con un test di inibizione (Confirmatory Assay) che dimostri la specificità del legame degli anticorpi al farmaco in esame. Un campione di sangue ritenuto potenzialmente positivo deve essere testato in presenza di un eccesso di farmaco. Perché la positività di tale campione venga confermata è necessario che il grado di inibizione che tale farmaco induce sia maggiore del cosiddetto Confirmatory Cut-Point. È importante notare che tuttavia tale inibizione dipende dal grado di avidità che gli anticorpi presentano nonché dal loro titolo. Il Confirmatory Cut-Point corrisponde al grado di inibizione del segnale apportato dall'aggiunta di una quota fissa di farmaco a un campione negativo. Nell'ambito dello studio in esame questa percentuale è risultata per infliximab pari al 21% e per adalimumab al 24%.

Al fine di valutare la ripetibilità del test si è reso poi necessario studiarne la precisione Inter- ed Intra-Assay. La prima valuta le variazioni casuali di controlli positivi e negativi in un ampio spazio temporale, mentre la seconda ne valuta la ripetibilità in più saggi eseguiti in un giorno solo, ed entrambe sono espresse come coefficienti di variazione percentuali. Per entrambi i test in esame tali coefficienti sono risultati estremamente soddisfacenti.

L'ultimo parametro stabilito è stata la sensibilità, ovvero la minore concentrazione anticorpale che il test è capace di identificare. Una sensibilità pari a 0,06 ng/ml e 15,6 ng/ml sono state identificate per il test per infliximab e adalimumab, rispettivamente. Anche per questo parametro emerge quindi una certa differenza di performance diagnostica per i 2 test, nonostante la metodica analitica sia la stessa. È importante ricordare comunque che in assenza di un "vero" standard di riferimento, la sensibilità del test è stata calcolata mediante l'uso di un anticorpo "affinity purified", il quale tuttavia può non riflettere esattamente le caratteristiche di legame presentate dagli anticorpi sierici umani anti-farmaco.

Bisogna però tenere conto che la valutazione del potenziale immunogenico di un farmaco biologico utilizzando un test ELISA può essere influenzata da diversi fattori. I

livelli sierici del farmaco stesso possono, ad esempio, interferire con il dosaggio degli ADA determinandone una sottostima (*“drug interference”*), in quanto il farmaco circolante legato agli ADA impedisce il realizzarsi del *“bridging”* causando risultati falsamente negativi. Per questo motivo è raccomandato eseguire il test a tempi distanti dall’infusione considerando l’emivita del farmaco. Recentemente sono state sviluppate nuove procedure quale, ad esempio, un trattamento con acido acetico del campione di siero prima di procedere all’ELISA, al fine di ottenere una dissociazione acida degli immunocomplessi ADA-farmaco.

La seconda parte dello studio dimostra una stretta correlazione tra lo sviluppo dell’immunogenicità al farmaco biologico e due importanti conseguenze cliniche quali la perdita di efficacia al trattamento e l’insorgenza di reazioni avverse infusionali.

Tutti i farmaci biologici, compresi quelli *“fully human”*, possiedono la capacità di stimolare una risposta immune anti-farmaco (immunogenicità), che ha come conseguenza lo sviluppo di anticorpi specifici per il farmaco. Gli anticorpi monoclonali chimerici come infliximab, composto dalla regione costante di anticorpi umani e da regioni variabili di immunoglobuline murine, sono fortemente immunogenici dato che possono contenere xenoantigeni, ovvero sequenze riconosciute come estranee all’organismo. In studi precedenti è stato dimostrato che l’incidenza di anticorpi anti-infliximab varia dal 12 al 44% nei pazienti affetti da artrite reumatoide e tra il 6 e il 61% in soggetti con il morbo di Crohn. Nella nostra casistica di pazienti affetti da varie patologie immunomediate, l’incidenza dei pazienti con anticorpi sierici specifici per infliximab è pari al 31%.

I tentativi tesi a ridurre l’immunogenicità di anticorpi chimerici hanno portato alla rimozione totale o parziale delle sequenze di origine murina, cioè alla creazione di anticorpi terapeutici umanizzati o completamente umani. Tuttavia è stato dimostrato che, anche molecole *“fully human”* possono indurre una risposta immune da parte dell’ospite. Tra questi, adalimumab si è dimostrato capace di stimolare la formazione di anticorpi anti-farmaco tra l’1 e il 70% dei soggetti con AR e nel 2.8-3.7% dei pazienti affetti da morbo di Crohn. Il nostro studio ha evidenziato che il 66.7% dei pazienti affetti da Spondiloartrite sviluppa anticorpi anti-adalimumab, mentre si osserva un’incidenza minore in pazienti affetti da BID e da AR.

Il grado di umanizzazione non è l'unico fattore capace di influenzare l'immunogenicità del farmaco. Caratteristiche sia intrinseche che estrinseche ne modificano la tollerabilità, quali il pattern di glicosilazione e le alterazioni post-traduzionali, le contaminazioni da parte di agenti esterni, la presenza di aggregati e, infine, il protocollo di infusione. L'incidenza di ADA risulta significativamente diversa anche a seconda della patologia in trattamento. Tale variabilità potrebbe essere dovuta a diversi meccanismi patogenetici coinvolti nella malattia di base e ai differenti protocolli di premedicazione utilizzati. Nell'ambito della nostra casistica si osserva una maggiore incidenza di anticorpi anti-infliximab in soggetti affetti da BID, mentre l'incidenza è simile negli altri tre gruppi di pazienti studiati.

Vari studi condotti in pazienti trattati con anticorpi monoclonali hanno dimostrato che la presenza di immunogenicità si associa a ridotta risposta terapeutica. Bartelds e collaboratori hanno inoltre verificato che lo sviluppo di anticorpi anti-adalimumab influenza significativamente le concentrazioni sieriche del biologico stesso [44]. Nell'ambito della nostra casistica in un gruppo di pazienti trattati con infliximab ed adalimumab abbiamo confermato che lo sviluppo di anticorpi anti-farmaco si associa a ridotti livelli sierici di farmaco nonché a minor sua efficacia clinica. Del resto gli anticorpi anti-farmaco possono indurre resistenza terapeutica attraverso due distinte modalità, o impedendo il riconoscimento del target terapeutico (anticorpi neutralizzanti) o aumentando la farmacocinetica del farmaco stesso. I risultati ottenuti in questo studio suggeriscono che almeno una parte degli anticorpi anti-infliximab abbia la capacità di alterare la cinetica di metabolismo dell'anticorpo con conseguente minor concentrazione sierica.

Un ulteriore aspetto che emerge da questo studio è che i pazienti che sviluppano anticorpi anti-farmaco sono più facilmente suscettibili a reazione di ipersensibilità. La maggior parte dei pazienti analizzati con manifestazioni allergiche ad infliximab sono risultati positivi alla ricerca di anticorpi anti-farmaco. Ovviamente vi sono nell'ambito della casistica pazienti reattivi in cui gli anticorpi anti-farmaco non sono rilevabili. E' infatti importante ricordare che talvolta il meccanismo patogenetico può essere anticorpo-indipendente, in quanto dovuto al rilascio massivo di citochine sieriche da parte di cellule del sistema immune (Sindrome da Rilascio di Citochine-CRS).

Diverse classi di anticorpi possono essere coinvolti nell'induzione di reazioni avverse immediate. In particolare tali eventi possono realizzarsi sia attraverso meccanismi IgE- che non IgE-mediati. La caratterizzazione isotipica della risposta anticorpale anti-farmaco che abbiamo effettuato nei pazienti reattivi ad infliximab risultati anticorpo-positivi al test di screening, ha permesso di evidenziare in 6 di questi la presenza di anticorpi anti-infliximab della classe IgE [45]. L'ipotesi che la reazione possa essere sostenuta da un meccanismo IgE-mediato è stata confermata dalla positività ai test cutanei condotti con infliximab nei 6 pazienti reattivi positivi per IgE specifiche. Nella nostra casistica 1 paziente è risultato positivo ai test cutanei anche se negativo alla ricerca di IgE specifiche per infliximab. Questo può essere una conseguenza della difficoltà nella rilevazione di anticorpi specifici della classe IgE, sebbene sia stata utilizzata una piattaforma tecnologica altamente sensibile, quale quella dell'ImmunoCAP. Infatti i livelli circolanti di anticorpi IgE sono sensibilmente inferiori a quelli di anticorpi IgG, i quali, interferendo nel test, possono causare risultati falsamente negativi. Del resto la maggior parte di anticorpi anti-infliximab riscontrati in soggetti reattivi appartiene proprio all'isotipo IgG.

In modelli murini è stato chiaramente dimostrato il ruolo di anticorpi allergene-specifici della classe IgG nell'induzione di reazioni anafilattiche mediante la loro interazione con il recettore FcγRIII presente sulla membrana di macrofagi e basofili, mentre è ancora oggetto di discussione il coinvolgimento di questo "pathway" alternativo di anafilassi nell'uomo. A tal proposito, le reazioni di ipersensibilità a farmaci biologici possono effettivamente rappresentare un ottimo modello di anafilassi IgG-mediata nell'uomo.

Negli ultimi anni sono stati messi a disposizione della pratica clinica per il trattamento delle malattie immunomediate farmaci diretti verso altri target terapeutici, tra cui rituximab, un anticorpo monoclonale IgG1 chimerico diretto verso la molecola del CD20, espressa dai linfociti B e che possiede un elevato potenziale immunogenico. La sua somministrazione può indurre, infatti, reazioni immediate di varia severità, generalmente inquadrabili nell'ambito delle CRS, ma clinicamente indistinguibili dalle reazioni di ipersensibilità di tipo I. Nonostante ciò, alcune reazioni a rituximab possono essere reazioni di ipersensibilità di tipo I e studi recenti hanno dimostrato la presenza di anticorpi anti-rituximab in pazienti trattati [32]. Il nostro studio ha confermato la

presenza di anticorpi anti-rituximab non isotipo-specifici in 2 dei 33 pazienti studiati (6.06%).

Nonostante gli ADA siano generalmente rappresentati da IgG, per alcuni farmaci biologici, ma non per rituximab, è stata dimostrata la presenza di ADA di isotipo IgE. Attraverso lo studio di un caso di severa reazione anafilattica indotta da rituximab abbiamo valutato l'ipotesi che anticorpi IgE specifici anti-rituximab fossero coinvolti in tali reazioni, e, per la prima volta, è stata dimostrata la presenza di anticorpi anti-rituximab, sia non isotipo-specifici sia di isotipo IgE (2,65kUA/l). Mediante test di inibizione con dosi crescenti di rituximab è stata confermata la specificità del test e il monitoraggio ha dimostrato una progressiva e rapida diminuzione del titolo anticorpale. L'ipotesi che la reazione fosse sostenuta da un meccanismo IgE-mediato è confermata dalla positività ai test cutanei intradermici effettuati tre settimane dopo la reazione [46].

Il monitoraggio delle IgE specifiche per rituximab mostra che esiste correlazione temporale tra la comparsa delle IgE e la reazione al farmaco. Questo dato conferma i risultati ottenuti in un nostro precedente studio condotto in modo retrospettivo su pazienti reattivi a infliximab [47]. Le IgE specifiche diventano infatti rilevabili prima che si manifesti la reazione, per poi scomparire velocemente nel tempo. La maggior parte delle reazioni può quindi essere predetta dalla comparsa degli ADA.

Dal nostro studio è inoltre emerso che l'interruzione prolungata e quindi la ripresa della terapia rappresenta un momento di rischio particolare per quanto riguarda lo sviluppo di anticorpi anti-farmaco. Alcuni pazienti che durante il primo ciclo di terapia non presentavano questi anticorpi, alle prime infusioni del secondo ciclo, dopo l'interruzione della terapia, sono andati incontro a reazioni avverse di tipo immediato. Questo evento suggerisce, sia pure in maniera indiretta, che l'interruzione di terapie con anticorpi monoclonali con successiva riesposizione al farmaco, rappresenta un fattore di rottura della tolleranza immunologica e favorente quindi l'immunogenicità di questi prodotti.

Negli ultimi anni molti studi hanno posto l'accento sul ruolo delle cellule T della memoria nella risposta immune ai farmaci biologici. Ad oggi esistono numerose evidenze di come gli ADA siano il risultato di una risposta immune adattiva al farmaco, che implica anche la presenza di cellule T della memoria farmaco-specifiche. L'analisi delle cellule T specifiche per epitopi immunodominanti del farmaco biologico viene generalmente

effettuata mediante test di proliferazione *in vitro* (o studiando la produzione di citochine) di cellule mononucleate di sangue periferico o di linee cellulari espansse *in vitro* dopo stimolazione con il farmaco. Ad oggi le conoscenze sulle risposte immuni di tipo cellulare agli anti-TNF- $\alpha$  sono ancora scarse. Infatti appare molto difficile mettere in evidenza la risposta cellulare T specifica a infliximab, e distinguere se essa sia di tipo antigenico o se sia una conseguenza dell'attività biologica del farmaco stesso. Infliximab possiede infatti funzioni effettrici che possono alterare il test, quali l'induzione dell'apoptosi e l'attivazione di cellule del sistema immunitario (cellule T CD4+, NK, monociti e macrofagi) attraverso il segnale indotto sul TNF- $\alpha$  di membrana presente su queste cellule.

Nell'ultima parte di questo studio, per capire meglio i meccanismi patogenetici che sottendono l'immunogenicità dei farmaci biologici, abbiamo quindi eseguito dei test di proliferazione *in vitro* su cellule mononucleate ottenute da sangue periferico di un paziente reattivo a rituximab. Abbiamo osservato una risposta proliferativa dose-dipendente, caratterizzata da un profilo Th2 e probabilmente capace di sostenere la produzione di IgE specifiche per rituximab, osservate nel siero. Lo studio rappresenta la prima dimostrazione di una risposta a rituximab, sia di tipo cellulare (Th2) che umorale (IgE) e suggerisce che le reazioni di ipersensibilità di tipo I possano essere un meccanismo alternativo alle CRS nello sviluppo delle reazioni infusionali a rituximab [46].

La disponibilità di test *in vitro* in grado di studiare la risposta immune di tipo umorale e cellulare ai farmaci biologici, sembra quindi avere un'importante rilevanza clinica. Il monitoraggio dei pazienti per la comparsa delle cellule T della memoria specifiche per il farmaco e degli ADA, permette di identificare un possibile paziente reattivo, migliorando così la sicurezza del trattamento. Inoltre, la contemporanea determinazione degli anticorpi anti-farmaco e della concentrazione sierica del farmaco biologico stesso in fase di trattamento, possono rappresentare dei validi strumenti per poter monitorare l'immunogenicità di questi farmaci e valutarne il loro impatto clinico.

## REFERENZE

1. A. Nissim and Y. Chernajovsky Historical Development of Monoclonal Antibody Therapeutics. Handbook of Experimental Pharmacology Volume 181, 2008, pp 3-18
2. Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. Nat. Rev. Drug Discov. 2010;9, 325-338.
3. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. Adv. Drug Deliv. Rev. 2006;58, 640-656.
4. Penn H. Biologic therapies in autoimmune diseases. Clin Med 2006; Rosman Z, Shoenfield Y, Zandman-Goddard. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. BMC Med 2013
5. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. Nat Rev Imm 2009
6. Thalayasingam N., Isaacs J.D. Anti-TNF Therapy. Best practice & Research Clinical Rheumatology, 25, 549-567, 2011.
7. Taylor PC Pharmacology of TNF blockade in rheumatoid arthritis an other chronic inflammatory diseases. Curr Op Pharm 2010
8. Mease P.J. Adalimumab in the treatment of Arthritis. Ther Clin Risk Manag 2007
9. Shealy D., Cai A., Staquet K. Characterization of golimumab, a human monoclonal antibody specific for human tumor necrosis factor  $\alpha$ . Landes Bioscience – mAbs 2010
10. Goel N., Stephens S. Certolizumab Pegol. Landes Bioscience – mAbs 2010
11. Goffe B, Cather J.C. Etanercept, an overview. Journal of the American Academy of Dermatology 2003.
12. Rosman Z, Shoenfield Y, Zandman-Goddard. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. BMC Med 2013
13. Cohen SB, Emery P, Greenwald MW, Dougados M, Furie RA, Genovese MC, Keystone EC, Loveless JE, Burmester GR, Cravets MW, Hessey EW, Shaw T, Totoritis MC; REFLEX Trial Group. Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks. Arthritis Rheum. 2006
14. Taylor PC, Quattrocchi E, Mallett S, Kurrasch R, Petersen J, Chang DJ. Ofatumumab, a fully human anti-CD20 monoclonal antibody, in biological-naive, rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. Ann Rheum Dis. 2011
15. Md Yusof MY, Emery P. Targeting interleukin-6 in rheumatoid arthritis. Drugs. 2013

16. Somerfield J, Hill-Cawthorne GA, Lin A, Zandi MS, McCarthy C, Jones JL, Willcox M, Shaw D, Thompson SA, Compston AS, Hale G, Waldmann H, Coles AJ. A novel strategy to reduce the immunogenicity of biological therapies. *J Immunol.* 2010;185(1):763-8.
17. Chirmule N, Jawa V, Meibohm B. Immunogenicity to therapeutic proteins: impact on PK/PD and efficacy. *AAPS J.* 2012;14(2):296-302.
18. Delluc S., Ravot G., Maillere B. Quantitative analysis of the CD4 T-cell repertoire specific to therapeutic antibodies in healthy donors. *FASEB J.*, 25, 2040-2048, 2011.
19. A. Vultaggio, E. Maggi, A. Matucci. Immediate reactions to biologicals: from pathogenic mechanisms to prophylactic management. *Current opinion in Allergy and Clinical Immunology*, 11, 262-268, 2011
20. Ben-Horin S., Chowers Y. Review Article: loss of response to anti TNF- $\alpha$  treatments in Chron's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 33, 987-995, 2011
21. Yanai H., Hanauer S.B. Assessing response and loss of response to biological therapies in IBD. *Am J Gastroenterol.*, 106, 685-698, 2011
22. Picler WJ. Adverse side-effects to biological agents. *Allergy* 2006
23. Gould HJ, Sutton BJ, Beavil AJ, Beavil RL, McCloskey N, Coker HA, Fear D, Smurthwaite L. The biology of IgE and the basis for allergic disease. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21, 579-628.
24. Prussin C, Metcalfe DD. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006;117, S450-S456.
25. Chung CH, Mirakhur B, Chan E at al. Cetuximab-induced anaphylaxis an IgE specific for galactose- $\alpha$ -1,3-galactose. *N Engl J Med* 2008
26. Maggi E, Vultaggi A and Matucci A. Acute infusion reactions induced by monoclonal antibody therapy. *Exp Rev Clin Imm* 2011
27. Svenson M, Geborek P, Saxne T, Bendtzen K. Monitoring patients treated with anti-TNF- $\alpha$  biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti- infliximab antibodies. *Rheumatology* 2007
28. Vultaggio A, Maggi E, Matucci A. Immediate adverse reactions to biologicals: from pathogenic mechanisms to prophylactic management. *Curren Opinion in Allergy and Clinical Immunology.* 2011
29. Haraoui B, Cameron L, Ouellet M, White B. Anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis who require higher doses of infliximab to achieve or maintain a clinical response. *J. Rheumatol.* 2006;33, 31-36.
30. Wolbink GJ, Vis M, Lems W, Voskuyl AE, de Groot E, Nurmohamed MT, Stapel S, Tak PP, Aarden L, Dijkmans B. Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006;54, 711-715.
31. van der Bijl AE, Breedveld FC, Antoni CE, Kalden JR, Kary S, Burmester GR, Beckmann C, Unnebrink K, Kupper H. An open-label pilot study of the effectiveness of adalimumab in patients with rheumatoid arthritis and previous infliximab

- treatment: relationship to reasons for failure and anti-infliximab antibody status. *Clin. Rheumatol.* 2007;27, 1021-1028.
32. van den Bemt BJ, den Broeder AA, Snijders GF, Hekster YA, van Riel PL, Benraad B, Wolbink GJ, van den Hoogen FH. Sustained effect after lowering high-dose infliximab in patients with rheumatoid arthritis: a prospective dose titration study. *Ann. Rheum. Dis.* 2008;67, 1697-1701.
  33. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M, Larsson L, Kapetanovic MC, Saxne T. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor infliximab. *Arthritis Rheum.* 2006;54, 3782-3789.
  34. Kress S. Adalimumab for use in the treatment of rheumatoid arthritis: clinical review. Abbott laboratories biologic licencing application. STN 125057. Food and Drug Administration 2002; 1-136. 12-24-02.
  35. Weinblatt ME, Keystone EC, Furst DE, Moreland LW, Weisman MH, Birbara CA, Teoh LA, Fischkoff SA, Chartash EK. Adalimumab a fully human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in patients taking concomitant metotrexate. The ARMANDA trial. *Arthritis Rheum.* 2003;45, 35-45
  36. Schmidt E, Hennig K, Mengede C, Zillikens D, Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin Immunol.* 2009 Sep;132(3):334-41.
  37. J. Pijpe, G.W. van Imhoff, F.K. Spijkervet, J.L. Roodenburg, G.J. Wolbink, K. Mansour, A. Vissink, C.G. Kallenberg, H. Bootsma. Rituximab treatment in patients with primary Sjogren's syndrome: an open-label phase II study. *Arthritis Rheum.*, 52 (2005), pp. 2740–2750
  38. K.G. Smith, R.B. Jones, S.M. Burns, D.R. Jayne. Long-term comparison of rituximab treatment for refractory systemic lupus erythematosus and vasculitis: remission, relapse, and re-treatment. *Arthritis Rheum.*, 54 (2006), pp. 2970–2982
  39. Tovey M.G. et al. *Detection and Quantification of Antibodies to Biopharmaceuticals – Practical and Applied Considerations*, 2011
  40. Porebski G, Gschwend-Zawondniak A and Pichler WJ. In vitro diagnosis of T cell-mediated drug allergy. *Clin Exp All* 2011
  41. Naisbitt DJ et al. Characterization of drug-specific T cells in lamotrigine hypersensitivity. *J All Clin Imm* 2003
  42. Jaber A and Baker M. Assessment of the immunogenicity of different interferon beta-1° formulation usng ex vivo T-cell assays. *J Pharm Biom Anal* 2006
  43. Shankar G., Devanarayan V. Recommendation for the validation o immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biom Anal* 2008
  44. Bartelds GM, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, Lems WF, Twisk JW, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ. Development of antidrug antibodies

- against adalimumab and association with disease activity and treatment failure during long-term follow-up. *JAMA*. 2011
45. Matucci A, Pratesi S, Petroni G, Nencini F, Virgili G, Milla M, Maggi E, Vultaggio A. Allergological in vitro and in vivo evaluation of patients with hypersensitivity reactions to infliximab. *Clin Exp Allergy*. 2013
  46. Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Petroni G, Cammelli D, Alterini R, Rigacci L, Romagnani S, Maggi E. Drug-specific Th2 cells and IgE antibodies in a patient with anaphylaxis to rituximab. *Int Arch Allergy Immunol*. 2012
  47. Vultaggio A, Matucci A, Nencini F, Pratesi S, Parronchi P, Rossi O, Romagnani S, Maggi E. Anti-infliximab IgE and non-IgE antibodies and induction of infusion-related severe anaphylactic reactions. *Allergy*. 2010