

“Ottimizzazione del trattamento con farmaci biologici anti-TNF α in pazienti affetti da IBD mediante monitoraggio dei livelli circolanti del farmaco e degli anticorpi anti-farmaco”

15 settembre 2012 – 14 ottobre 2013

L' Infiximab, farmaco biologico anti-TNF α , viene comunemente usato nel trattamento del Morbo di Crohn e della colite ulcerosa con buoni risultati; il possibile sviluppo di anticorpi anti-farmaco in corso di terapia, tuttavia, sembra essere un fattore predisponente al fallimento terapeutico, modificando farmacocinetica e biodisponibilità del farmaco ed esponendo il paziente alla possibile comparsa di reazioni avverse.

Obiettivo principale del progetto è stato il confronto di due metodi per la determinazione dei livelli circolanti di Infiximab (IFX) e degli anticorpi anti-Infiximab (ATI) (Promonitor IFX Determination of Drug and Anti-drug Antibodies Concentration, Menarini / TNF Blocker Monitoring e Antibodies against TNF Blocker kits, ImmunDiagnostik).

Scopo ulteriore dello studio è stata la valutazione di possibili correlazioni cliniche tra livelli di farmaco libero circolante, anticorpi anti-farmaco e andamento delle patologie in esame.

L'arruolamento dei pazienti, tutt'ora in corso, è stato effettuato considerando pazienti afferenti alla SC di Gastroenterologia affetti da IBD e in terapia con Infiximab, dopo la fase di induzione. Il prelievo è stato effettuato in condizione basale, ovvero prima dell'infusione programmata del farmaco, momento in cui la concentrazione ematica dell'Infiximab è al nadir (*trough level*) e la sensibilità dei kit ELISA nel rilevare la presenza di anticorpi anti-Infiximab è massima. Questo timing per il dosaggio è lo stesso utilizzato nella maggioranza degli studi già disponibili su questo argomento. L'intervallo fra le infusioni è di default di otto settimane, la decisione di accorciarlo a sette, sei, cinque o quattro settimane è stata presa dal medico che ha in cura il paziente sulla base dell'andamento clinico della malattia.

Dopo la raccolta, i sieri sono stati stoccati a -20°C fino al momento dell'analisi. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nelle tabelle seguenti:

Numero pazienti	83
Maschi	46
Femmine	35
Morbo di Crohn	44
Colite ulcerosa	35
Pouchite	2
IBD non classificate	2

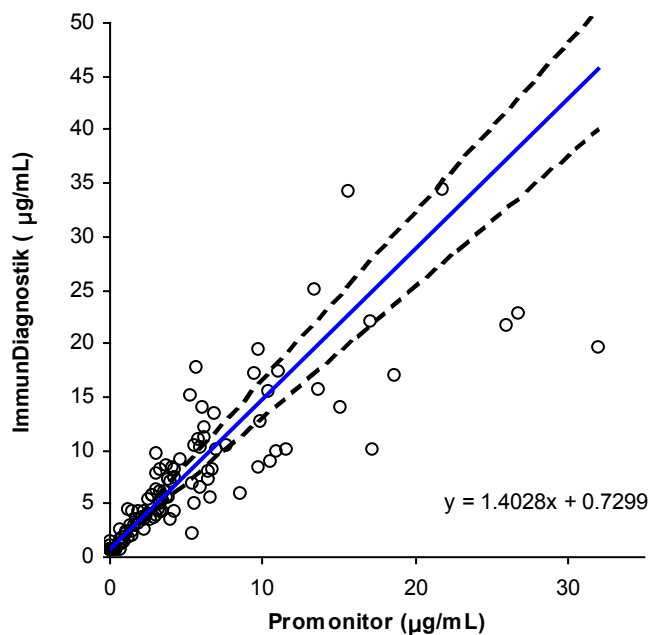
Attività della malattia	
In remissione	47
Lieve	18
Moderata	9
Grave	2
Variata nel tempo	7

Alcuni pazienti sono stati seguiti nel corso della terapia, eseguendo prelievi ripetuti (da due a quattro) con intervalli di circa 6-8 mesi l'uno dall'altro, come sotto schematizzato. Non tutti i campioni sono stati analizzati con entrambi i metodi.

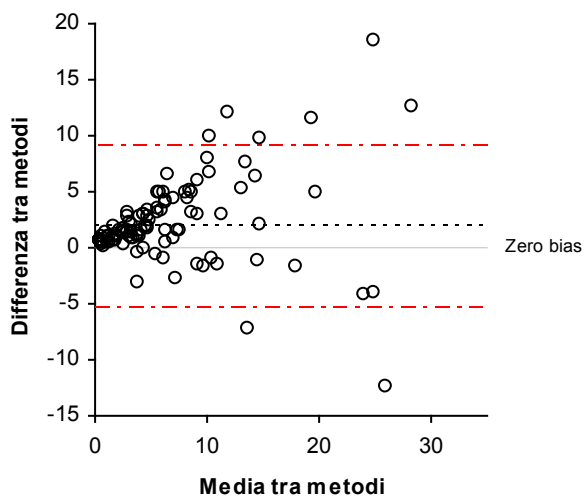
Numero prelievi	131
Pazienti con 4 prelievi	2
Pazienti con 3 prelievi	7
Pazienti con 2 prelievi	28
Pazienti con 1 prelievo	46

RISULTATI:

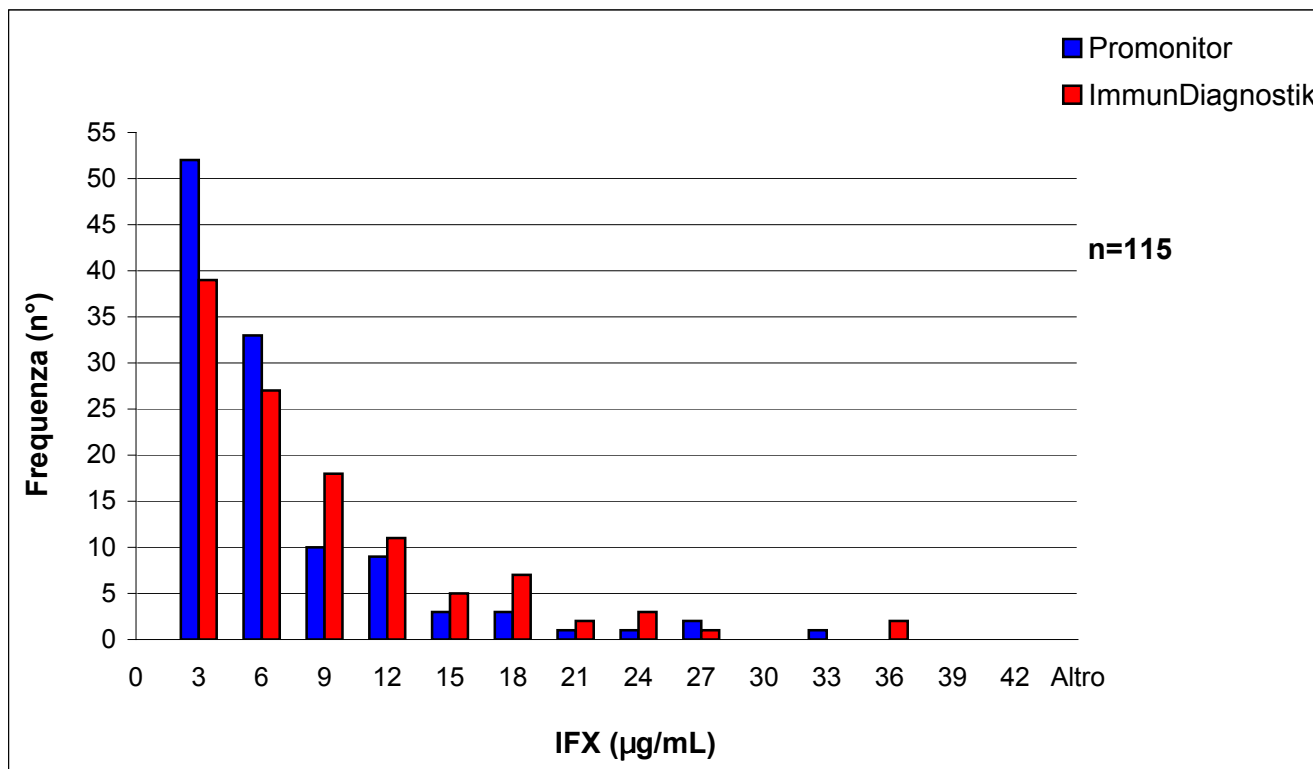
La correlazione tra metodi è stata effettuata su 115 campioni, relativi a 72 pazienti. Dalla retta di regressione di Passing & Bablok non emergono differenze significative tra i due metodi per la determinazione dei livelli circolanti di Infliximab. Il coefficiente di Pearson dimostra una buona correlazione tra i risultati ottenuti ($\rho=0.842, p<0.0001$, IC 95% 0.78 - 0.89).



L'analisi di Altman&Bland mostra un bias tra metodi di 2.09 (IC 95% 1.41 - 2.76)



Le distribuzioni dei livelli di farmaco circolante, misurato con i due metodi, sono illustrate nell'istogramma di frequenza sottostante e la statistica descrittiva è riassunta nella tabella a seguire.



n=115	IFX Promonitor ($\mu\text{g/mL}$)	IFX ImmunDiagnostik ($\mu\text{g/mL}$)
Media	4.9	7.0
Mediana	3.2	5.0
Intervallo di misura	0.05 – 32.0	0.8 – 34.5
Deviazione Standard	5.9	6.8
Range Interquartile	5.3	7.9

In 115 campioni analizzati, sono stati riscontrati 9 campioni positivi per ATI e 105 campioni negativi per ATI con entrambi i metodi.

Un solo paziente è risultato positivo con metodo ImmunDiagnostik, ma negativo con metodo Promonitor; tuttavia, ad una seconda analisi sette mesi dopo, è risultato essere positivo per ATI anche con metodo Promonitor.

Utilizzando i valori soglia forniti dalle due ditte, i livelli circolanti di farmaco libero e di anticorpi anti-farmaco sono stati convertiti in variabili categoriche (inferiore, basso, elevato per IFX, positivo o negativo per ATI).

La buona concordanza tra categorie dei livelli di IFX è stata valutata avvalendosi del Kappa di Cohen pesato ($\text{kappa}=\mathbf{0.77}$); l'accordo tra presenza o assenza di ATI è apparso ottimo ($\text{kappa}=\mathbf{0.94}$).

n 115

Promonitor	ImmunDiagnostik			Total
	inferiore	basso	alto	
inferiore	15	1	0	16
basso	6	15	2	23
alto	0	11	65	76
Total	21	27	67	115

Weighted kappa statistic: 0.77

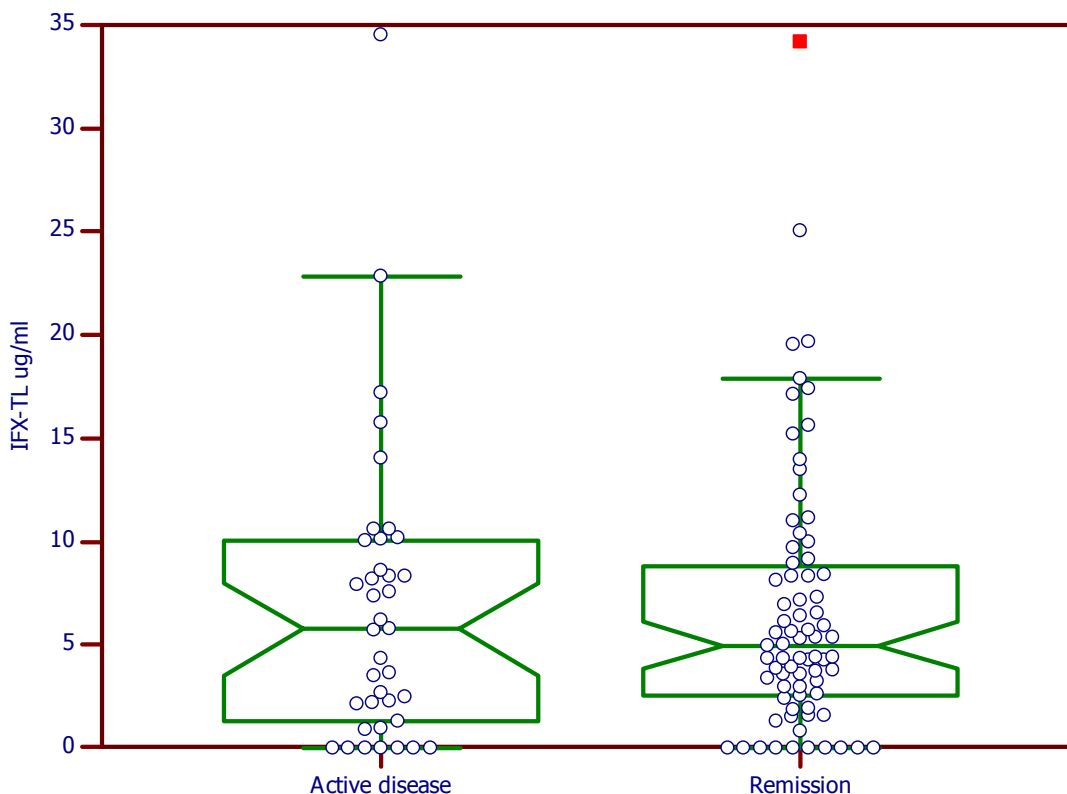
n 115

Promonitor	ImmunDiagnostik		Total
	presenti	assenti	
presenti	9	0	9
assenti	1	105	106
Total	10	105	115

Kappa statistic: 0.94

Per l'analisi sull'impatto clinico dei livelli di farmaco circolante e della presenza/assenza di anticorpi anti-farmaco, sono stati presi in considerazione 81 pazienti, escludendo i due pazienti con pouchite e includendo nelle osservazioni pazienti i cui campioni sono stati dosati con uno solo dei due metodi. Per ognuna delle determinazioni di farmaco e anticorpi anti-farmaco circolanti, i pazienti sono stati sottoposti ad una visita clinica in corrispondenza del prelievo.

Nella figura sottostante i Box-and-Whisker plot che mettono in correlazione l'attività di malattia e il livello di Infliximab circolante.



Dalle osservazioni cliniche emerge inaspettatamente che non risulta esserci un'associazione significativa tra il livello di farmaco circolante e il grado di attività della malattia, tuttavia il livello di farmaco è significativamente maggiore se il paziente è affetto da colite ulcerosa rispetto al Morbo di Crohn, se è in terapia con immunosoppressori o steroidi, se l'intervallo di somministrazione del farmaco è inferiore alle 8 settimane e se non presenta anticorpi liberi circolanti.

Inoltre, come ci si aspettava, tutti i pazienti con presenza di ATI hanno livelli indosabili di farmaco e la presenza di anticorpi è significativamente associata alla comparsa di reazioni avverse, a sostegno della proposta di interrompere il trattamento o considerare un farmaco alternativo in caso di positività agli anticorpi. Anche un livello indosabile di farmaco circolante correla con il verificarsi di eventi avversi.

La presenza di anticorpi non sembra però essere significativamente associata al grado di attività della malattia, pur considerando che il numero esiguo di pazienti con anticorpi rende difficile mettere in evidenza risultati statisticamente significativi.

La tabella di contingenza sottostante dimostra come non sempre la mancata risposta al trattamento sia associabile alla presenza misurabile di anticorpi liberi circolanti.

n=81	Malattia in remissione (n=49)	Malattia attiva (n=32)
ATI + (n=8)	3 (37.5%)	5 (62.5%)
ATI - (n=73)	46 (63%)	27 (37%)

Per 37 pazienti il livello di IFX è stato monitorato nel tempo con più di una determinazione, i risultati ottenuti sono sostanzialmente simili, tranne che in cinque casi:

- per due pazienti il livello di farmaco è passato da terapeutico a subterapeutico (con malattia in remissione stabile)
- in due pazienti il farmaco è passato da una concentrazione subterapeutica ad una terapeutica (in un caso è stata raggiunta la remissione della patologia, l'altro era in remissione stabile)
- in un paziente, in remissione stabile, il livello di farmaco è diminuito, passando da una concentrazione subterapeutica ad una concentrazione indosabile
- per un paziente, in seguito ad una riduzione della frequenza di somministrazione da 8 a 5 settimane, il livello di farmaco è passato da indosabile ad una concentrazione terapeutica e il paziente ha raggiunto la remissione clinica.

La mancanza di un'associazione significativa tra i livelli di farmaco libero circolante e il grado di attività della malattia meriterebbe un ulteriore approfondimento, magari valutando non solo il grado di attività della malattia presente al momento del prelievo, ma il follow-up, oppure considerando che un diverso metabolismo del farmaco, nella popolazione in esame, potrebbe modificarne la biodisponibilità.

Sarebbe infine utile una correlazione tra i livelli di farmaco circolante e gli indici di flogosi (quali il dosaggio della proteina C reattiva), poiché è possibile che nei casi classificati come malattia attiva, vi sia una percentuale di pazienti in cui la sintomatologia è data non già da una riacutizzazione della malattia infiammatoria intestinale, ma dalla coesistenza di una sindrome da intestino irritabile (*IBS, irritable bowel syndrome*).

Infine la scarsa correlazione tra il *trough level* del farmaco anti-TNF- α ed il mantenimento della remissione suggerisce che potrebbero avere un ruolo, e che quindi meritino di essere studiati con attenzione, i meccanismi che portano alla perdita di risposta ed allo sviluppo di attività infiammatoria indipendentemente dall'attività del TNF- α .

CONCLUSIONI:

In conclusione, dal punto di vista del laboratorio, sembra esserci una buona correlazione tra i due metodi testati per la misura di IFX e per la determinazione di presenza o assenza di ATI.

Entrambi i metodi possono costituire un utile supporto per il monitoraggio e l'ottimizzazione della terapia con farmaci anti-TNF α .

Per quanto riguarda la clinica, la casistica, in continuo aumento, potrà consentire di approfondire le relazioni esistenti tra livelli di IFX e stato della malattia, oltre a confermare i risultati ottenuti, al fine di introdurre una metodica per la misura di IFX e ATI nella pratica clinica.

Se, con i risultati attuali, non può essere raccomandato il dosaggio "a tappeto" su tutti i pazienti in trattamento di mantenimento con Infliximab, l'attenzione potrebbe spostarsi su un approccio che prevede un solo dosaggio dei livelli circolanti di farmaco subito dopo l'induzione, alla quattordicesima settimana di terapia, ed eventuali ulteriori determinazioni solo in caso di comparsa di una riacutizzazione di malattia. Un valore insufficiente del *trough level* alla quattordicesima settimana di terapia, infatti, pare essere predittore di una futura perdita di risposta all'anti-TNF.

Si potrebbe inoltre estendere lo studio analogamente all'Adalimumab, altro farmaco biologico largamente usato nella terapia delle IBD in alternativa all'Infliximab.

BIBLIOGRAFIA:

Vande Casteele N, Gils A, Singh S, Ohrmund L, Hauenstein S, Rutgeerts P, et al. *Antibody Response to Infliximab and its Impact on Pharmacokinetics can be Transient*. Am. J. Gastroenterol. 19 febbraio 2013;

Vermeire S, Gils A. *Value of drug level testing and antibody assays in optimising biological therapy*. Frontline Gastroenterol. gennaio 2013;4(1):41-3.

Ordás I, Feagan BG, Sandborn WJ. *Therapeutic drug monitoring of tumor necrosis factor antagonists in inflammatory bowel disease*. Clin. Gastroenterol. Hepatol. ottobre 2012;10(10):1079-87.

Feagan BG, Singh S, Lockton S, Hauenstein S, Ohrmund L, Croner LJ, et al. *565 Novel Infliximab (IFX) and Antibody-to-Infliximab (ATI) Assays are Predictive of Disease Activity in Patients With Crohn's Disease (CD)*. Gastroenterology. 1 maggio 2012;142(5):S-114.

Miheller P, Kiss LS, Lorinczy K, Lakatos PL. *Anti-TNF trough levels and detection of antibodies to anti-TNF in inflammatory bowel disease: are they ready for everyday clinical use?* Expert Opin Biol Ther. febbraio 2012;12(2):179-92.

Chaparro M, Guerra I, Munoz-Linares P, Gisbert JP. *Systematic review: antibodies and anti-TNF α levels in inflammatory bowel disease*. Aliment Pharmacol Ther 2012; 35: 971-86.

ELENCO ATTIVITA' SCIENTIFICHE INERENTI IL PROGETTO:

C.Guiotto, L.Germano, R.Cerruti, E.Miotto, M.Daperno, R.Pellerito, R.Rocca, M.Migliardi
Determinazione dei livelli circolanti di farmaco e della presenza di anticorpi anti-farmaco in
pazienti con patologie infiammatorie croniche autoimmuni in terapia con Infliximab
LigandAssay 2012
PRESENTATO COME POSTER al 18° Simposio annuale ELAS-Italia, Bologna 15-17 Ottobre 2012

C.Guiotto, L.Germano, M.Vizzini, E.Miotto, M.Daperno, R.Pellerito, R.Rocca, M.Migliardi
Determinazione dei livelli circolanti di farmaco e della presenza di anticorpi anti-farmaco in
pazienti con patologie infiammatorie croniche autoimmuni in terapia con Infliximab
Biochimica Clinica 2012
PRESENTATO COME POSTER al 44° Congresso Nazionale SIBioC, Roma 5-7 Novembre 2012

Guiotto C., Germano L., Vizzini M., Cerruti R., Frigerio F., Daperno M., Rocca R., Migliardi M.
Determination of Infliximab trough levels (IFX-TL) and antibodies to Infliximab (ATI) in
inflammatory bowel disease
PRESENTATO COME POSTER al 20° IFCC-EFLM European Congress of Clinical Chemistry
and Laboratory Medicine EUROMEDLAB, Milano 19-23 Maggio 2013

Guiotto C., Germano L., Vizzini M., Cerruti R., Frigerio F., Daperno M., Rocca R., Migliardi M.
Determinazione dei livelli circolanti di Infliximab e della presenza di anticorpi anti-Infliximab in
pazienti con malattie infiammatorie intestinali.
ABSTRACT INVIATO per il 19° Simposio Annuale ELAS-Italia, Bologna 25-27 Novembre 2013

Daperno M., Frigerio F., Guiotto C., Germano L., Ercole E., Aricò S., Fracchia M., Rigazio C., Lavagna A.,
Pellerito R., Migliardi M., Rocca R.
Evaluation of the diagnostic performance of two commercially available tests for Infliximab trough
levels (IFX-TL) and antibodies to Infliximab (ATI) titration in inflammatory bowel disease (IBD)

Daperno M., Lavagna A., Fracchia M., Guiotto C., Germano L., Rigazio C., Ercole E., Migliardi M.,
Pellerito R., Rocca R.
Clinical correlations of Infliximab trough levels (IFX-TL) and antibodies to Infliximab (ATI) in
inflammatory bowel disease