

Behandling af reumatoid artrit med anti-tumornekrosefaktor- α -antistof. Individuel monitorering af biotilgængelighed og immunogenicitet – sekundærpublikation

Professor Klaus Bendtzen, overlæge Pierre Geborek, cand.scient. Morten Svenson, sygeplejerske Lotta Larsson, læge Meliha C. Kapetanovic & professor Tore Saxne

Rigshospitalet, Institut for Inflammationsforskning (IIR), BioMonitor ApS, Symbion, og Lunds Universitetshospital, Reumatologisk Afdeling

Resume

Infliximab er effektiv ved reumatoid arthritis (RA), men behandlingssvigt er hyppige. Sera fra 106 RA-patienter monitoreredes med en radioimmunoassay (RIA) for funktionel infliximab og en RIA for anti-infliximab-antistof. S-infliximab varierede betydeligt, f.eks. 0-22 $\mu\text{g/ml}$ forud for tredje infusion, og efter seks måneder var 44% antistofpositive. Lav S-infliximab var forbundet med antistofudvikling og senere terapissvigt, og høje antistofniveauer kunne relateres til dosisøgning, bivirkninger og terapiophør. Farmakologisk monitorering kan formentlig optimere behandlinger med anti-tumornekrose-antistof.

Infliximab et mus-humant antistof mod tumornekrotiserende faktor- α (TNF) er i kombination med methotrexat (MTX) godkendt til behandling af moderat til svær reumatoid arthritis (RA), når behandling med *disease-modifying antirheumatic drugs* (DMARDs) er ineffektiv. Intravenøs infusion af infliximab, 3 mg/kg hver 4.-8. uge har i kliniske undersøgelser givet positivt resultat efter 30 uger hos ca. 55% af patienterne, og effekten kan bibeholdes for en tid med yderligere infusioner [1, 2]. Gentagne infusioner medfører imidlertid hos mange udvikling af antistoffer med behov for dosisøgning og risiko for bivirkninger og behandlingssvigt [3-6]. Det anbefalede behandlingsregimen er fastlagt på basis af kliniske undersøgelser af mange RA-patienter af begge køn med forskellig alder og varierende klinik og behandling [2]. I praksis kan en infliximabbehandlet RA-patient derfor afvige betydeligt fra gennemsnitspatienten i de randomiserede undersøgelser [7]. F.eks. kan forskelle i farmakokinetik betyde, at nogle patienter i perioder har utilstrækkelige koncentrationer af lægemidlet i blodet – et problem, der forværres i nærvær af antistoffer.

For at analysere dette udvikledes en radioimmun-assay (RIA) til funktionel måling af S-infliximab (i form af infliximabinduceret TNF-binding) samt en RIA for anti-infliximab-antistoffer, og begge anvendtes til immunkemisk monitore-

ring af RA-patienter efter en, halvanden, tre og seks måneders behandling.

Metoder

Patienter

Materialet i dette studie bestod af sera fra 106 tilfældigt udvalgte RA-patienter, der var i infliximabbehandling på Reumatologisk Afdeling, Lunds Universitetshospital. Kliniske data i op til 18 måneder var tilgængelige, herunder oplysninger om bivirkninger og årsager til behandlingsophør. Alle sera blev testet blindt i BioMonitor ApS (København). Detaljer er anført i [8].

Serum-infliximab

^{125}I -TNF blev tilsat serum, og fri og immunglobulin G (IgG)-bundet tracer blev skilt ved tilsætning af kanin-anti-humant Fc- γ -antistof. Infliximab blev anvendt som reference, og TNF-bindingskapaciteten blev udtrykt i infliximabækvivalenter. Detektionsgrænsen var 0,4 μg infliximab pr. ml fuldserum, og inter- og intra-assay-variationerne var hhv. < 20% og < 10%.

Anti-infliximab-antistof

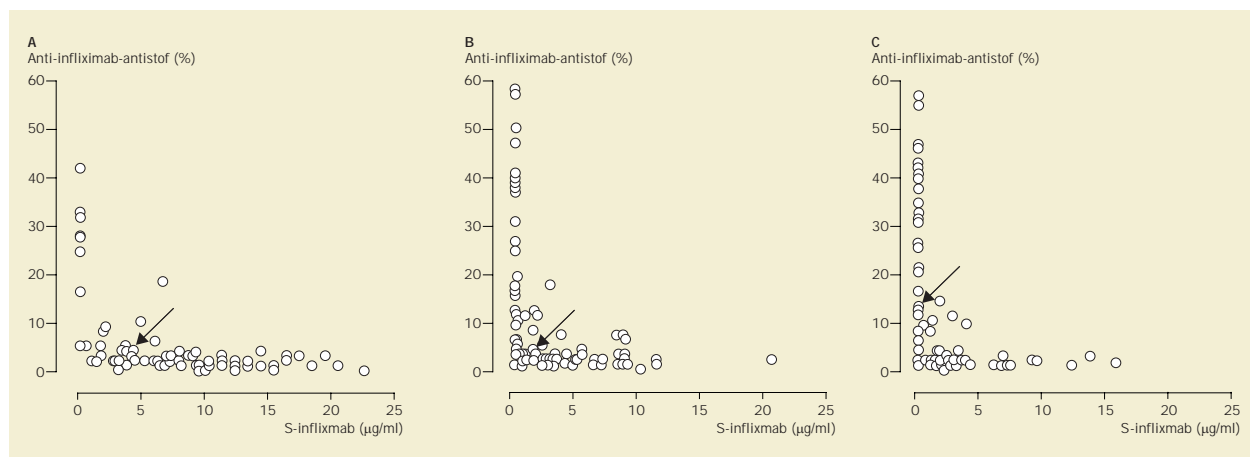
Infliximab er en immunglobulin (Ig)-konstruktion, som alene indeholder κ -letkæder; et anti-humant λ -letkæde-antistof kan derfor benyttes til at skelne mellem frit stof og infliximab bundet til λ -letkæde-Ig. ^{125}I -infliximab blev tilsat serum, og fri og Ig-bundet tracer blev adskilt ved affinitetskromatografi. Data blev angivet som procent Ig-binding af tilsat tracer. Baggrunden var 3%, og inter- og intra-assay-variationerne var hhv. < 20% og < 10%.

Resultater

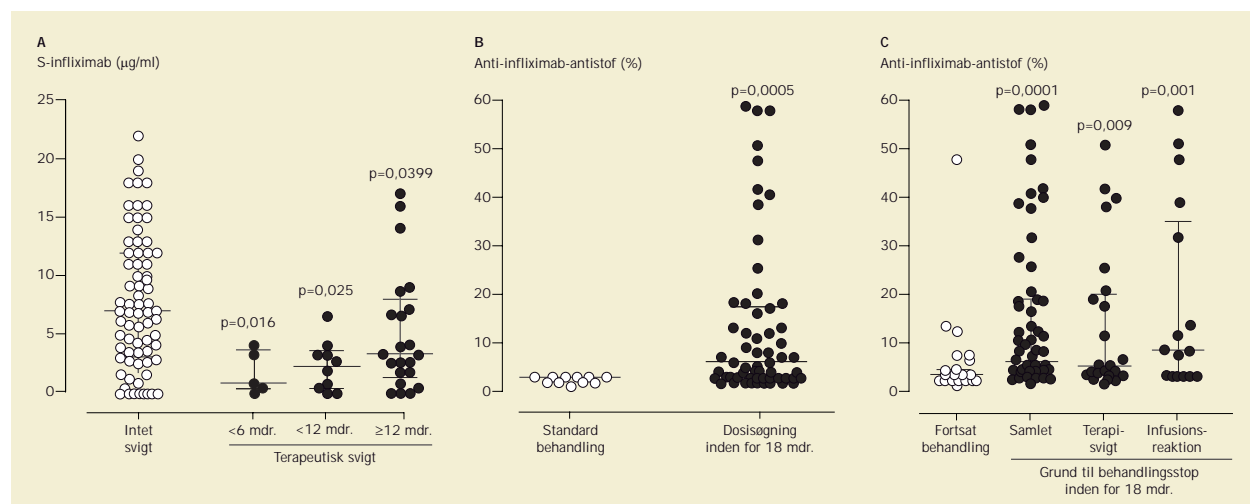
Klinisk karakteristik

Infliximabdosis var den anbefalede, 3 mg pr. kg, men den måtte øges hos 57 patienter mellem tredje og 12. måned pga. insufficient effekt. Af de 33 patienter, som i december 2005 fortsat blev behandlet med infliximab, var kun 11 på det initialt fastsatte regimen, idet øget dosering respektive mindsket dosering sås hos fire patienter fra tredje til 12. måned og hos 19 efter 12 måneder. I alt 23 infusionsreaktioner noteredes hos 22 patienter med behandlingsophør hos 15.

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION



Figur 1. S-infliximab og udvikling af anti-infliximabantistoffer i de første seks måneder. Sera isoleredes umiddelbart før tredje infusion (efter halvanden måned) (A) og efter tre måneder (B) og seks måneder (C). S-infliximab blev kvantificeret som det niveau af stoffet, som i en serumpool fra raske personer gav samme tumornekrosefaktorbinding som det analyserede serum. Pile: Data for patient, som var antistofpositiv før behandlingsstart.



Figur 2. Tidlige monitoreringsdata relateret til kliniske forløb. A. Infliximab i sera umiddelbart før tredje infusion (efter halvanden måned) og behandlingssvigt. B og C. Anti-infliximab-antistof efter tre måneder og øget dosering/behandlingsophør. P-værdier er udregnet med *Mann-Whitney rank sum test*.

Serum-infliximab og anti-infliximabantistof

Ingen sera var positive for TNF-binding før behandlingsstart. En patient var antistofpositiv før behandling (muligvis pga. antiallotype antistoffer), og 13%, 30% og 44% var positive efter hhv. halvanden, tre og seks måneders behandling (Figur 1). Med fremkomsten af antistoffer reduceredes S-infliximab (i de fleste antistof-positive sera var TNF-bindingen umålelig). Det er bemærkelsesværdigt, at den funktionelle biotilgængelighed af infliximab varierede voldsomt patienter imellem (Figur 1, X-akser), se også nedenfor. Ingen af fem kendte reumafaktorpositive sera (uden indhold af anti-infliximabantistof) interfererede i krydsningsforsøg med RIA for anti-infliximabantistof. Ved test af 12 antistofpositive sera opsamlet efter tre måneders behandling blev der ikke fundet nogen krydsbinding til to andre anti-TNF-Ig-konstruktioner, etanercept og adalimumab.

Lav serum-infliximab forud for infusion

- prædiktivt for terapistsvigt

S-infliximab før tredje infusion varierede betydeligt fra patient til patient, og hos et betragteligt antal med lave infliximabniveauer på dette tidlige tidspunkt (efter halvanden måned) udvikledes der terapistsvigt inden for observationsperioden (Figur 2A).

Højt antistofniveau - prædiktivt for dosisøgning og/eller terapistsvigt

Monitorering af antistoffer på et tidligt tidspunkt (efter tre måneder) kunne associeres til senere dosisstigninger pga. inadækvat klinisk effekt (Figur 2B). Tidlig udvikling af antistoffer kunne også associeres til senere behandlingsophør, hvad enten dette skyldtes terapistsvigt eller infusionsreaktioner (Figur 2C).

VIDENSKAB OG PRAKSIS | SEKUNDÆRPUBLIKATION

Initiale faktorerers indflydelse på serum-infliximab og antistofudvikling

Patienter med lav S-infliximab efter to infusioner var mest udsatte for at udvikle antistoffer på et senere tidspunkt (seks måneder), i modsætning til patienter med høje niveauer [8]. Patienter med høj sygdomsaktivitet før behandlingsstart, bedømt ved plasma-C-reaktivt protein (CRP), havde mindsket S-infliximab i forhold til patienter med lav sygdomsaktivitet. Udtalt sygdomsaktivitet, bedømt ved *disease activity score* 28 (DAS28), kunne også associeres til udvikling af højere antistofniveauer.

Behandling med MTX havde ingen sikker virkning på frekvensen af antistofpositive patienter ved seks måneder: 20 ud af 50 (40%) vs. 13 ud af 26 (50%). De MTX-behandlede havde dog let nedsatte niveauer af antistoffer: median: 5% (kvartiler: 3, 20) vs. median: 11% (kvartiler: 4, 43), $p = 0,037$. Behandling med andre DMARDs og prednisolon havde ingen indflydelse på antistofudviklingen.

Diskussion

Anti-TNF-biofarmaka anvendes i stigende omfang til behandling af patienter med RA og andre kroniske betændelsesygdomme [3-6]. Desværre byder behandlingerne på mange problemer. Det er f.eks. ikke givet, at alle patienter har samme doseringsbehov, og det er uvist, hos hvor mange der udvikles antistoffer under behandlingen med risiko for bivirkninger og terapisvigt. De biologiske lægemidler er også kostbare, og den økonomiske belastning for samfundet er unødigt høj, hvis patienterne fortsætter behandlingen på trods af udvikling af neutraliserende antistoffer, eller hvis patienterne fortsætter en formentlig unødigt og kostbar behandling, på trods af at de er i remission. Behovet for farmakologisk monitorering er derfor stigende. Desværre er det sandsynligt, at ikke alle »bindende« antistoffer målt med relativt enkle ELISA-lignende metoder er funktionelle, dvs. at antistofferne hindrer medikamentet i at nå de afficerede led, neutraliserer bindingen til TNF, eller er årsag til overfølsomhedsreaktioner eller andre komplikationer [5]. Funktionel analyse af anti-TNF-lægemidler i blodet og monitorering af »neutraliserende« antistoffer kan afhjælpe en del af problemerne.

Vi har udviklet en *fluid-phase*-RIA til monitorering af den af infliximabopnåede TNF-binding i blodet (S-infliximab) og en *fluid-phase*-RIA for anti-infliximabantistoffer og anvendt disse metoder til systematisk analyse af 106 RA-patienter i infliximabbehandling. Analysen af funktionsdygtig infliximab viser, at patienter i standarddosering udviser betydelige forskelle vedr. blodets evne til at binde TNF. Grunden til, at den anbefalede dosering ikke er optimal til alle patienter, er ukendt, men da infliximab administreres intravenøst med fuld initial biotilgængelighed, kan en central faktor være individuelle forskelle i konsumptionen af lægemidlet. F.eks. kan det totale TNF-*load* i organismen (ikke blot i blodet), og dermed bindingen af infliximab in vivo, tænkes at variere betydeligt hos patienter med forskellig sygdomsaktivitet. Dette under-

støttes af både vore og andres fund [8, 9]. Det er interessant, at der hos disse patienter også er større tendens til antistofudvikling og senere behandlingsvigt.

Problemet med antistofudvikling mod anti-TNF-biofarmaka er nu genstand for øget international interesse, dog ofte uden at der er fundet en klar relation mellem induktion af antistoffer og terapisvigt [3-6]. I vort studie var antistofudvikling klart associeret til øget risiko for dosisøgning og senere behandlingsvigt samt infusionsreaktioner. Der er flere mulige forklaringer på disse forskelle. Den hyppige brug af fastfaseteknologier til måling af anti-anti-TNF-antistoffer er formentlig en af dem, idet ELISA kan give falsk positive resultater, bl.a. fordi man med teknikken vanskeligt skelner mellem klinisk betydningsfulde, specifikke antistoffer og uspecifikt (lavaffint) Ig [10].

Et andet problem er, at måling af antistoffer mod infliximab påvirkes af lægemidlets tilstedeværelse i cirkulationen (det er i sig selv et »humant« antistof) [5]. Vi har forsøgt at mindske dette problem ved alene at evaluere sera indhentet umiddelbart før næste infusion af infliximab. Alligevel kan det tænkes, at niveauet af anti-infliximabantistoffer er underestimeret [8].

Resultaterne af dette studie viser, at tidlig monitorering af RA-patienter kan give vigtige oplysninger, som forhåbentlig kan bidrage til mere rationel brug af infliximab. F.eks. kan patienter med lave niveauer af cirkulerende infliximab have fordel af øget dosering og/eller kortere doseringsintervaller, og antistofudvikling hos en patient med klinisk aktivitet bør sætte spørgsmålstegn ved værdien af fortsat behandling. Men antistofudvikling hos en symptomfri patient bør også give anledning til overvejelser om, hvorvidt patienten er i remission og ikke har gavn af en fortsat immunisering.

Korrespondance: Klaus Bendtzen, Institut for Inflammationsforskning IIR7521, Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: kben@mail.dk

Antaget: 6. december 2006

Interessekonflikter: Klaus Bendtzen er anpartshaver i BioMonitor ApS og har modtaget honorarer fra Wyeth og Schering-Plough. Pierre Geborek har modtaget honorarer fra Wyeth Sweden, SP Sweden og Abbott Sweden. Finansiell støtte: Studiet blev støttet af det Danske Bioteknologiske Program, EU FP6, det Svenske Forskningsråd, Kong Gustaf V 80-års Fond, den Svenske Gigtforening og Österlund & Kock's Fond. This article is based on a study first reported in the *Arthritis & Rheumatism* 2006;54:3782-9.

Litteratur

1. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:1552-63.
2. Moreland LW. Drugs that block tumour necrosis factor: experience in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacoeconomics* 2004;22:39-53.
3. Wagner CL, Schantz A, Barnathan E et al. Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro and Remicade. *Dev Biol (Basel)* 2003;112:37-53.
4. Feldmann M, Brennan FM, Foxwell BM et al. Anti-TNF therapy: where have we got to in 2005? *J Autoimmun* 2005;25 suppl:26-8.
5. Cheifetz A, Mayer L. Monoclonal antibodies, immunogenicity, and associated infusion reactions. *Mt Sinai J Med* 2005;72:250-6.
6. Anderson P, Louie J, Lau A et al. Mechanisms of differential immunogenicity of tumor necrosis factor inhibitors. *Curr Rheumatol Rep* 2005;7:3-9.

7. Flendrie M, Creemers MC, Welsing PM et al. Survival during treatment with tumour necrosis factor blocking agents in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2003;62 suppl 2:ii30-ii33.
8. Bendtzen K, Geborek P, Svenson M et al. Individualized monitoring of drug bioavailability and immunogenicity in rheumatoid arthritis patients treated with the tumor necrosis factor alpha inhibitor Infliximab. *Arthritis Rheum* 2006;54:3782-9.
9. Wolbink GJ, Vis M, Lems W et al. Development of antiinfliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54:711-5.
10. Hennig C, Rink L, Fagin U et al. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *J Immunol Methods* 2000;235:71-80.

Amphetaminmisbrug medførende akut hjertetransplantation

1. reservelæge Lars Peter Riber Zebis,
1. reservelæge Thomas Decker Christensen,
1. reservelæge Morten Böttcher, overlæge Hans E. Eiskjær,
overlæge Anne-Grethe Lorenzen,
ledende overlæge Lars B. Ilkjær & overlæge Ulrik Baandrup

Århus Universitetshospital, Skejby Sygehus,
Hjerte-lunge-karkirurgisk Afdeling T, Kardiologisk Afdeling B og
Intensiv Afdeling I, og
Århus Universitetshospital, Århus Sygehus, Patologisk Institut

Heroin kan forårsage koronartrombose og udvikling af akut koronarsyndrom, hvilket nødvendiggør intervention primært i form af perkutan koronarintervention (PCI) eller akut hjertetransplantation [1]. Amphetamin kan medføre akut koronarsyndrom, men der har indtil nu ikke været rapporteret om myokardieinfarkt og hjertetransplantation i den forbindelse [2, 3].

Sygehistorie

En 28-årig mand med et velkendt langvarigt festmisbrug af amphetamin vågnede med trykken for brystet efter indtag af amphetamin. Et fornyet indtag gav lindring, men efter et par timer tiltog fornemmelsen, og patienten blev indlagt på det lokale hospital med retrosternale smerter. Et elektrokardiogram viste 2 mm ST-elevationer i I og III og 3 mm i II og aVF, hvilket er foreneligt med forvægsinfarkt. Patienten var hæmodynamisk ustabil og kollaberede efter få minutter med ventrikelflimmer. Han blev under behandling med amiodaron og adrenalin *direct current* (DC)-konverteret til sinusrytme og intuberet. Han blev overflyttet til et invasivt center mhp. akut PCI-behandling. Ved ankomsten var han hypotensiv (blodtryk 60/30) og havde sinustakykardi vekslende med ventrikelflimren. En akut koronarangiografi (KAG) viste massiv okklusion af proksimale ramus descendens anterior (LAD), første diagonal og de septale grene. Der blev foretaget trombektomi vha. Rescue-system og to paclitaxelfrigivende stents

blev placeret proksimalt i LAD, hvilket medførte *thrombolysis in myocardial infarction* (TIMI) 3-flow. I første diagonal kunne der ikke anlægges stent, men ballonangioplastik efterfulgt af intrakoronar 7,5 mg alteplase resulterede i TIMI 2-flow. Grundet intermitterende bradykardi blev der anlagt interne pancelektroder. Optimering af den koronare perfusion blev sikret ved anlæggelse af en aortaballongpumpe. En ekkokardiografi viste en uddrivningsfraktion på 15-20% og hypokinesi til akinesi apikalt, anteriort og septalt. Der blev udført toksikologi på urinen fra de første 24 timer efter ankomsten til det invasive center, og denne viste spor af amphetamin.

I det følgende døgn fik patienten rbdomyolyse, kom i hæmodialyse (*continuous veno-venous hemofiltration/dialysis* (CVVHD)) og fik feber op til 40,2°C uden infektiøs focus. På trods af intensiv medicinsk inotropisk støtte i form af fosfodiesteraseinhibitor, noradrenalin, dopamin, adrenalin og dobutaminhydroklorid samt den anlagte aortaballongpumpe var patienten vedvarende hæmodynamisk ustabil, hvorfor han blev sat på akutlisten til hjertetransplantation, som blev gennemført fire dage senere. I den postoperative periode var der ingen væsentlige problemer, og der blev ikke observeret nogen afstødning i rutine-myokardie-biopsierne. De patologiske fund i det eksplanterede hjerte er vist i **Figur 1**. Der var ingen tegn på koronar arteriosklerose, og de koronare stents var velplacerede. Patienten blev udskrevet i velbefindende fra hospitalet 44 dage efter operationen. Kognitive test viste ingen tegn på neurologiske udfald.

Patienten blev genindlagt på et invasivt center i kardiogent shock ca. seks måneder efter hjertetransplantationen med tredjegrads AV-blok og LAD-stenose. Han benægtede anvendelse af amphetamin og/eller andre narkotiske stoffer siden hjertetransplantationen. En toksikologisk test og undersøgelse for koagulopati gav negativt resultat. Patienten var uden for terapeutisk rækkevidde og gik ad mortem ca. syv måneder efter den succesfulde hjertetransplantation. Ved de patologiske undersøgelser ved sektion blev der fundet trombemasse i LAD og højre koronararterie samt mikroskopisk fortykket intima, hvilket er foreneligt med kronisk vaskulær rejektion.