

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt
Rheumatologie und Klinische Immunologie (einschließlich Arbeitsbereich
Physikalische Medizin CBF/CCM)
Abteilung Neue Therapien
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Drugmonitoring von TNF- α -Inhibitoren bei
chronisch - rheumatischen Erkrankungen im klinischen
Alltag**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Helene Vera von Bremen

aus Dortmund

Datum der Promotion: 05.03.2021

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
2	KURZZUSAMMENFASSUNG	6
3	ABSTRACT	8
4	EINLEITUNG	10
4.1	Biopharmazeutika	10
4.2	Monoklonale Antikörper	11
4.2.1	Einsatzgebiete der monoklonalen Antikörper	12
4.3	TNF- α -Inhibitoren	13
4.4	Exkurs in die Klinik und Pathogenese rheumatischer Gelenkerkrankungen	16
4.4.1	Rheumatoide Arthritis	16
4.4.2	Spondyloarthritis	16
4.4.3	Therapie der chronisch-entzündlichen Erkrankungen	18
4.5	Immunogenität und TNF- α -Inhibitor-Therapie	18
4.5.1	Bildung von Anti-TNF- α -Antikörpern	19
4.5.2	Die Auswirkungen von Anti-Drug-Antikörpern auf die Medikamentenwirksamkeit	20
4.5.3	Mit Immunogenität assoziierte Faktoren	21
4.5.3.1	Individuelle Faktoren	21
4.5.3.2	Therapieassoziierte Faktoren	21
4.5.3.3	Pharmakonassoziierte Faktoren	22
4.6	Nachweisverfahren für Immunogenität von TNF- α -Inhibitoren und deren Besonderheiten	23
4.7	Konsequenzen von Anti-Drug-Antikörper-Bildung in der Klinik	24
5	HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT	26
6	MATERIALIEN UND METHODEN	28
6.1	Rekrutierung und Auswahl der Patient*innen	28
6.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie	29
6.2	Scores zur Erhebung der klinischen Krankheitsaktivität	30
6.2.1	Disease Activity Score 28 zur Erhebung der Krankheitsaktivität bei der Rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis Arthritis	30
6.2.2	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index zur Erhebung der Krankheitsaktivität bei Ankylosierender Spondylitis	31
6.3	Bestimmung der Therapieantikörper Serumspiegel und deren Anti-Drug-Antikörper mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay	32
6.3.1	Assays zum Nachweis von Infliximab- und Adalimumabkonzentrationen, Hersteller Sanquin	33
6.3.2	Assay zum Nachweis von Infliximab- und Adalimumabkonzentrationen, Hersteller Immundiagnostik AG	35
6.3.3	Assay zum Nachweis von totalen Anti-Drug-Antikörpern gegen Infliximab und Adalimumab	36
6.3.4	Assay zum Nachweis von freien Anti-Drug-Antikörpern gegen Infliximab und Adalimumab	38
6.3.5	Therapeutischer Bereich	40
6.4	Statistische Auswertung	40
7	ERGEBNISSE	42
7.1	Studiencharakteristika	42

7.2	Deskriptive Statistik	42
7.2.1	Adalimumab	43
7.2.2	Infliximab	46
7.3	Statistische Analyse	50
7.3.1	Auswirkung von totalen Anti-Drug-Antikörpern auf die korrespondierenden Serumspiegel	50
7.3.2	Auswirkung von freien Anti-Drug-Antikörpern auf die korrespondierenden Serumspiegel	52
7.3.3	Auswirkungen der Medikamentenspiegel auf die Krankheitsaktivität	54
7.3.4	Einfluss von totalen und freien Anti-Drug-Antikörpern auf die Krankheitsaktivität	56
7.3.5	Prävalenz von Anti-Drug-Antikörpern bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern	58
7.3.6	Vergleich der Prävalenz von Anti-Drug-Antikörpern zwischen Adalimumab und Infliximab	58
7.3.7	Einfluss von einer Kombinationstherapie mit einem konventionellen DMARD auf die totale und freie Anti-Drug-Antikörper und Produktion	61
7.4	Vergleich der verschiedenen Assays zur Erhebung der Medikamenten-konzentration	62
7.5	Anti-Drug-Antikörper-assoziierte Nebenwirkungen	63
8	<u>DISKUSSION</u>	64
8.1	Anti-Drug-Antikörper beeinflussen den Serumspiegel der Therapieantikörper	65
8.2	Klinische Wirksamkeit im Zusammenhang mit Anti-Drug-Antikörpern und Therapieantikörperspiegeln	66
8.3	Immunogenität bei chronisch-inflammatorischen Krankheitsbilder	67
8.4	Immunogenität von Adalimumab und Infliximab	69
8.5	Besonderheiten und Unterschiede in den jeweiligen Messverfahren	70
8.5.1	Nachweis der Therapieantikörperkonzentrationen	70
8.5.2	Nachweis und Bedeutung von totalen und freien Anti-Drug-Antikörpern	70
8.6	Sicherheit	72
8.7	Therapeutisches Drugmonitoring in der Rheumatologie	72
8.7.1	Wirtschaftliche Bedeutung des therapeutischen Drugmonitorings	74
8.7.2	Standardisierte Nachweisverfahren – Hindernis und Herausforderung für therapeutisches Drugmonitoring	74
8.7.3	Therapeutisches Drugmonitoring im klinischen Alltag	76
8.8	Stärken und Schwächen der Studie	79
8.8.1	Proband*innenkollektiv	79
8.8.2	Daten zur klinischen Krankheitsaktivität	80
8.8.3	Serologische Testqualität	80
8.9	Geplante Veröffentlichungen und weiterführende Untersuchungen	81
8.10	Zukunftsmarkt Biosimilars	82
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	84
10	<u>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</u>	95
11	<u>TABELLARISCHER LEBENSLAUF</u>	97
12	<u>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG</u>	98
13	<u>DANKSAGUNG</u>	99

Diese Arbeit wurde auf der Grundlage des Beschlusses des Bundesverfassungsgerichts zur Anerkennung eines dritten Geschlechtes und nach Beratung durch die Zentrale Frauen- und Gleichstellungsbeauftragte der Charité-Universitätsmedizin Berlin in geschlechtergerechter Sprache verfasst.

1 Abkürzungsverzeichnis

ABT	Antigen-Bindingtest	MTX	Methotrexat
ADA	Anti-Drug-Antikörper	NF-κB	Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of activated B-Cells
AHLC	Antihuman-Lambda-Chain Assay		
AU	Arbitrary Unit	nm	Nanometer
AS	ankylosierende Spondylitis	ng	Nanogramm
ASAS	Assessment of SpondyloArthritis	NSAR	nichtsteroidale Anti-rheumatika
ASDAS	Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score	OD	optische Dichte
BE	Bridging ELISA	p	Signifikanzwert
BASDAI	Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index	PBS	Phosphat Buffered Saline
BSG	Blutsenkungs-geschwindigkeit	PsA	Psoriasis Arthritis
CHO	Chinese Ovary Cell	POD	Peroxidase
CD	Cluster of Differentiation	r	Korrelationskoeffizient r
C _H	Heavy Chain/ constant heavy	RA	Rheumatoide Arthritis
C _L	Light Chain/ constant light	RCT	randomisiert kontrollierte Studie
CRP	C-reaktives Protein	RIA	Radioimmunoassay
DAS-28	Disease Activity Score 28	s.c.	subkutan
cDMARD	conventional Disease Modifying Anti- Rheumatic Drug	SJC	Swollen joint count
ELISA	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay	s.o.	siehe oben
EPO	Erythropoetin	SDAI	Simplified Disease Activity Index
Fab	Fragment of Antigen Binding	SFPE	Semi-Fluid Phase Enzyme Immunoassay
Fc	Constant Fragment	SpA	Spondyloarthritis
fADA	freie Anti-Drug-Antikörper	tADA	totale Anti-Drug-Antikörper
HLA	Human Leucocyte Antigen	TJC	Tender joint count
HRP	Meerrettichperoxidase	TDM	Therapeutisches Drugmonitoring
HWZ	Halbwertszeit	TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
IBD	Inflammatory Bowel Disease	TNF	Tumor Necrose Factor
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule	u.a.	unter anderem
IgG	Immunglobulin G	UAW	unerwünschte Arzneimittelwirkung
IL	Interleukin	μg	Mikrogramm
i.v.	intravenös	μl	Mikroliter
KG	Körpergewicht	VCAM	Vascular Cell Adhesion Molecule
mAk	monoklonale/r Antikörper	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
MAP	Mitogen-Activated Protein	vs.	versus
min	Minute	χ ²	Chi-Quadrat-Test, Fisher-Test
ml	Milliliter	z.B.	zum Beispiel
mg	Milligramm	ZP	Zeitpunkt

2 Kurzzusammenfassung

Hintergrund: Tumor-Necrose-Faktor (TNF)- α -Inhibitoren sind wirksame Medikamente bei vielen chronisch-inflammatorischen Erkrankungen. Trotz einer akzeptablen Wirkungsrate gibt es einen beachtlichen Anteil an Patient*innen, bei denen ein primärer oder sekundärer Wirkverlust beobachtet wird. Eine mögliche Erklärung für das fehlende Therapieansprechen wird in der Immunogenität von Biologika gesehen. Die resultierenden Anti-Drug-Antikörper (ADA) können die Wirkung der Biologika abschwächen und/oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) hervorrufen.

Ziel: Neue kommerzielle Assays zur Erfassung von ADA und deren korrespondierenden Medikamenten-Serumspiegeln sollten im klinischen Alltag evaluiert werden. Weiterhin sollten Effekte der ADA auf Medikamentenspiegel und klinischen Verlauf untersucht werden.

Methodik: Die vorliegende Studie umfasst 47 Patient*innen, von denen 17 mit Adalimumab und 30 mit Infliximab behandelt wurden. Bei den Patient*innen bestand eine gesicherte Rheumatoide Arthritis (RA), ankylosierende Spondylitis (AS) oder Psoriasis Arthritis (PsA). Bei den vorhandenen Proben wurden zu mindestens zwei Zeitpunkten (insgesamt 145 Proben) der Serumspiegel des Therapieantikörpers, sowie die totalen ADA (tADA) und freien ADA (fADA) mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) bestimmt und in Zusammenhang mit der Krankheitsaktivität gesetzt. Weiter wurde die Inter-Assay-Variabilität untersucht.

Ergebnisse: Unter der Therapie mit Adalimumab wurden bei 7 Patient*innen (41,2%) tADA gemessen, von denen 2 Patient*innen (28,6%) auch fADA positiv waren. 85,7% der Patient*innen hatten bei positiven tADA zu mindestens einem Zeitpunkt subtherapeutische Adalimumab Spiegel. Es zeigte sich in dieser Gruppe kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ADA und der Krankheitsaktivität. Unter Infliximab ließen sich bei 19 Patient*innen (63,3%) positive tADA nachweisen, von denen 13 Patient*innen (68,4%) auch fADA hatten. Bei 94,7% der Patient*innen mit positiven tADA konnten zu ≥ 1 Messzeitpunkt subtherapeutische Infliximabkonzentrationen gemessen werden. Bei 36,7% der Infliximab Patient*innen war ein permanenter Nachweis von tADA und bei 10,0% auch von fADA zu allen Messzeitpunkten möglich.

Unter Infliximab gingen hohe tADA-Titer mit einer höheren Krankheitsaktivität einher und fADA traten nur bei moderaten bis hohen tADA-Titern auf. Die ADA-Prävalenz zwischen den einzelnen Krankheitsbildern zeigte keinen deutlichen Unterschied.

Schlussfolgerungen:

Serum ADA gegen Adalimumab und Infliximab gehen mit einer Erniedrigung des korrespondierenden Therapieantikörperspiegels einher. Die ADA-Prävalenz ist bei Infliximab gegenüber Adalimumab erhöht. Die Prävalenz der ADA bei den verschiedenen Krankheitsbildern unterscheidet sich in unserer Erhebung nicht. Eine Erfassung von ADA und korrespondierenden Medikamenten-Serumspiegeln im Rahmen der Verlaufsuntersuchungen kann relevante Informationen für das Monitoring einer Adalimumab- und Infliximabtherapie im klinischen Alltag liefern.

3 Abstract

Background: Tumor-necrosis-factor (TNF)- α -inhibitors represent an effective treatment for various chronic-inflammatory diseases. Despite acceptable response rates, a considerable amount of patients suffer from primary or secondary treatment failure. This could be partially due to an immunogenicity of the biologicals. The lack of clinical response to the treatment can be explained by the formation of anti-drug-antibodies (ADA). They can limit the treatment success by suppressing the drug and restraining its therapeutic role or by inducing side effects.

Objectives: The aim of this investigation was to evaluate commercial assays for the detection of ADA and the corresponding drug levels in everyday clinical life. To describe effects of ADA formation on drug levels and clinical outcome.

Methods: The cohort consisted of 47 patients treated with adalimumab (17 patients) or infliximab (30 patients), with an established diagnosis of rheumatoid arthritis (RA), ankylosing spondylitis (AS) or psoriasis arthritis (PsA). The patients were screened for total ADA (tADA) and free ADA (fADA) using enzyme-linked-immuno-sorbent-assays (ELISA) at least at two different visits (in total 145 samples) in correlation to clinical disease activity. Further the results of the assays were compared for inter-assay variability.

Results: On adalimumab therapy, 7 patients (41.2%) were positive for tADA, 2 of these (28,6%) were also positive for fADA. 85.7% with positive tADA had subtherapeutic adalimumab levels at least at one visit. No significant correlation between disease activity and the existence of ADA was observed in this group. On infliximab therapy, 19 patients (63.3%) were positive for tADA, 13 of these (43.3%) were also positive for fADA. 94.7% with positive tADA for infliximab had subtherapeutic drug levels at least at one visit. In 36.7% of patients treated with infliximab, tADA were detected at each measurement time point. fADA were detected permanently in 10,0% of patients. In the Infliximab treatment group, high tADA-titer correlated with a high disease activity. Positive samples for fADA were only found with the coexistence of high tADA levels. No clear difference in ADA level prevalence was found in the investigated patients with respect to the underlying disease.

Conclusions: Serum ADA against adalimumab and infliximab are associated with lower serum trough levels. The prevalence of ADA is higher under infliximab than under adalimumab. No difference in prevalence of ADA between the different chronic-inflammatory diseases was observed. Based on our investigation, screening for ADA and the corresponding drug levels can provide useful information for the monitoring of adalimumab or infliximab therapy in daily clinical life.

4 Einleitung

Der Einsatz von Biologika hat das Management chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis (RA), Psoriasis Arthritis (PsA), ankylosierender Spondylitis (AS) und von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen revolutioniert. Die Tumor-Necrose-Factor(TNF)- α -blockierenden Therapieantikörper Adalimumab, Infliximab und das Fusionsprotein Etanercept sind in diesem Zusammenhang die am häufigsten eingesetzten Therapeutika ^{1,2}. Trotz einer akzeptablen Wirkungsrate gibt es einen beachtlichen Anteil an Patient*innen, bei denen diese Medikamente keine ausreichende Wirkung zeigen und somit ein primärer Wirkverlust oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen beobachtet werden. Außerdem gibt es Patient*innen, die nach einem initial guten therapeutischen Ansprechen einen sekundären Wirkverlust erfahren ^{1,2}. Eine mögliche Erklärung wird in der Immunogenität von Biologika gesehen, da alle biotechnologisch hergestellten Arzneimittel potentielle immunogene Eigenschaften aufweisen. Die resultierenden Anti-Drug-Antikörper (ADA) können die Wirkung der Biologika abschwächen und/oder unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) provozieren. In mehreren Studien konnte bereits ein Zusammenhang zwischen ADA-Formation, niedrigen Serum-Medikamentenspiegeln und Wirkverlust oder Abschwächung der TNF- α -Inhibitoren beschrieben werden ²⁻⁵.

Die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Drugmonitoring von TNF- α -Inhibitoren bei chronisch-rheumatischen Gelenkerkrankung im klinischen Alltag“ untersucht die Auswirkungen von therapiebedingten ADA bei Patient*innen mit RA, PsA und AS unter Biologikatherapie mit Adalimumab oder Infliximab und vergleicht verschiedene Testverfahren.

4.1 Biopharmazeutika

Biopharmazeutika, auch Biologika genannt, sind Arzneimittel, die biotechnologisch mit Hilfe von gentechnisch veränderten lebenden Organismen hergestellt werden ⁶. Sie ermöglichen es, auf gezielte Moleküle im Körper zu wirken und so therapeutisch zu intervenieren ⁷. Rekombinantes Humaninsulin wurde 1982 zum ersten Mal geklont und war das erste auf dem Markt erhältliche Biopharmazeutikum. Es hat in der Folge das bis dahin übliche Insulin von Schweinen in der Behandlung des insulinpflichtigen Diabetes mellitus abgelöst ⁸. Durch den biotechnologischen Herstellungsprozess ist es möglich,

Wirkstoffe herzustellen, die zuvor nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen, wie zum Beispiel (z.B.) das Protein Erythropoetin (EPO). Dieses ist für die Induktion neuer Blutzellen verantwortlich und wird vor allem bei Anämien dialysepflichtiger Patient*innen eingesetzt. Früher wurde EPO aus menschlichem Urin gewonnen ⁹.

Die am häufigsten für die Produktion von Biologika eingesetzten biologischen Organismen sind Bakterien, Hefen und einige wenige Säugetierzellen. Bei Letzteren werden vor allem die sogenannten CHO-Zellen (Chinese-Hamster-Ovary) verwendet. Diese Zelllinie ist immortalisiert und wurde 1957 von Theodore T. Puck aus einer Primärkultur von Ovarienzellen dieser Hamster isoliert ¹⁰. Seitdem ist sie (in verschiedene Zelllinien modifiziert) die am häufigsten verwendete Zelllinie für die Produktion rekombinanter Proteine ³.

Im Unterschied zu den Originalpräparaten sind Biosimilars mit diesen nicht identisch und bedürfen deshalb einer eigenen Prüfung vor der Zulassung. So können sie sich beispielsweise in der Struktur von angefügten Kohlenhydratgruppen unterscheiden und demnach eine andere Bioverfügbarkeit bzw. Biointeraktion haben. Aber auch Originalpräparate können im Produktionsablauf durchaus Unterschiede aufweisen und sich von einer Charge zur anderen geringfügig unterscheiden, obwohl die Produktionsbedingungen unverändert sind. Die Verwendung von Biosimilars ist erst nach dem Ablauf des Patentschutzes des Originalpräparates möglich ^{11,12}.

4.2 Monoklonale Antikörper

Zu den biopharmazeutisch hergestellten Substanzen gehören verschiedene Proteine wie z.B. therapeutische Enzyme, Impfstoffe, Gerinnungsfaktoren, Hormone, Wachstumsfaktoren und Interleukine ⁷.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird der Fokus auf die monoklonalen Antikörper (mAk) gelegt. Sie sind synthetisch hergestellte therapeutische Immunglobuline vom Subtyp G (IgG). IgGs sind Y-förmige Antikörper, die aus vier Polypeptidketten bestehen, von denen jeweils zwei Ketten schwer (C_H) und zwei leicht (C_L) sind. Jeder Antikörper besteht aus zwei Domänen, nämlich einem spezifischen konstanten „constant fragment“ (Fc)- und einem variablen „fragment of antigen binding“ (Fab)-Teil. Mit dem Fab-Teil bindet der

Antikörper sein spezifisches Antigen. Durch diese Bindung wird eine spezifische Immunantwort ausgelöst. Weiter gibt es innerhalb der variablen Fab-Region hypervariable Regionen, die die Spezifität des Antikörpers bestimmen ^{1,11}. Eine schematische Darstellung zeigt Abbildung 1.

MAks werden alle von derselben Zelllinie („Klon“) produziert und haben als Mutterzelle denselben B-Lymphozyten. Aufgrund der monovalenten Affinität binden sie immer an das gleiche Epitop eines bestimmten Antigens ¹¹. Alle therapeutischen mAks tragen das Suffix -„mab“, welches „monoclonal antibody“ bedeutet. Murine Antikörper (Suffix Nomenklatur -omab) stammen vollständig von der Maus. Ein Antikörper, dessen konstante Region durch eine humane Form ersetzt wurde, wird als chimärer mAk (-ximab) bezeichnet. Wenn zusätzlich noch Teile der variablen Region ersetzt werden, ist der Antikörper humanisiert (-zumab). In diesem Fall sind ausschließlich die Antigenbindungsstellen mit Mausprotein besetzt. Kombinationen aus chimären und humanisierten mAks erhalten die Silbe -xizumab. Vollständig humane Antikörper tragen demnach keine Mausequenzen und haben die Silbe -umab ¹³. Hergestellt werden die mAk ebenfalls in den CHO-Zellen ^{14,15}.

4.2.1 Einsatzgebiete der monoklonalen Antikörper

Die oben genannten Beispiele lassen die vielseitigen Einsatzmöglichkeiten der mAks erahnen. In der Tumorthherapie eingesetzte mAks binden an die auf der Tumoroberfläche exprimierte Rezeptoren und verhindern so deren unkontrollierte Zellteilung ¹¹. Ein Vertreter ist Trastuzumab, ein gegen den Rezeptor des Oberflächenproteins Human Epidermal Growth Factor 2 (HER2) gerichteter Therapieantikörper, der von einigen Mamma-Karzinomen exprimiert wird ¹⁴. Bevacizumab ist ein mAk, der gegen den Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) gerichtet ist. Dadurch wird die Neoangiogenese von Tumorzellen unterbunden ¹¹.

Rituximab als Antikörper gegen das auf den reifen B-Zellen und Plasmablasten exprimierte Cluster of Differentiation (CD) CD20 wird sowohl in der Tumorthherapie (bei B-Zell Lymphomen) als auch in der Rheumatologie eingesetzt ^{6,16}.

4.3 TNF- α -Inhibitoren

Durch die Entwicklung von TNF- α -Blocker in den letzten 3 Jahrzehnten wurde der Einsatz von Biologika in der Therapie der RA und weiterer chronisch-inflammatorischer Erkrankungen möglich^{1,2}. TNF- α ist ein primär membranständiges Zytokin mit pro-inflammatorischen Eigenschaften, das vor allem von Monozyten/Makrophagen oder B- und T- Zellen gebildet wird¹⁷⁻¹⁹. Durch enzymatische Spaltung kann zusätzlich eine lösliche Form entstehen. Beide Zytokinformen können an die TNF- α -Rezeptoren (TNF-Rezeptor 1 bzw. CD120a und TNF-Rezeptor 2 bzw. CD120b) binden und somit zur Aktivierung von Entzündungskaskaden über „nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells“ (NF- κ B) und „mitogen-activated protein“ (MAP)-Kinasen führen¹⁸. Unter anderem fördert TNF- α die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Interleukin (IL) -1²⁰. Als Reaktion auf eine Infektion dient die pro-inflammatorische Ausschüttung von TNF- α dem Organismus dabei Immunität zu entwickeln. TNF- α Überexpression kann jedoch zur Entstehung von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen beitragen. Deshalb ist eine strenge Regulation der TNF- α Produktion wichtig, um den Organismus vor deren zerstörender Wirkung zu schützen^{18,21}. TNF- α ist ein pleiotropes Zytokin, welches seine Wirkung unter anderem auf Knochen- und Knorpelzellen entfaltet. Durch Stimulation der Metalloproteinasesynthese oder Unterdrückung der Produktion extrazellulärer Matrixproteine wird Knochen- und Knorpeldegradation sowie Resorption vermittelt. Mausmodelle konnten diese Effekte bestätigen²².

TNF- α -Inhibitoren binden sowohl an das lösliche als auch an das membranständige TNF- α und führen so zu einem kurzzeitigen Anstieg der T-Lymphozyten und einem längerfristigen Abfall der Monozyten sowie zu einem Abfall von Zytokinen (v.a. IL-1 β und IL-6), Adhäsionsmolekülen (z.B. E-Selectin, Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM – 1) und Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1)). Dadurch wird die Leukozytenmigration in die Gelenke reduziert, wodurch die Konzentration der Granulozyten im Gelenk abnimmt^{22,23}. Weiter wurde gezeigt, dass durch die Blockade von TNF- α , VEGF und dadurch die Angiogenese im Synovium reduziert wird^{24,25}.

Adalimumab (Humira ®, AbbVie) ist ein vollständig humaner Antikörper vom Typ IgG1, der gegen das membranständige und lösliche TNF- α gerichtet ist. Sowohl die konstanten als auch die variablen Regionen bestehen aus humanem IgG1. Es ist unter anderem

(u.a.) in Kombination mit Methotrexat (MTX), bei Unverträglichkeit gegenüber MTX auch als Monotherapie zur Behandlung der RA zugelassen. Weitere Zulassungen gibt es für die PsA bei Erwachsenen und bei nicht erfolgreicher Standardtherapie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) bei Patient*innen mit aktiver AS. Das Medikament wird alle 14 Tage in einer Dosis von 40 Milligramm (mg) subkutan (s.c.) verabreicht ¹⁸.

Infliximab (z.B. Originalpräparat Remicade ®, MSD) ist ein chimärer mAk gegen das lösliche und membranständige TNF- α . Zugelassen ist Infliximab u.a. in Kombination mit MTX zur Behandlung einer aktiven RA, wenn diese auf konventionelle Disease Modifying Anti Rheumatic Drugs (cDMARD) nicht ausreichend angesprochen hat, und in Monotherapie zur Behandlung der AS sowie der PsA. Die Applikationsform ist intravenös (i.v.). Die standardmäßige Dosierung beträgt bei der RA 3 mg/kg Körpergewicht (KG) als Erstinfusion sowie nach 2 und 6 Wochen, danach wird das Medikament alle 8 Wochen infundiert. Die Dosierung bei Patient*innen mit AS beträgt 5 mg/kg KG zu den Zeitpunkten (ZP) 0, 2 und 6 Wochen, danach alle 6-8 Wochen. Das Dosierungsschema für die PsA ist 5 mg/kg KG als initiale Infusion, gefolgt von weiteren Infusionen mit der gleichen Dosierung nach 2 und 6 Wochen, danach alle 8 Wochen ²⁶.

Weitere TNF- α -Inhibitoren sind Golimumab und Certolizumab als monoklonale Antikörper und Etanercept als Fusionsprotein. Diese werden im Folgenden kurz vorgestellt. In Abbildung 1 sind die verschiedenen Molekülstrukturen der TNF- α -Inhibitoren und deren immunogen wirkenden Sequenzen dargestellt.

Golimumab (Simponi ®, MSD) ist ähnlich wie Adalimumab ein vollständig humaner IgG1. Er bindet sowohl an das lösliche als auch an das membrangebundene TNF- α . Die konstanten Regionen der schweren und leichten Kette sind identisch mit den korrespondierenden humanen Regionen des Infliximabs, haben aber vollständig humane Sequenzen. Es ist u.a. für RA, PsA und AS zugelassen ²⁷.

Certolizumab Pegol (Cimzia ®, UCB) besteht aus dem Fab-Fragment eines humanisierten TNF- α Antikörpers, der an Polyethylenglycol (PEG) konjugiert wurde. Durch diese PEGylierung wird das Fragment stabilisiert und erhält eine längere Halbwertszeit (HWZ). Es ist u.a. als Kombinationstherapie mit MTX und in Monotherapie für die Therapie der RA und PsA sowie als Monotherapie für die Behandlung der AS zugelassen ²⁸.

Etanercept (z.B. Originalpräparat Enbrel®, Pfizer) ist der einzige lösliche TNF-Rezeptor. Dieses vollständig humane Fusionsprotein besteht aus einem Fc-Fragment des humanen IgG1, das mit zwei extrazellulären Domänen des humanen TNFR2/p75 Rezeptor fusioniert ist. Dieses dimere Fusionsprotein bindet und neutralisiert das membrangebundene und lösliche TNF sowie Lymphotoxin²⁹.

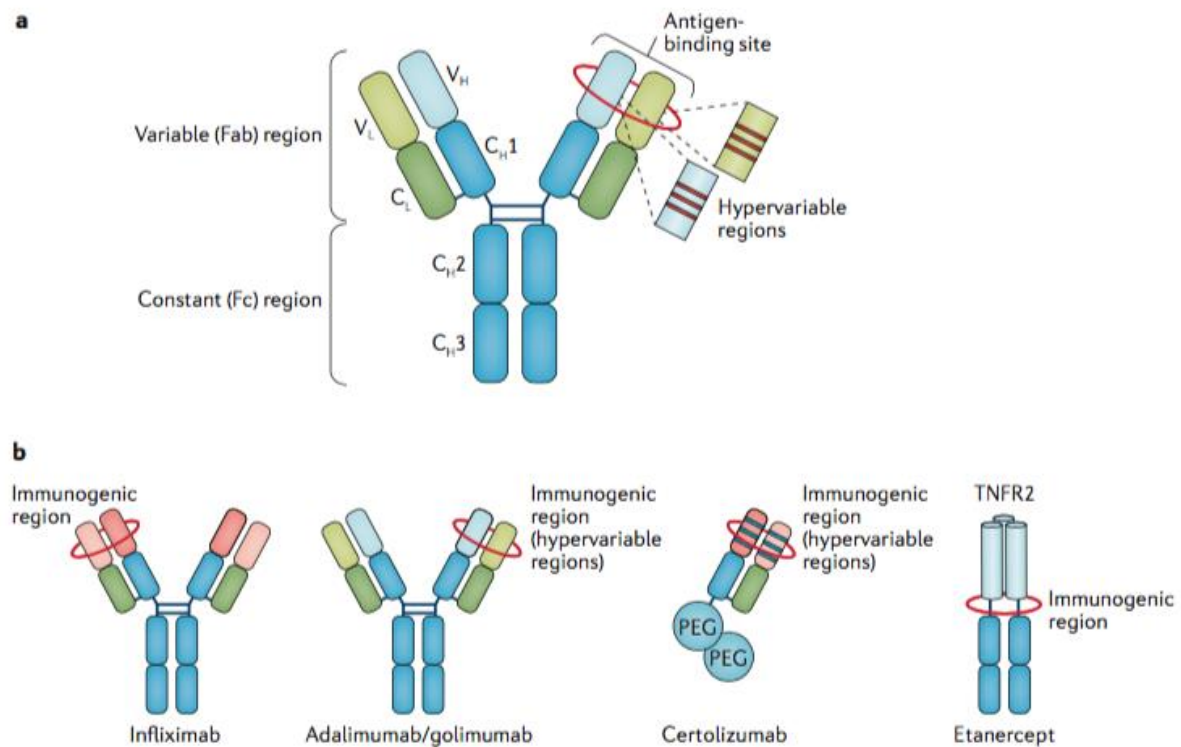


Abbildung 1: Molekülstruktur der TNF- α -Inhibitoren.

Übernommen aus Kalden et al. 2017¹. a) Schematische Darstellung eines Antikörpers. Die Fc-Region ist für die Funktion des Antikörpers verantwortlich und die Fab-Region ist die Antigenbindungsregion. Innerhalb der variablen Region gibt es kleine hypervariablen Regionen, die die Spezifität zum Antigen bestimmen. b) Dargestellt sind die Molekülstrukturen der TNF-Blocker. Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper mit einer murinen variablen Region (hier in Rot gezeigt), der mit einem humanen IgG verbunden ist. Adalimumab und Golimumab sind vollständig humane Antikörper. Certolizumab besteht aus dem Fab-Fragment eines humanisierten TNF- α Antikörpers, der an Polyethylenglycol (PEG) konjugiert wurde. Etanercept ist ein TNF-Rezeptor Fusionsprotein. Potentielle immunogene Regionen innerhalb jedes Antikörpers sind in Rot umkreist. Abkürzungen: C_H constant heavy (konstanter Teil der schwere Kette), C_L constant light (konstanter Teil der leichten Kette), TNFR2 TNF-Rezeptor, V_H variable heavy (variabler Teil der schwere Kette), V_L (variabler Teil der schwere Kette)

Kontraindikationen für die Therapie mit einem TNF- α -Inhibitor sind u.a. eine aktive Infektion (z.B. Tuberkulose, Hepatitis B), Herzinsuffizienz (> NYHA II) oder eine Tumorerkrankung. Besonders wichtig ist das erhöhte Infektionsrisiko, weshalb u.a. präventive Maßnahmen wie Screening auf eine latente Tuberkulose mittels Röntgen-Thorax und einem Interferon-Gamma-release-Assay stattfinden müssen³⁰.

Das Risiko, an schweren Infektionen zu erkranken, ist bei der Biologika-Therapie gegenüber der Standardtherapie signifikant erhöht³¹. Diese treten vor allem zu Behandlungsbeginn innerhalb der ersten 6 Monate auf³².

Ziel der modernen Therapie entzündlich-rheumatischer Erkrankungen ist die Remissionsinduktion und deren Erhalt. Unter TNF- α -Inhibitoren werden die radiologische Progression und die Krankheitsaktivität deutlich reduziert und die Lebensqualität verbessert³³.

4.4 Exkurs in die Klinik und Pathogenese rheumatischer Gelenkerkrankungen

4.4.1 Rheumatoide Arthritis

Die RA ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, die in ihrer klassischen Ausprägung das klinische Bild einer symmetrischen peripheren Polyarthrititis zeigt. Die Ursache ist unbekannt. Die systemische Krankheitsaktivität kann auch zu extraartikulären Manifestationen wie Abgeschlagenheit, subkutanen Rheumaknoten, Lungenbeteiligung, Perikarditis, peripherer Neuropathie, Vaskulitis und Blutbildveränderungen führen^{34,35}. Mit einer Prävalenz von ca. 0,5 bis 1% der erwachsenen Bevölkerung in Europa ist sie die häufigste chronisch-entzündliche Arthritis. Weibliche Personen sind ca. 2-3 mal häufiger betroffen als männliche³⁴.

Die Erkrankung beginnt oft schleichend an den proximalen Gelenken der Finger und Füße und hat einen schubförmigen Verlauf³⁶. Meist ist der Befall beidseitig und symmetrisch. Unbehandelt kann die Erkrankung zu Erosionen der Gelenkflächen sowie Knochen- und Knorpelabbau führen, die im schlimmsten Fall Kontrakturen und Deformitäten wie z.B. der Schwanenhals- oder Knopflochdeformität zur Folge haben³⁷. In diesem Stadium lässt sich ein ausgeprägter Funktionsverlust meist nicht mehr vermeiden³⁵. Eine frühe Diagnosestellung und leitliniengerechte Behandlung kann diese Gelenkzerstörung heutzutage verhindern^{34,38,39}.

4.4.2 Spondyloarthritiden

Die AS und die PsA gehören beide zu den Spondyloarthritiden (SpA). Diese bezeichnen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch ein Überschneiden von klinischen

Merkmale und eine Assoziation mit dem Human Leucozyte Antigen (HLA)-B27 Allel gekennzeichnet sind.

Die AS ist eine entzündliche Erkrankung unbekannter Ursache und befällt primär das Achsenskelett, wobei die peripheren Gelenke und extraartikulären Strukturen ebenfalls betroffen sein können. Das Manifestationsalter liegt in der zweiten oder dritten Lebensdekade für beide Geschlechter in den westlichen Ländern, wobei Männer ca. zweimal so häufig betroffen sind wie Frauen. Weltweit sind zwischen 0,1 und 1,4% der Menschen von der Erkrankung betroffen. In Deutschland sind es geschätzt zwischen 0,3 und 0,5%^{40,41}. Die Erkrankung zeigt eine hohe Assoziation mit dem HLA-B27 Gen und tritt in etwa proportional zur HLA-B27 Prävalenz auf⁴¹.

Die ersten wahrgenommenen Symptome präsentieren sich oft in der späten Adoleszenz. Das Leitsymptom ist der inflammatorische Rückenschmerz, der sich als dumpfer Rückenschmerz der unteren Lendenwirbelsäule (LWS) oder Gesäßregion mit begleitender Morgensteifigkeit, die bis zu mehreren Stunden andauert, zeigt. Die Schmerzen werden klassischerweise durch Bewegung gemildert und setzen in Ruhe erneut ein. Deshalb klagen die Patient*innen häufig über eine gestörte Nachtruhe, da sie vor allem in der zweiten Nachthälfte schmerzbedingt aufstehen und sich bewegen müssen⁴²⁻⁴⁴. Bei der körperlichen Untersuchung dominieren zunehmende Bewegungseinschränkungen der Wirbelsäule und des Thorax. Der Krankheitsverlauf variiert zwischen unauffälligen Röntgenbefunden und geringer Morgensteifigkeit bis hin zu schwerwiegenden Verläufen, die bis zu einer komplett ankyloierten Wirbelsäule (Bambusstabwirbelsäule), begleitet von einer schweren beidseitigen Hüftgelenksentzündung und extraartikulären Manifestationen, reichen können⁴⁵.

Die PsA zählt auch zu den entzündlich-rheumatischen Erkrankungen und wird der Gruppe der SpA zugeordnet. Sie hat eine HLA-B27 Assoziation und ist eine Erkrankung des mittleren Lebensalters. Klassischerweise tritt die Erkrankung, die autoimmune und autoinflammatorische Eigenschaften besitzt, bei Patient*innen mit einer Psoriasis auf. Bei diesen Patient*innen beträgt die Prävalenz ca. 6-39%. Die Prävalenz der Psoriasis beträgt in der hellhäutigen Bevölkerung ca. 1-3%. Die Geschlechterverteilung ist bei Frauen leicht erhöht (je nach Studie 1.13-1.4)^{46,47,48}.

In der Klinik präsentiert sich die Arthritis häufig nach einer vorausgegangenen Psoriasis der Haut. Die prozentualen Angaben unterscheiden sich in der Literatur von 6-85%⁴⁶⁻⁴⁸. Selten ist auch ein umgekehrter Befall zuerst der Gelenke und dann der Haut möglich⁴⁹. Typische klinische Zeichen und Symptome sind Schmerzen und eine synoviale Schwellung der distalen Finger- und/oder Zehengelenke oder aller Gelenke eines Fingers/Zehs. Der Gelenkbefall manifestiert sich am häufigsten in einer asymmetrischen Oligoarthritis (ca. 70%), gefolgt von einer symmetrischen Polyarthritis (ca. 20%). In 5- 40% der Fälle kann es zu einer axialen Beteiligung kommen. Es werden ebenfalls Enthesitis und Tenosynovitis beobachtet. Die Arthritis mutilans ist eine stark destruierende Erkrankungsform⁴⁸.

4.4.3 Therapie der chronisch-entzündlichen Erkrankungen

Therapiert werden diese Erkrankungen symptomatisch durch den Einsatz von NSAR, sowie von Glucocorticoiden und physikalischer Therapie. Bei der RA wird zügig eine Basistherapie mit cDMARDs eingeleitet, die bei der Therapie der axialen SpA keine Rolle spielt. cDMARD können im Gegensatz zu NSAR das Fortschreiten der Entzündungsaktivität und der Gelenkdestruktion verhindern. Die Einführung dieser Medikamente 1986 (Zulassung MTX) waren ein Meilenstein in der Therapie der RA. Das am häufigsten eingesetzte cDMARD ist MTX, weitere Alternativen sind Sulfasalazin und Leflunomid⁵⁰. MTX kann sowohl oral als auch subkutan verabreicht werden. Anwendungslimitationen bestehen vor allem in Unverträglichkeiten, aber auch in Wirklosigkeit⁵¹. Biologika wie die TNF- α -Blocker kommen nach Wirkversagen oder Unverträglichkeit der genannten Maßnahmen zum Einsatz³⁹.

4.5 Immunogenität und TNF- α -Inhibitor-Therapie

Immunogenität ist die Fähigkeit eines biotechnologisch hergestellten Proteins, eine Immunantwort auszulösen. Sie wird oft durch die Unterschiede der exakten körpereigenen Proteinstruktur und der dreidimensionalen Proteinstruktur des biopharmazeutisch hergestellten Proteins hervorgerufen. Das adaptive Immunsystem erkennt die Struktur als körperfremd und reagiert durch eine Immunantwort mit Antikörperbildung, die zu direkter Neutralisierung des Proteins, einer Komplementaktivierung oder auch einer veränderten Clearance führen kann^{3,7,52}.

Verschiedene Faktoren begünstigen Immunogenität (siehe Abbildung 2) und werden im Verlauf der Arbeit beschrieben.

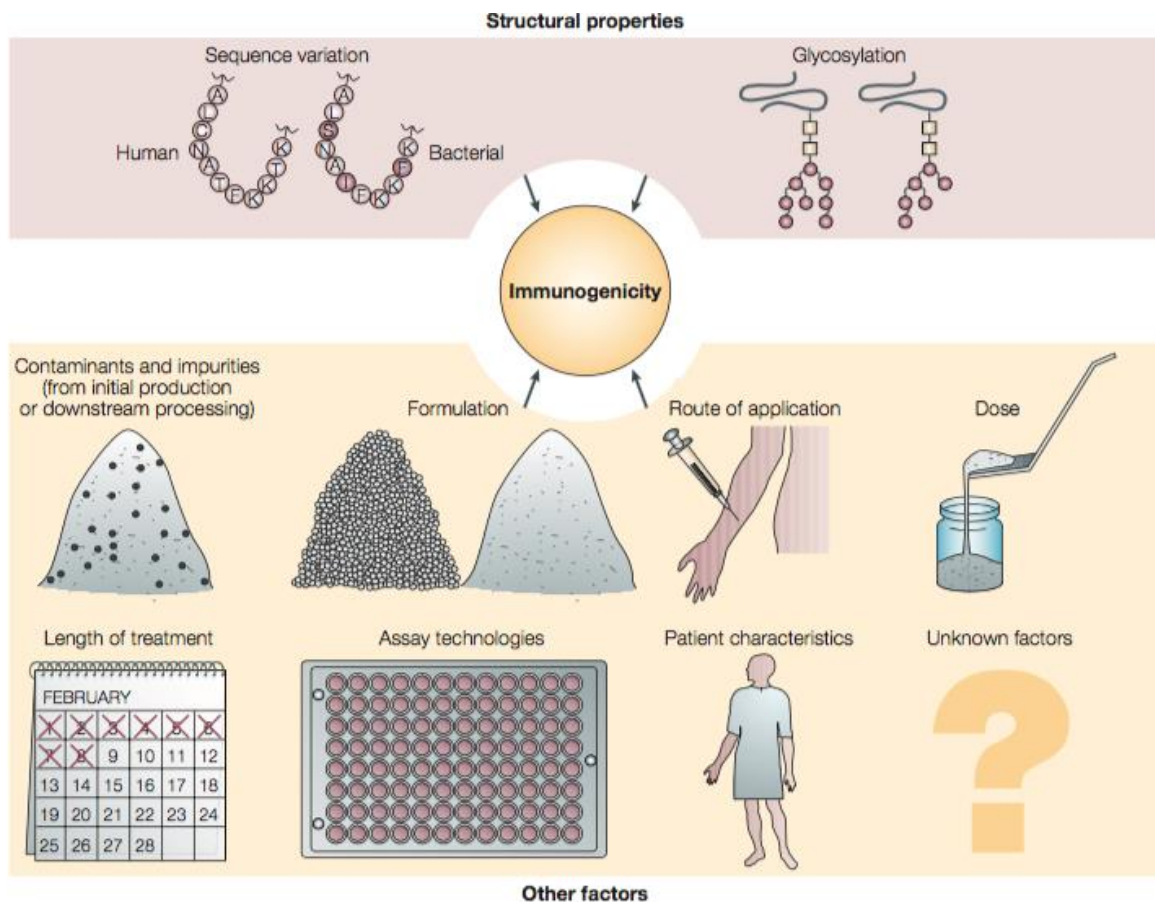


Abbildung 2: Immunogenität von Biopharmazeutika.

Dargestellt sind die häufigsten Faktoren, die die Immunogenität von Biopharmazeutika beeinflussen. Übernommen aus Schellekens, H. 2012 ⁷

4.5.1 Bildung von Anti-TNF- α -Antikörpern

In der Therapie mit TNF- α -Inhibitoren wird wiederholt über deren Immunogenität berichtet ^{5,53-66}. Diese hat Auswirkungen auf die Sicherheit und die Pharmakokinetik der Arzneimittel und damit auch auf deren Gebrauch und Wirksamkeit ^{4,67}. Ein Grund dafür ist die Bildung von ADA. Diese sind vom Immunsystem gebildete Antikörper gegen die therapeutischen, körperfremden mAKs wie Adalimumab und Infliximab ⁶⁷. Alle Antikörperformationen, die aus einem humanen IgG-Fc und/oder kappa Leichtketten bestehen, können anti-Allotyp-ADA provozieren. IgG-Allotypen zeichnen sich durch geringfügige Unterschiede in ihrer primären Aminosäuresequenz zwischen Molekülen einer IgG-Subklasse aus. Diese Epitope sind polymorph und werden nach den Mendel'schen Regeln vererbt. Die Ausprägung der Allele ist zwischen den Individuen

unterschiedlich. Im Falle einer Abweichung von patient*innen eigenem IgG-Allotyp und mAk-Allotyp kann es nach Verabreichung im Rahmen einer Immunreaktion zu Antikörperbildung gegen den mAk kommen. Da TNF- α -Antikörper nicht zum natürlichen Antikörperrepertoire des Menschen gehören, können Anti-Idiotyp-ADA theoretisch bei allen humanen Antikörperformationen, die an TNF- α mit ihrem Fab-Teil binden, entstehen ⁶⁸.

4.5.2 Die Auswirkungen von Anti-Drug-Antikörpern auf die Medikamentenwirksamkeit

ADA können signifikant die Medikamentenkonzentration im Serum reduzieren und mit einem geringeren Therapieansprechen einhergehen ^{3,66}. Es gibt neutralisierende und nicht-neutralisierende Antikörper, welche unterschiedlich mit dem ADA interagieren. Neutralisierende ADA binden an den Fab-Teil des TNF- α -Inhibitors, blockieren damit die TNF- α Bindungsstelle und führen so zu einer Neutralisation der Therapieantikörper und folglich zu einer Wirkstoffreduktion ⁶⁹. Nicht-neutralisierende Antikörper binden an Teile des ADA fernab der TNF- α Bindungsstelle und beeinflussen somit nicht die Pharmakodynamik des TNF- α -Inhibitors ⁷⁰. Sie haben einen indirekten therapeutischen Effekt, indem sie die Bioverfügbarkeit des TNF- α -Inhibitors verringern, oder deren Abbau beschleunigen ^{71,72}. Van Schouwenburg *et al.* 2013 zeigten, dass mindestens 98% der gefundenen Adalimumab-ADA in der Lage sind, ihren Wirkstoff zu neutralisieren ^{73,74}. Die Bindung von sowohl neutralisierenden als auch nicht-neutralisierenden Antikörpern an ihren Wirkstoff kann ebenfalls die Bildung von Immunkomplexen hervorrufen ^{52,70,72}. Van der Laken *et al.* 2007 beschrieben das Auftreten von Infliximab-anti-Infliximab Komplexen, die einen Erklärungsversuch darstellen, die fehlende Wirksamkeit von TNF- α -Inhibitoren zu verstehen. Infliximab Patient*innen ohne Therapieansprechen zeigten einen schnelleren Abbau des Therapieantikörpers durch höhere Abbauraten in Leber und Milz, als Patient*innen mit Therapieansprechen. Die Immunkomplexe des (einen) Patienten ohne Therapieansprechen waren im Gegensatz zu den Patient*innen mit Therapieansprechen größer ⁵². In einer weiteren Studie stellte sich heraus, dass große Immunkomplexe schneller abgebaut wurden als kleinere. Es wird angenommen, dass vor allem große Immunkomplexe zu einem Wirkverlust der Therapieantikörper führen. Kleinere Komplexe induzieren eine geringere Aktivierung des Immunsystems, obwohl sie oft lange im Körper persistieren und nur langsam abgebaut werden ⁷². Jedoch kann die

Persistenz kleiner Immunkomplexe das Risiko von Typ-III allergischen Reaktionen wie bei der Serumkrankheit erhöhen⁷³. Das Auftreten thromboembolischer Ereignisse bei Patient*innen mit ADA wurde bereits beschrieben⁷⁵.

4.5.3 Mit Immunogenität assoziierte Faktoren

Wie in Abbildung 2 gezeigt, wird die Immunogenität von Biopharmazeutika von verschiedenen internen und externen Faktoren beeinflusst. Diese können mit den Patient*innencharakteristika (siehe 4.5.3.1), dem Pharmakon (siehe 4.5.3.3), der Therapie (siehe 4.5.3.2) oder dem Assay (siehe 4.6) assoziiert sein. Die einzelnen Faktoren werden im Folgenden genauer erläutert.

4.5.3.1 Individuelle Faktoren

Mehrere Beobachtungen in Studien lassen darauf schließen, dass individuelle Faktoren dazu beitragen, gegen Therapieantikörper eine Immunantwort zu entwickeln. Unter anderem wurde gezeigt, dass Patient*innen, die bereits Antikörper gegen einen TNF- α -Inhibitor entwickelt hatten, einem höheren Risiko der erneuten Antikörperentwicklung gegen einen anderen TNF- α -Inhibitor nach Therapieumstellung unterlagen⁶³. Weitere Arbeitsgemeinschaften gehen davon aus, dass die Aktivität des Immunsystems einen Einfluss auf die ADA-Entwicklung hat. Es ist derzeit noch nicht ausreichend geklärt, ob genetische Faktoren die ADA-Produktion beeinflussen. Polymorphismen in der Promotorregion des Gens, das für IL-10 kodiert, soll mit der Bildung von ADA assoziiert sein⁷⁶. Eine Assoziation zwischen IL-10 und TNF- α -Genotypen und dem Auftreten von Antikörpern gegen Faktor VIII bei Hämophilie-Patient*innen wurde bereits beschrieben⁷⁷.

4.5.3.2 Therapieassoziierte Faktoren

Das Behandlungskonzept mit TNF- α -Inhibitoren hat ebenfalls einen Einfluss auf deren immunogene Wirkung. Begleittherapien mit Immunsuppressiva und Variationen in Dosis und Intervall haben signifikante Auswirkungen auf die Bildung von ADA. Der gleichzeitige Einsatz von immunsupprimierenden Substanzen wie MTX, Azathioprin oder 6-Mercaptopurin kombiniert mit TNF- α -Inhibitoren geht mit einer Häufigkeitsreduktion der ADA-Bildung einher⁷⁸. Der vorbeugende Effekt von MTX in Kombination mit Infliximab wurde für RA, PsA und AS beschrieben^{78,79}. Bei begleitender MTX-Therapie konnte das

Auftreten von ADA unter Adalimumab im Vergleich zur Monotherapie bei RA-Patient*innen von 38% auf 12% reduziert werden ⁶⁶. Die Metaanalyse von Garcês *et al.* 2013 beschreibt, dass die begleitende Therapie mit MTX den Anteil der Patient*innen mit nachweisbaren ADA gegen Adalimumab oder Infliximab um 41% reduzierte. Die Zahlen variierten jedoch auch zwischen den nachweisenden Assays: Mit einem Radioimmunoassay (RIA) gemessen, reduzierte die Kombinationstherapie mit MTX das ADA-Auftreten um 64%, mit einem Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay (ELISA) waren es nur 37 % ⁵⁴. Es wird davon ausgegangen, dass MTX die frühe T- und B-Zell Expansion supprimiert und so die Immunantwort moduliert ⁷⁹.

Bei AS-Patient*innen hat der Einsatz von MTX nur einen geringen Einfluss auf deren Immunogenität. Bei der AS wird Infliximab häufiger und in höheren Dosen als bei der RA verabreicht, weshalb angenommen wird, dass es durch Medikamenteninterferenz häufiger zu falsch negativen Ergebnissen kommen kann ⁵⁴.

Dosis und Therapieintervall können auf die Immunogenität der Therapieantikörper ebenfalls einen Einfluss haben. Niedrige Dosen von TNF- α -Inhibitoren können eine verstärkte ADA-Bildung provozieren, wohingegen höhere Dosen dieser protektiv entgegenwirken. Hohe Konzentrationen gehen mit einem verminderten Auftreten von ADA einher ^{66,80}. Eine Erklärung wird in der immunsupprimierenden Wirkung der TNF- α -Inhibitoren gesehen. Unklar bleibt, ob die niedrigen Konzentrationen auch durch die Präsenz der ADA bedingt ist, da diese neutralisierend wirken können ². Aufgrund dieser Beobachtungen diskutieren Vincent *et al.* 2013 in ihrem Review die Möglichkeit, ob eine Dosisreduktion der Therapeutika oder eine Intervallverlängerung bei Patient*innen, deren Krankheitsaktivität sich klinisch in Remission befindet, zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit der ADA Bildung und so zu einem sekundären Wirkverlust führen könnte ². Unterstützend zu der Hypothese wird angeführt, dass eine kontinuierliche Therapie der AS bessere klinische Ergebnisse erzielte als episodische Verabreichungen von Infliximab. Weiter wurde angenommen, dass das Risiko einer Immunantwort bei zunehmender Therapiedauer ansteigt ⁸¹.

4.5.3.3 Pharmakonassoziierte Faktoren

Pharmakon assoziierte Faktoren können ebenfalls die Immunogenität von Biologika beeinflussen. Diese Tatsache ist bereits seit 1988 bekannt, nachdem rekombinantes Erythropoetin (EPO) in Frankreich zur Therapie von chronisch renaler Anämie bei

Dialyse-Patient*innen zum ersten Mal zugelassen wurde. Der Unterschied in den Aminosäuresequenzen zwischen den therapeutischen und den endogenen Proteinen ist dafür ursächlich. Nach initialem Ansprechen auf EPO durch einen Hämoglobinanstieg zeigte sich bei einigen Patient*innen eine Verschlechterung der Anämie, die in Zusammenhang mit der Verabreichung gesehen wurde. Bei allen Patient*innen fanden sich neutralisierende Antikörper gegen das EPO-Protein. Nach einer Therapieunterbrechung mit EPO ließ sich ein langsamer Rückgang der Anti-EPO-Antikörper beobachten⁸². Diese Beobachtungen waren unter den Ersten, die auf eine immunogene Wirkung rekombinant hergestellter Proteine schließen ließ.

Weiter zeigte sich, dass der Austausch muriner Anteile durch humanisierte oder vollständig humane Anteile eine signifikante Reduktion des immunogenen Potentials der mAk bewirkt. Die Immunogenität muriner Antikörper ist demnach am höchsten anzusehen, gefolgt von chimären und an letzter Stelle humanen Antikörpern. Diese können trotz der vollständig humanen Antikörperteile ebenfalls immunogen wirken⁸³. Antikörper gegen Etanercept werden nur sehr selten beschrieben und haben keine klinische Relevanz. Eine mögliche Erklärung liegt in der Reduktion von fremden T-Zell Epitopen, die bei diesen Fc-Fusions-Proteinen nur im Verbindungsteil (bestehend aus der Fc-Untereinheit des IgG1) der beiden extrazellulären Ligandenbindungsdomänen des humanen TNF-Rezeptor 2 enthalten sein können und demnach weniger antigene Epitope bilden als bei anderen TNF- α -Inhibitoren^{84,85}.

T-Zell Epitope haben ebenfalls einen Einfluss auf die Immunantwort gegen TNF- α -Inhibitoren. Adalimumab trägt den Allotyp des IgG G1m17. Bartelds *et al.* 2010 beschrieben, dass Patient*innen, die denselben IgG-Allotyp tragen, der auf dem Adalimumab IgG-Molekül vorhanden ist, die höchste Frequenz an Adalimumab-ADA verglichen zu Patient*innen mit andere Allotypen aufwiesen⁸⁶. Interessanterweise kamen Stickler *et al.* 2011 zum gegenteiligen Ergebnis. Demnach traten bei Patient*innen mit dem IgG1m17 Allotyp die wenigsten Antikörper auf⁸⁷.

4.6 Nachweisverfahren für Immunogenität von TNF- α -Inhibitoren und deren Besonderheiten

Die ADA-Prävalenz zwischen den Studien variiert bei Untersuchungen gleicher TNF- α -Inhibitoren. Diese Unterschiede erklären sich unter anderem durch die Verwendung

unterschiedlicher Assays. Außerdem variieren die Cut-off-Werte bei den Herstellern. Diese Umstände erschweren eine Vergleichbarkeit der Studien ⁸⁸.

Eine weitere Erklärung für Unterschiede zwischen den Studien kann der Zeitpunkt der ADA-Bestimmung sein, da die letzte Gabe des Therapieantikörpers die Konzentration des Serumspiegels und die Assay-Sensitivität beeinflussen kann.

Zum Nachweis von ADA werden derzeit verschiedene Nachweismethoden verwendet, die alle Vor- und Nachteile mit sich bringen. Die am häufigsten verwendeten sind Sandwich-ELISA, RIAs oder Antigen-Bindingstests (ABT) ⁸⁸. Problematisch bei Sandwich- und Bridging-ELISA ist, dass während der Bindungsphase der ADA der koexistierende Therapieantikörper die Bindungsstellen der ADAs belegt. Deshalb können die ADAs nicht den an die Mikrotiterplatte gebundenen Therapieantikörper binden. Während der Detektionsphase behindert der vorhandene Therapieantikörper die Bindung des Detektionsmoleküls (markierter Therapieantikörper) an die ADA ^{89,90}. Auch beim ABT bindet der radioaktiv markierte Therapieantikörper an die freien ADA im Serum. Deshalb ist ein ADA-Nachweis in Assays, die für Medikamenteninterferenzen anfällig sind, nur möglich, wenn die ADA-Konzentration die Medikamentenkonzentration übersteigt. Verschiedene Assay Typen sind unterschiedlich stark anfällig für diese Medikamenteninterferenzen. Da viele Patient*innen in kontinuierlicher Behandlung mit einem TNF- α -Inhibitor sind, führt die Medikamenteninterferenz häufig zu falsch negativen Ergebnissen. ^{90,91}.

Neuere Assays können sowohl freie als auch gebundene ADA in Anwesenheit des jeweiligen Therapieantikörpers messen und so eine ADA-Bestimmung unabhängig von der Medikamentenkonzentration ermöglichen. Beispiele dafür sind pH-shift, anti-idiotypen-antigen-binding-test und das in der vorliegenden Arbeit verwendete semi-fluid phase enzyme immunoassay (SFPE) ^{65,88,92}.

4.7 Konsequenzen von Anti-Drug-Antikörper-Bildung in der Klinik

Die Feststellung von Wirkverlust bei TNF- α -Inhibitoren erfolgt bisher meist klinisch, gegebenenfalls unter Zuhilfenahme radiologischer Verfahren. ⁹³⁻⁹⁵. Im Fall eines Wirkverlustes kann ein Wechsel von einem TNF- α -Inhibitor zu einem anderen mit einer Verbesserung der Wirksamkeit verbunden sein. Allgemein sprechen Biologika-naive RA Patient*innen besser auf die Therapie an als Patient*innen nach Biologikaversagen ^{61,96}. Differenziert betrachtet zeigen Patient*innen, die die initiale Therapie mit dem ersten

TNF- α -Inhibitor aufgrund von UAW und nicht von fehlendem Therapieansprechen abgebrochen haben, ein besseres klinisches Ansprechen auf das zweite Biologikum ⁹⁷. Analog dazu wurde bei Patient*innen, die zuvor ein schlechtes Therapieansprechen auf den ersten TNF- α -Inhibitor zeigten, auch ein geringeres Ansprechen auf den zweiten TNF- α -Inhibitor beobachtet ⁹⁸.

Jamnitski *et al.* 2010 beschrieben, dass RA Patient*innen, die anti-TNF-naiv waren, und Patient*innen, die zuvor einen TNF- α -Inhibitor (Infliximab oder Adalimumab) erhielten und ADA positiv waren, klinisch ähnlich gut auf Etanercept ansprachen, wohingegen Therapierte ohne ADA gegen Infliximab oder Adalimumab ein geringeres Ansprechen auf Etanercept zeigten ⁶¹. ADA-negative Infliximab Patient*innen ohne Ansprechen hatten das schlechteste Ansprechen bei anschließender Adalimumab-Behandlung ⁹⁶. Vincent *et al.* 2010 ² schlussfolgerten deshalb, dass ein TNF- α -Inhibitor-Wirkverlust in Abwesenheit von ADAs ein zielbedingter (also TNF- α -assoziiertes) Wirkverlust sei und diese Patient*innen deshalb besser von einem Medikament mit einem anderen Wirkmechanismus profitieren würden. ADA-positive Patient*innen würden hingegen einen pharmakonbedingten Wirkverlust erfahren und demnach von einem anderen TNF-Inhibitor profitieren ². Im ersten Fall war TNF- α nicht das hauptsächlich für die Krankheitsaktivität verantwortliche Molekül ⁹⁹. Die Neigung zur ADA-Produktion kann auch nach dem Wechsel beim zweiten Biologikum andauern. So produzierten Patient*innen die mit Infliximab behandelt wurden und Anti-Infliximab-Antikörper entwickelt haben nach einem Wechsel zu Adalimumab häufiger Adalimumab-ADA als TNF- α -Inhibitor-naive Patient*innen ⁹⁶.

5 Hypothese und Zielsetzung der Arbeit

Problemhintergrund:

Obwohl das Problem der ADA-Bildung in der Betreuung von Patient*innen mit entzündlich - rheumatischen Erkrankungen unter Biologikatherapie von hoher praktischer Bedeutung ist, existieren gegenwärtig für keines der zugelassenen Biologika in der Rheumatologie ausreichend standardisierte und evaluierte Nachweismethoden. Zum derzeitigen Zeitpunkt werden viele zugelassene Biologika inklusive Adalimumab und Infliximab in Form von Standarddosierungen meist ohne Berücksichtigung für die Immunogenität relevanter Faktoren eingesetzt. Eine Testung auf ADA und korrespondierenden Serumspiegel des TNF- α -Inhibitors erfolgt nur in Ausnahmesituationen und dann auch nur unter Nutzung nicht ausreichend evaluierter Verfahren. Durch das Fehlen von belastbaren Studiendaten ist es unklar, ob die Testung auf ADA und korrespondierenden Medikamenten-Serumspiegel in der klinischen Praxis zu verbesserten therapeutischen Entscheidungen führen würde, wodurch nicht mehr effektive und ggf. nebenwirkungsreiche Behandlungsansätze frühzeitig erkannt und dementsprechend angepasst werden könnten.

Dies trifft für die Krankheitsbilder der RA, PsA und AS zu, die deshalb im Rahmen dieser Studie im Fokus standen.

Zielsetzung:

Durch diese Arbeit sollten zwei neue und verschiedene Testverfahren zum Nachweis von ADA gegen die am häufigsten genutzten TNF- α -Inhibitoren (Adalimumab und Infliximab) und die korrespondierenden Medikamenten-Serumspiegel im klinischen Alltag evaluiert werden. Dazu gehört ebenfalls die Klärung der Praktikabilität eines therapeutischen Drugmonitorings (TDM) sowie das Erfassen von assoziierten Nebenwirkungen und Therapieversagen. Es sollte eine Einschätzung darüber gegeben werden, welche Effekte das Auftreten von ADA auf den Medikamentenspiegel und den Verlauf von entzündlich-rheumatischen Erkrankungen im Rahmen der Verlaufsuntersuchungen hat. Weiter sollte die Prävalenz und Bedeutung von ADA bei den unterschiedlich untersuchten Krankheitsbildern RA, AS und PsA erfasst und verglichen werden.

Auf Basis von **Grundannahmen** wurden folgende *Arbeitshypothesen* gestellt und sollten im Zuge der Arbeit untersucht werden:

1. Grundannahme: ADA interagieren mit den korrespondierenden Therapieantikörpern, können deren Konzentrationsabfall bewirken und somit den klinischen Verlauf beeinflussen.

Daraus folgende Arbeitshypothese:

Das Auftreten von ADA ist mit erniedrigten Medikamentenspiegeln, einer Erhöhung der Krankheitsaktivität, bis hin zum Wirkverlust des Medikamentes und Nebenwirkungen assoziiert.

2. Grundannahme: Adalimumab als humanisierter und Infliximab als chimärer monoklonaler Antikörper haben aufgrund ihrer Sequenz unterschiedliche antigene Eigenschaften, die ihre immunogene Wirkung beeinflussen. Deshalb können Unterschiede in der Prävalenz der ADA zwischen den beiden TNF- α -Inhibitoren erwartet werden.

Daraus folgende Arbeitshypothese:

Unter Adalimumab-Therapie treten weniger ADA auf als unter Infliximab- Therapie.

3. Grundannahme: Aufgrund der unterschiedlichen Pathogenese, Patientencharakteristik, und Kombinationstherapie unterscheiden sich die Prävalenz und Bedeutung der ADA bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern.

Daraus folgende Arbeitshypothese:

Bei der RA treten häufiger ADA auf als bei der AS und der PsA. Bei den SpA (axiale und periphere Form) kann eine niedrigere Prävalenz an ADA beobachtet werden.

4. Grundannahme: Aufgrund der fehlenden Standardisierung der Nachweisverfahren von ADA und korrespondierendem Serumspiegeln der Therapieantikörper können sich die Messergebnisse der verschiedenen Assays unterscheiden.

Daraus folgende Arbeitshypothese:

Die Messergebnisse verschiedener Assays für die Serumspiegel des gleichen Biologikums sowie für gesamt und freie ADA weisen eine hohe Varianz auf.

6 Materialien und Methoden

6.1 Rekrutierung und Auswahl der Patient*innen

Die Infliximab- und Adalimumab- behandelten Patient*innen wurden über die ambulante Sprechstunde der Rheumatologie, Charité Campus Mitte und Benjamin-Franklin, Berlin, Deutschland rekrutiert. Es wurde jeweils vor der regelmäßigen Infliximab-Infusion bzw. bei ambulanter Vorstellung unter laufender Adalimumabtherapie eine Serumprobe abgenommen. Zusätzlich wurde von den Patient*innen übliche klinische Befunde und Aktivitätsscores wie Disease Activity Score 28 (DAS-28) und Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) Score erhoben. Der Messzeitraum umfasste im Mittel 1,5 Jahre. Zwischen den meisten Konsultations- ZP lag ein Zeitraum von ca. 3-6 Monaten. Alle Serumproben wurden mit dem Vacutainer®-System abgenommen (1 Röhrchen beinhaltet ca. 5 Milliliter (ml) Blut). Aus den Blutproben wurde das Serum isoliert, aliquotiert, pseudonymisiert und bis zur späteren Bearbeitung bei -20°C gelagert.

Die Studie wurde im Rahmen des Projektes „Entwicklung und Evaluierung von Immunoassays zum Nachweis von ADA für das Monitoring einer TNF- α Blocker Therapie bei Patienten mit entzündlich-rheumatischen Erkrankungen“ durchgeführt und von der Ethikkommission der Charité genehmigt (Ethikvotum EA1/050/15). Weiter wurden Patient*innen, die unter den Ethikvota „Biomarkers and imaging for diagnosis, monitoring, and stratification of rheumatoid arthritis and spondyloarthritis“ (Ethikvotum EA1/138/14) und „Double-blind, placebo controlled study of Infliximab in ankylosing spondylitis“ (EK 717/200) geführt wurden in die Studie eingeschlossen. Alle Patient*innen willigten mit einer schriftlichen Einverständniserklärung in die Durchführung der Studie ein. In der Infliximabkohorte befanden sich 7 Patient*innen zum ersten Messzeitpunkt in einer Therapiepause mit Infliximab, sie hatten die letzte Infliximabgabe ca. 3 Jahre vor der Serumentnahme erhalten. Zum 2. ZP waren alle wieder mit Infliximab behandelt.

Ziel unserer Untersuchung war es, vor allem Patient*innen mit ADA zu identifizieren, um eine mögliche Interaktion von ADA und den klinischen Verlauf zu untersuchen. Für die Vorauswahl wurden Verlaufs-Serumspiegel von 103 Adalimumab-Proben (28 Patient*innen) und 110 Infliximab-Proben (42 Patient*innen) mit dem „drug level ®“-Kit der Firma Sanquin Blood Supply Foundation (Amsterdam, Niederlande) gemessen. Für den weiteren Studienverlauf wurden Proben eingeschlossen, deren Therapieantikörper-

Serumspiegel über die Messzeitpunkte hinweg abfielen, oder dauerhaft sehr niedrig waren. Dieses Vorgehen basierte auf der Grundannahme, dass ADA einen Abfall der Medikamenten-Serumspiegel bedingen, da sie den korrespondierenden Therapieantikörper binden. Die Proben der Patienten, deren Medikamenten-Serumkonzentrationen kontinuierlich innerhalb des therapeutischen Bereichs lagen, wurden ausgeschlossen, da in diesen Fällen eine relevante Interaktion mit ADA nicht anzunehmen war (siehe Abbildung 3).

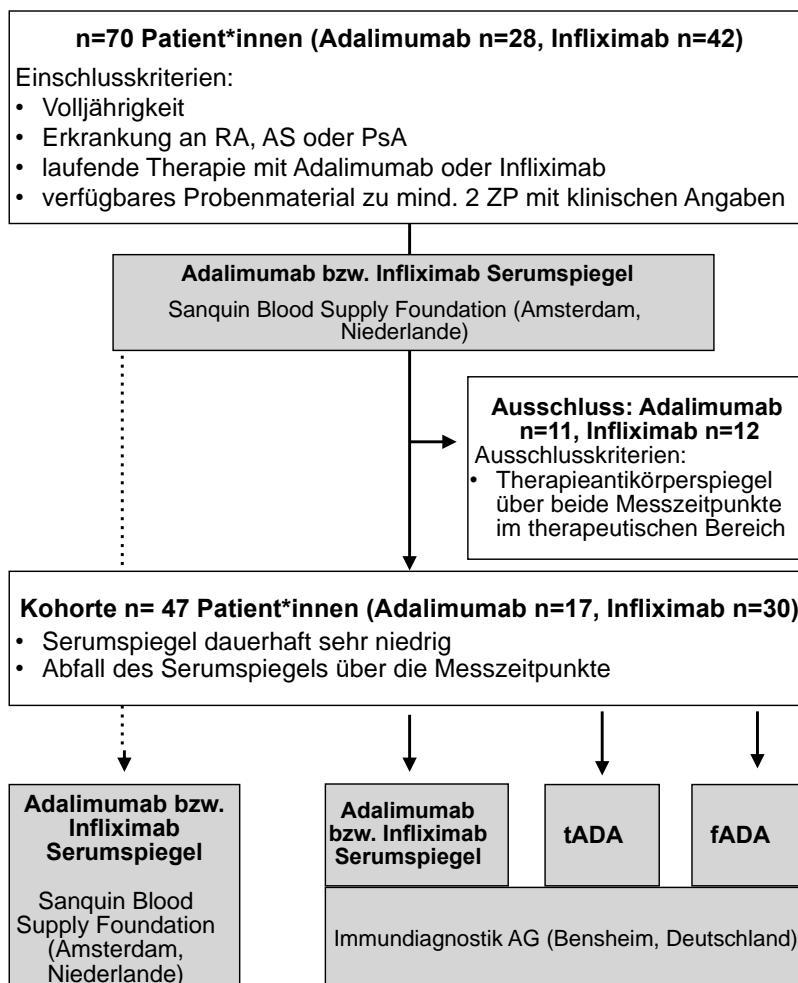


Abbildung 3: Flowchart zur Probengewinnung- und bearbeitung.

Die grauen Felder zeigen jeweils die entsprechend verwendeten Assays an. Abkürzungen: tADA= totale Anti-Drug-Antikörper, fADA= freie Anti-Drug-Antikörper. Gepunkteter Pfeil: Nach der ersten Therapieantikörper-Serumspiegel-Testung erfolgte keine erneute Messung für die Therapieantikörper-Serumspiegel der eingeschlossenen Patient*innen.

6.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien der vorliegenden Studie

Folgende Einschlusskriterien wurden für die geplante Untersuchung gestellt:

- *Volljährigkeit*

- *Erkrankung an einer der chronisch-inflammatorischen Gelenkerkrankungen (RA, AS oder PsA)*
- *laufende Therapie mit entweder Adalimumab oder Infliximab*
- *verfügbares Probenmaterial zu mindestens 2 ZP mit den entsprechenden klinischen Angaben*

6.2 Scores zur Erhebung der klinischen Krankheitsaktivität

Zur Beurteilung der Krankheitsaktivität wurden von den Patient*innen zu jeder Untersuchung krankheitsspezifische Scores erhoben. Die RA und PsA mit peripherer Gelenkbeteiligung werden anhand des DAS-28 beurteilt und die AS anhand des BASDAI.

6.2.1 Disease Activity Score 28 zur Erhebung der Krankheitsaktivität bei der Rheumatoiden Arthritis und der Psoriasis Arthritis

Zur quantitativen Beurteilung der Krankheitsaktivität der RA und auch der PsA dient der DAS-28. Dieser ist ein nach einer Formel berechneter Wert, in den die Anzahl von 28 druckschmerzhaften (tender joint count (TJC)) und geschwollenen Gelenke (swollen joint count (SJC)), die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) sowie die subjektive Einschätzung des Krankheitszustandes durch die Patient*innen (auf einer visuellen Analogskala von 0-100 mm) einfließen ¹⁰⁰. Alternativ kann der DAS-28 auch über das C-reaktive Protein (CRP) als Entzündungswert berechnet werden. Die jeweiligen Formeln zur Berechnung lauten ¹⁰¹:

$$\text{DAS-28(CRP)} = 0.56 \times \sqrt{(\text{TJC}-28)} + 0.28 \times \sqrt{(\text{SJC}-28)} + 0.014 \times \text{GH} + 0.36 \times \ln(\text{CRP} + 1) + 0.96$$

$$\text{DAS-28(BSG)} = 0.56 \times \sqrt{(\text{TJC}-28)} + 0.28 \times \sqrt{(\text{SJC}-28)} + 0.014 \times \text{GH} + 0.70 \times \ln(\text{BSG})$$

Zwischen dem DAS-28(BSG) und dem DAS-28(CRP) besteht innerhalb der Krankheitsaktivitätskategorien und den European League Against Rheumatism (EULAR)-Kriterien zum Therapieansprechen Übereinstimmung. Abweichungen werden vor allem zwischen geringen Krankheitsaktivitätswerten gefunden. Der durchschnittliche Unterschied zwischen dem DAS-28(BSG) und DAS-28(CRP) wird mit 0,34 (95% Übereinstimmungsgrenze) angegeben ¹⁰¹. Für beide Erfassungsmethoden gibt es Einstufungen, die in Tabelle 1 beschrieben sind ¹⁰². Der DAS-28 kann auch anhand von 3 Variablen berechnet werden ⁹⁴. In der vorliegenden Studie wurden Werte verwendet,

die sowohl aus 3 oder 4 Variablen als auch mit CRP oder BSG berechnet wurden. Es wurde für dieselbe Person jedoch immer einheitlich entweder der DAS-28(BSG) oder der DAS- 28(CRP) verwendet.

Tabelle 1: DAS-28 (BSG)/(CRP) Interpretation

DAS-28 (BSG)/(CRP)	Krankheitsaktivität
≤ 2,6	Remission
> 2,6 - ≤ 3,2	geringe Aktivität
> 3,2 - ≤ 5,1	moderate Aktivität
> 5,1	hohe Aktivität

Zur individuellen Beurteilung des Therapieansprechens von antiinflammatorischen Medikamenten für die RA werden die EULAR-Response Kriterien verwendet ¹⁰². Wird der DAS-28 als Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität verwendet, werden die Patient*innen als Patient*innen mit gutem, mittlerem oder fehlendem Therapieansprechen klassifiziert, jeweils gemessen an der Veränderung des DAS-28-Wertes von der Baseline bis zum Endpunkt der Studie. Ein Unterschied von mindestens $\Delta 1,2$ Punkten zwischen zwei Messzeitpunkten gilt als gutes Therapieansprechen ⁹⁴. Tabelle 2 gibt einen Überblick über das EULAR-Therapieansprechen.

Tabelle 2: EULAR-Therapieansprechen anhand des DAS-28

DAS-28 zum Endpunkt	Veränderung im DAS-28 von der Baseline bis zum Endpunkt		
	≥1,2	> 0,6 - ≤ 1,2	≤ 0,6
≤ 3,2	Gutes Therapieansprechen		
> 3,2 - ≤ 5,1		Moderates Therapieansprechen	
> 5,1			Fehlendes Therapieansprechen

6.2.2 Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index zur Erhebung der Krankheitsaktivität bei Ankylosierender Spondylitis

Der BASDAI ist ein standardisierter Patient*innenfragebogen, der mit 6 Fragen anhand visueller Analogskalen (1-10) die Einschätzung der Patient*innen zu den Bereichen Müdigkeit, Schmerzen und Schwellungen (spinal und peripher), Berührungs- und

Druckempfindlichkeit sowie Morgensteifigkeit abfragt. Es können Werte zwischen 0 und 10 erreicht werden. Ein Wert >4 gilt als aktive Krankheitsaktivität ^{103,104}.

Der Score berechnet sich durch die Summe der Fragen 1-4 plus den Mittelwert der Fragen 5+6 dividiert durch 5. Folgende Fragen sind Bestandteil des BASDAI (übernommen aus *Deutsche Vereinigung Morbus Bechterew e.V.*) ¹⁰⁵.

1. Wie ausgeprägt war Ihre Müdigkeit und Erschöpfung in den vergangenen 7 Tagen insgesamt? (1-10)
2. Wie ausgeprägt waren Ihre durch den Morbus Bechterew bedingten Nacken-, Rücken - oder Hüftschmerzen in den vergangenen 7 Tagen insgesamt? (1-10)
3. Wie ausgeprägt waren Ihre Schmerzen/ Schwellungen in anderen Gelenken in den vergangenen 7 Tagen insgesamt? (1-10)
4. Wie ausgeprägt waren Ihre Beschwerden in den Bereichen, die bei Berührung oder Druck empfindlich reagiert haben, in den vergangenen 7 Tagen insgesamt? (1-10)
5. Wie ausgeprägt war die Morgensteifigkeit nach dem Aufwachen in den vergangenen 7 Tagen insgesamt? (1-10)
6. Wie viele Stunden dauerte die Morgensteifigkeit nach dem Aufwachen in den vergangenen 7 Tagen im Durchschnitt an? ($0 \triangleq 0h$, $5 \triangleq 1h$, $10 \triangleq 2h$)

6.3 Bestimmung der Therapieantikörper Serumspiegel und deren Anti-Drug-Antikörper mittels Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay

Die von uns verwendeten Assays basieren auf dem ELISA-Prinzip. Der ELISA gehört zu den Immunoassayverfahren und ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Substratumsetzung mit Veränderung der optischen Dichte beruht. Die Sandwich-ELISA Technik verwendet zwei Antikörper. Auf eine Mikrotiterplatte wird ein Antikörper fest gebunden (capture antibody) und die Probe mit dem nachzuweisenden Antigen hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wird das nicht gebundene Antigen durch Waschen entfernt. Das enzymmarkierte Konjugat (detection antibody) wird hinzugegeben. Es bindet an einer anderen Stelle des nachzuweisenden Antigens, in diesem Fall dem Adalimumab oder Infliximab-Molekül, nicht gebundenes Konjugat wird entfernt. Durch Zugabe eines Substrates erfolgt die Enzym-Substrat-Reaktion, die eine zur Konzentration des nachzuweisenden Antigens proportionale Veränderung der optischen Dichte hervorruft ¹¹. Alle Reagenzien wurden vor

Verwendung auf Raumtemperatur (15-30°C) gebracht. Eine schematische Darstellung des ELISA-Prinzips zeigt Abbildung 4.

6.3.1 Assays zum Nachweis von Infliximab- und Adalimumabkonzentrationen, Hersteller Sanquin

Es wurden die Assays „Level infliximab: ELISA zur quantitativen Messung der Wirkstoffspiegel von Infliximab®“¹⁰⁶ sowie „Level adalimumab: ELISA zur quantitativen Messung der Wirkstoffspiegel von Adalimumab®“ des Herstellers Sanquin Blood Supply Foundation (Amsterdam, Niederlande) verwendet.

Die Durchführung der ELISA für Infliximab und Adalimumab erfolgte analog, so dass eine gemeinsame Beschreibung erfolgt.

Für die Durchführung wurden alle Serumproben zuvor 1:1000 verdünnt. Dafür wurde zunächst eine 1:50 Verdünnung (5 Mikroliter (µl) unverdünnte Probe auf 245 µl Meerrettichperoxidase (HPE-Puffer)) hergestellt. 6 µl dieser 1:50 Verdünnung wurden anschließend mit 114 µl HPE-Puffer verdünnt, um die gewünschte Konzentration zu erhalten. Der Waschpuffer wurde durch 50 ml der Stammlösung des Waschpuffers (PBS (Phosphat Buffered Saline)- Puffer) mit 950 ml destilliertem Wasser hergestellt.

Die 1:1000 verdünnten Proben wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und 60 Minuten (min) inkubiert. Nach einem viermaligen Waschschrift (4x 250 µl Waschpuffer) (Microplate Washer der Firma Dynex Opsys MW™, Denkendorf, Deutschland) erfolgte die Detektion durch Zugabe von 100 µl Anti-Infliximab/Meerrettichperoxidase (HRP)-Konjugat bzw. Anti-Adalimumab HRP-Konjugat zu jeder Vertiefung. Nach einstündiger Inkubationszeit und einem weiteren Waschschrift siehe oben (s.o.) wurden je 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)- Substrat hinzugegeben. Die im Dunkeln stattfindende Farbreaktion wurde alle 5 min kontrolliert und nach durchschnittlich 10±1 min durch Zugabe einer Stopplösung gestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 Nanometer (nm) innerhalb von 30 min mit dem Photometer (Platten OD-Reader „BioTek Synergy HAT“, Gen5 Version 1.11.5 der Firma Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) gemessen und die Daten ausgewertet. Das Sandwich-ELISA Prinzip ist in Abbildung 4 schematisch gezeigt.

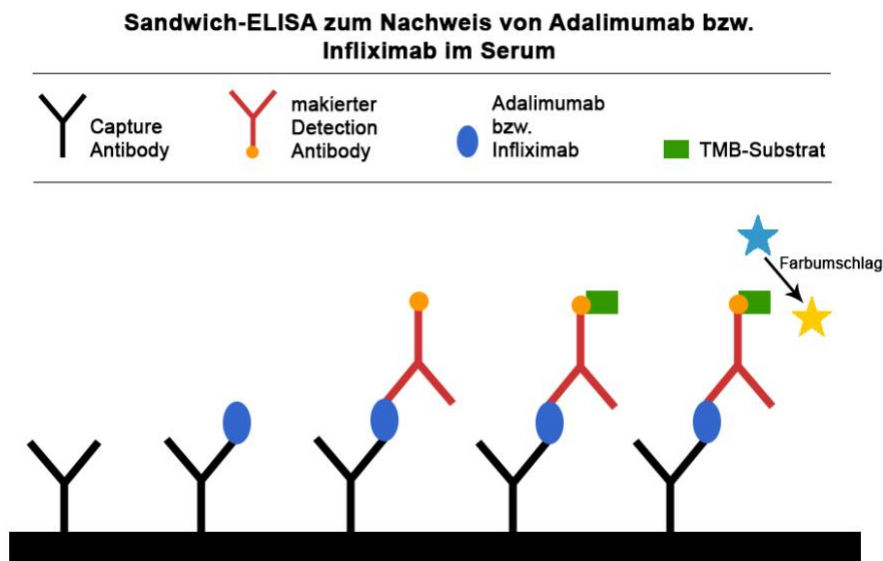


Abbildung 4: ELISA Prinzip zum Nachweis von Adalimumab bzw. Infliximab im Serum
 Die einzelnen Schritte werden im Text erklärt. Abkürzungen: TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Wir verwendeten ausschließlich 1:1000 Verdünnungen. Zur Konzentrationsberechnung wurde die ermittelte Konzentration (Einheit Nanogramm (ng)/ml) mit dem Verdünnungsfaktor (1000) multipliziert. Anschließend erfolgte eine Konvertierung in Mikrogramm (μg)/ml (ermittelte Konzentration in ng/ml : 1000).

Als Standards wurden Konzentrationen von 0,4; 0,8; 1,6; 3,1; 6,3; 12,5; 25 ng/ml verwendet. Folgende Konzentrationen wurden vom Hersteller für den therapeutischen Therapiebereich angegeben (siehe Tabelle 3 und Tabelle 4):

Tabelle 3: therapeutische Konzentrationen Infliximab nach Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande)

Angaben der therapeutischen Konzentration für Infliximab-behandelte Patient*innen	
Gesunde Spender und nicht mit Infliximab behandelte Patient*innen	negativ
Subtherapeutische Infliximab-Spiegel	< 3,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Normale therapeutische Infliximab-Spiegel	3,0-7,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Erhöhte Infliximab-Spiegel	> 7,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Die Protokolldurchführung für den Nachweis von Adalimumab entsprach dem oben beschriebenen Protokoll zum Nachweis von Infliximab (inklusive Konzentrationen der Standardkurven). Die untere Bestimmungsgrenze für Adalimumab betrug 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (1:200). Die obere (Antigenüberschuss) 45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bei 1:2000.

Tabelle 4: therapeutische Konzentrationen Adalimumab nach Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande)

Angaben der therapeutischen Konzentration für Adalimumab-behandelte Patient*innen ¹⁰⁷	
Gesunde Spender und nicht mit Adalimumab behandelte Patient*innen	negativ
Subtherapeutische Adalimumab-Spiegel	< 5,0 µg/ml
Normale therapeutische Adalimumab-Spiegel	5,0-8,0 µg/ml
Erhöhte Adalimumab-Spiegel	> 8,0 µg/ml

6.3.2 Assay zum Nachweis von Infliximab- und Adalimumabkonzentrationen, Hersteller Immundiagnostik AG

Zur Bestimmung des Serumspiegels der Therapieantikörper wurde das „IDKmonitor® *Infliximab drug level ELISA (Zur in vitro-Bestimmung der Konzentration des freien Infliximab (z.B. REMICADE)) in EDTA-Plasma und Serum*“ sowie das „IDKmonitor® *Adalimumab drug level ELISA (Zur in vitro-Bestimmung der Konzentration des freien Adalimumab (z.B. HUMIRA)) in EDTA-Plasma und Serum*“ Assay des Herstellers Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) verwendet. Das Sandwich-ELISA Prinzip ist in Abbildung 4 schematisch gezeigt. Die Durchführung der ELISA für Infliximab und Adalimumab erfolgte analog, so dass eine gemeinsame Beschreibung erfolgt ¹⁰⁸.

Die 1:200 verdünnten Proben wurden in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert und 60 min unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit je 5x 250 µl Waschpuffer erfolgte zur Detektion die Zugabe von je 100 µl Konjugat (Peroxidase (POD)-markierter Antikörper). Nach einstündiger Inkubationszeit und einem weiteren 5-maligen Waschschrift wurden je 100 µl TMB-Substrat hinzugegeben. Die im Dunkeln stattfindende enzymatische Farbentwicklung wurde nach 10-20 min durch Zugabe einer Stopplösung (verdünnte Schwefelsäure) unterbrochen. Die Extinktion wurde bei 450 nm gegen einen Referenzwert von 620 nm gemessen.

Alle Adalimumab Proben wurden analog zur Infliximab Anleitung getestet. Die Konzentrationen der Standards betragen ebenfalls 0; 4,15; 8,3; 25; 75; 225 ng/ml.

Zur Konzentrationsberechnung wurde die ermittelte Konzentration (Einheit ng/ml) mit dem Verdünnungsfaktor (200) multipliziert. Anschließend erfolgte eine Konvertierung in µg/ml (ermittelte Konzentration in ng/ml : 1000).

6.3.3 Assay zum Nachweis von totalen Anti-Drug-Antikörpern gegen Infliximab und Adalimumab

Es wurden die Assays „IDKmonitor: Infliximab total ADA ELISA (zur in-vitro Bestimmung der gesamten humanen Antikörper gegen Infliximab (z.B. Remicade)) in EDTA Plasma und Serum®“¹⁰⁹ sowie „IDKmonitor: Adalimumab total ADA ELISA (zur in-vitro Bestimmung der gesamten humanen Antikörper gegen Adalimumab (z.B. Humira)) in EDTA Plasma und Serum®“ des Herstellers Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) verwendet.

Dieses Assay dient der in-vitro-Bestimmung der gesamten humanen Antikörper gegen Infliximab in EDTA-Plasma und Serum. Laut Hersteller eignet sich der Test auch in Anwesenheit von Infliximab bzw. Adalimumab für eine zuverlässige Bestimmung der ADA, die sowohl frei als auch gebunden sein können. Das ELISA-Prinzip ist schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Die einzelnen Schritte werden im Text beschrieben.

Für die Ermittlung der tADA wurden die Serumproben in der Vorbereitung 1:10 mit Assaypuffer verdünnt. Dafür wurden zu 25 µl Probe 225 µl Assaypuffer gegeben. Zudem wurden die positiv- und negativ-Kontrollen in 250 µl Assaypuffer rekonstituiert. Nach 20-minütiger Inkubationszeit unter Schütteln auf dem Horizontalschüttler wurden zu je 250 µl Kontrolle/verdünnter Probe jeweils 60 µl der Tracer-Konjugat-Antikörperverdünnungspuffer-Lösung gegeben und eine Stunde inkubiert.

Durch die Probenvorbereitung wird der ADA durch einen niedrigen pH-Wert von dem Therapieantikörper abgespalten, so dass alle ADA von Infliximab bzw. Adalimumab getrennt werden und frei vorliegen (Schritte A und B). Bei der Probenvorbereitung handelt es sich um eine Verdrängungsreaktion, so dass durch ein Überangebot an biotinylierten Antikörpern (Tracer) und POD-markierten Antikörpern der ursprüngliche Therapieantikörper verdrängt wird. Dabei binden der POD-markierte Antikörper und der biotinylierte Antikörper an die ADA und verdrängen das unmarkierte Infliximab/Adalimumab. Außerdem binden die biotinylierten Antikörper-Komplexe mit ADA an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte (Schritt C). Für die Testdurchführung wurde die Mikrotiterplatte vor Gebrauch 5x mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen und anschließend trocken ausgeschlagen. 100 µl der vorinkubierten Proben bzw. Kontrollen wurden in die Mikrotiterplatte aufgetragen und 1,5 h unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Es erfolgten 5 aufeinander folgende Waschschrte mit Waschpuffer

(je 250 μ l) und die Zugabe von 100 μ l TMB-Substrat (Schritt D). Der erste Waschschrift erfolgt erst, nachdem der Therapieantikörper-ADA-Komplex über eine Streptavidin-Biotin Bindung an der Mikrotiterplatte gebunden hat. Das TMB-Substrat wird durch die Peroxidase aktiviert und nach 10-20-minütiger Inkubationszeit enzymatisch zu einem blauen Farbstoff umgesetzt, die anschließend mit 100 μ l Stopplösung (verdünnte Schwefelsäure) gestoppt wurde (Schritt E). Es erfolgte ein Farbumschlag von blau zu gelb. Die entstandene chromogene Verbindung wurde im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm photometrisch gemessen.

Nach Angaben des Herstellers werden alle ADA detektiert, die sich gegen die Fab-Arme des Therapieantikörpers richten. Die einzige Ausnahme bilden IgG4 Antikörper, die einen Fab-Arm Exchange durchlaufen haben, welche nicht detektiert werden können.

Für diesen Test wurde als Kontrolle eine optische Dichte (OD) Cut-Off-Kontrolle verwendet. Der Cut-Off betrug 10 Arbitrary Unit/ml (AU/ml). Alle Proben, deren mittlere OD höher war als die der Cut-Off-Kontrolle, waren demnach positiv.

Es wurde jeweils keine Kreuzreaktivität zu ADA gegen Infliximab/Adalimumab gefunden. Die Testdurchführung war für Adalimumab und Infliximab identisch.

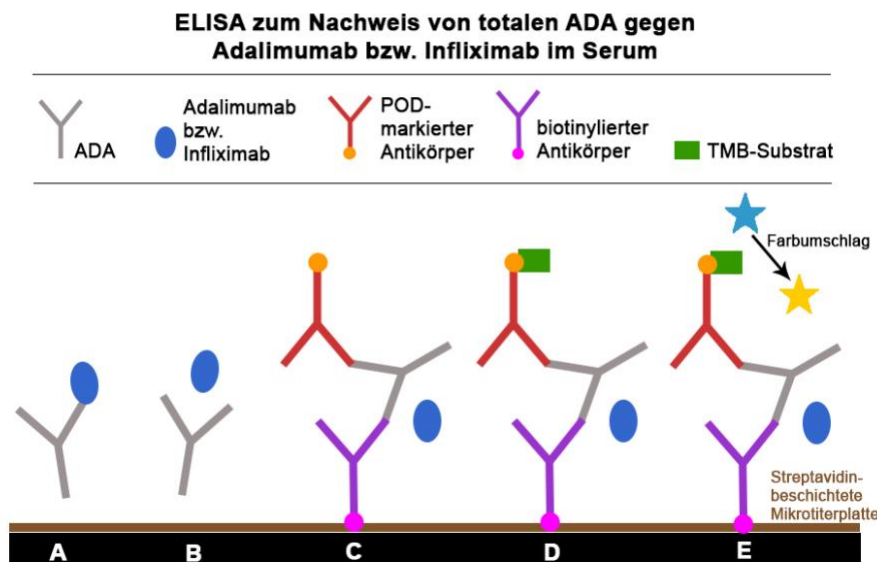


Abbildung 5: ELISA-Prinzip zum Nachweis von totalen ADA gegen Adalimumab bzw. Infliximab.

Die einzelnen Schritte A-E werden im Text erklärt. Abkürzungen: ADA: Anti-Drug-Antikörper, POD: Peroxidase, TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Berechnung der Titerhöhe der Patient*innenprobe: Beispiel (für Infliximab und Adalimumab)

Mittlere OD Patient*innenprobe 0,735

Mittlere OD Cut-Off-Kontrolle 0,085= 10 AU/ml

Konzentration Patient*innenprobe $(0,735 \times 10 \text{ AU/ml}) / 0,085 = 86,47 \text{ AU/ml}$

Zur Klassifizierung der Titerhöhe wurde sich an der Einteilung von Ramos *et al.* 2016 orientiert. Es wurden die Einteilungen <20 AU/ml, 20-40 AU/ml und >80 AU/ml verwendet. Der von Ramos *et al.* 2016 nicht berücksichtigte Bereich zwischen 40-80 AU/ml wurde in unserer Arbeit den mittleren Titern zugeordnet ¹¹⁰. Das Autor*innenteam verwendete das gleiche Assay (*IDKmonitor: Infliximab total ADA ELISA (zur in-vitro Bestimmung der gesamten humanen Antikörper gegen Infliximab (z.B. Remicade)) in EDTA Plasma und Serum®* ¹⁰⁹).

Niedriger Titer: <20 AU/ml

Mittlerer Titer: 20-80 AU/ml

Hoher Titer: >80 AU/ml

6.3.4 Assay zum Nachweis von freien Anti-Drug-Antikörpern gegen Infliximab und Adalimumab

Es wurden die Assays *„IDKmonitor: Infliximab free ADA ELISA (zur in-vitro Bestimmung der freien humanen Antikörper gegen Infliximab (z.B. Remicade)) in EDTA Plasma und Serum®* ¹¹¹ sowie *„IDKmonitor: Adalimumab free ADA ELISA (zur in-vitro Bestimmung der freien humanen Antikörper gegen Adalimumab (z.B. Humira)) in EDTA Plasma und Serum®* des Herstellers Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) verwendet. Das ELISA-Prinzip ist schematisch in Abbildung 6 dargestellt. Die einzelnen Schritte werden im Text beschrieben.

Für die Ermittlung der fADA gegen Infliximab wurden die lyophilisierten Kontrollen (Negativkontrolle, Positivkontrolle, Cut-Off-Kontrolle) in der Vorbereitung mit 300 µl Reinstwasser rekonstituiert und nach vorsichtigem Mischen 10 Minuten ruhen gelassen. Unmittelbar vor Gebrauch wurde das Konjugatkonzentrat 1:100 in Waschpuffer verdünnt.

Für die Testdurchführung wurden 50 µl Probe mit 250µl Probenpuffer sowie 50 µl Assaypuffer verdünnt und insgesamt 30min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Probe, Negativkontrolle, Positivkontrolle und Cut-Off Kontrolle in die Vertiefung pipettiert und 16-20 h bei 2-8°C unter Schütteln inkubiert. Die fADA aus der Probe binden in diesem Assay an das auf der Platte fixierte Infliximab-Fab-Fragment (Schritte A und B). Es folgten 5 aufeinanderfolgende Waschschriffe mit je 250 µl Waschpuffer. Es folgte die Detektion durch Hinzugabe eines POD-markierten Antikörpers (Schritt C). Nach einstündiger Inkubationszeit und erneuten 5-maligen Waschschriffen wurden je 100 µl TMB-Substrat hinzugegeben, das durch die Peroxidase aktiviert, zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wurde (Schritt D). Durch Zugabe verdünnter Schwefelsäure wurde die Reaktion gestoppt und es erfolgte ein gelber Farbumschlag (Schritt E). Die Extinktion wurde bei 450 nm gegen 620 nm gemessen. Die Intensität der Farbe ist dem Gehalt der fADA gegen Infliximab direkt proportional. Auch in diesem Kit wurde eine Cut-Off Kontrolle von 10 AU/ml verwendet. Die Berechnung der Titerhöhe von fADA erfolgte analog zur Berechnung der Titerhöhe bei tADA (Absatz 6.3.3.).

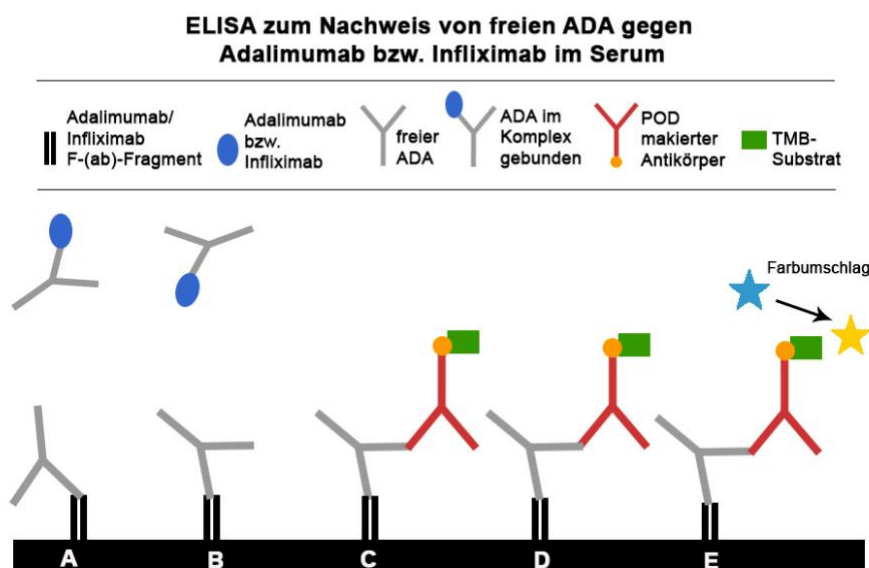


Abbildung 6: ELISA-Prinzip zum Nachweis von freien ADA gegen Adalimumab/Infliximab.

Die einzelnen Schritte A-E werden im Text erklärt. Abkürzungen: F-(ab): fragment antigen binding, ADA: Anti-Drug-Antikörper, POD: Peroxidase, TMB: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin.

Die Adalimumabproben wurden 1:10 mit Probenpuffer verdünnt. Es erfolgte zur Vorbereitung keine Zugabe von Assaypuffer. Die danach folgenden Schritte wurden analog zur Infliximab-Anleitung durchgeführt.

Der Hersteller schließt eine Kreuzreaktion von Rheumafaktoren oder irregulären Antikörpern aus.

6.3.5 Therapeutischer Bereich

Es gab zum Zeitpunkt der Analyse noch keine eindeutigen Empfehlungen zum therapeutischen Bereich der verwendeten Therapieantikörper. Autor*innen^{112,113} konnten festlegen, dass eine Adalimumabkonzentration $<5 \mu\text{g/ml}$ als subtherapeutisch gilt und bei diesen Konzentrationen eine optimale Wirkung des Medikamentes nicht mehr garantiert werden kann. Obergrenzen des therapeutischen Bereichs werden mit $>8 \mu\text{g/ml}$ angebenen, jedoch bestand kein Konsens, ob dieser festgelegt werden muss^{112,113}. Laut Studienlage galt die Infliximabkonzentration $<3 \mu\text{g/ml}$ als subtherapeutisch. Eine Obergrenze wurde mit $7 \mu\text{g/ml}$ angegeben¹¹⁴. Der Hersteller Sanquin gab die gleichen Angaben zum therapeutischen Bereich an, wie sie die Studienlage beschreibt. Die vorliegende Arbeit orientierte sich ebenfalls an diesen Werten.

6.4 Statistische Auswertung

Für die statistische Analyse wurde das Patient*innenkollektiv aus 47 Patient*innen (145 Proben) in eine Adalimumab (N= 17 Patient*innen \cong 66 Proben) und eine Infliximab Gruppe (N= 30 Patient*innen \cong 79 Proben) unterteilt. Aufgrund der kleinen Studiengröße und der dadurch fehlenden Varianzhomogenität innerhalb der Gruppe wurde eine Normalverteilung ausgeschlossen und die Verwendung nicht-parametrischer Tests begründet. Alle Parameter einer Kohorte wurden quantitativ und qualitativ miteinander verglichen. Die deskriptive Statistik bestand aus Angaben von Median (25. und 75. Perzentile), Minimum und Maximum, sowie den absoluten und relativen Häufigkeiten. Die Korrelationsanalysen (mit dem Korrelationskoeffizienten r) nicht-normalverteilter Parameter wurden nach Spearman durchgeführt. Zur Analyse von Lageunterschieden in zwei Gruppen wurde bei unabhängigen Stichproben der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Zur Analyse von Zusammenhängen von zwei kategorialen Variablen diente bei unabhängigen Stichproben der Chi-Quadrat-Test (χ^2). Das Signifikanzniveau wurde bei einem Signifikanzwert (p -Wert) $< 0,05$ angenommen. Das Konfidenzintervall betrug 95%.

Die statistische Auswertung der vorhandenen Daten erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS (Version 24.0). Grafiken, die nicht in SPSS zu erstellen waren, wurden mit Microsoft Excel (Version 16.15) erstellt.

Für diese Arbeit erfolgte eine statistische Beratung für Promovierende durch Dr. rer. nat. Sophie Piper, Institut für Biometrie und klinische Epidemiologie, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

7 Ergebnisse

Bei allen Patient*innen wurden die Serumkonzentrationen der jeweiligen Therapieantikörper sowie die tADA und fADA im Verlauf erhoben. Diese Werte wurden sowohl innerhalb als auch zwischen den zwei Medikamentengruppen verglichen. Außerdem wurde untersucht, inwieweit sich die oben aufgeführten Parameter zwischen den einzelnen Krankheitsbildern in ihrer Prävalenz unterschieden und wie diese die klinische Krankheitsaktivität beeinflussten. Für die Serumspiegel der Therapieantikörper wurden bis auf in Abschnitt 7.4 die Ergebnisse des Herstellers „Immundiagnostik AG“ verwendet.

7.1 Studiencharakteristika

Die Studiencharakteristik ist in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Studiencharakteristika

Studiencharakteristika	Adalimumab	Infliximab
N	17	30
Alter (Median, q₂₅-q₇₅)	54,6 (48-64,5)	55,5 (47,5,-59)
Geschlecht		
<i>männlich</i>	5 (29,4%)	21 (70,0%)
<i>weiblich</i>	12 (70,6%)	9 (30,0%)
Diagnose		
<i>RA</i>	10 (58,9%)	
<i>PsA</i>	3 (17,6%)	6 (20,0%)
<i>AS</i>	4 (23,5%)	24 (80,0%)
cDMARD-Begleittherapie		
<i>ja</i>	9 (52,9%)	11 (36,7%)
<i>nein</i>	8 (47,1%)	19 (63,3%)

7.2 Deskriptive Statistik

Von jeder Patientin/ jedem Patienten lagen mindestens 2, maximal 6 Proben vor. Deskriptiv werden alle erhobene Ergebnisse präsentiert, zur besseren Übersichtlichkeit konzentriert sich die statistische Analyse (Absatz 7.3) jedoch nur auf die ZP 1 und 2, da die Fallzahlen der darauffolgenden ZP sehr gering waren und die Datenpräsentation unübersichtlich erschienen lassen. Die Proben der zum 1. ZP noch nicht mit Infliximab behandelten Patient*innen (N= 7) wurden für ausschließlich Infliximabkonzentrationen

betreffende Analysen ausgeschlossen, so dass sich die Anzahl der Proben zum 1. ZP auf N= 23 reduzierte. Ausnahmen wurden gekennzeichnet.

7.2.1 Adalimumab

Die in der Adalimumabkohorte erhobenen Ergebnisse sind in Tabelle 6 aufgeführt. Bei 7 Patient*innen (41,2%) lag die Adalimumabkonzentration zu ≥ 1 ZP im subtherapeutischen Bereich, davon bei 3 Patient*innen (42,9%) sogar unterhalb der Nachweisgrenze.

Die OD der Cut-Off Kontrolle für tADA wurde bei 0,05 erhoben. Proben die eine höhere mittlere OD als 0,05 hatten galten als tADA positiv. Die OD der Cut-Off Kontrolle für fADA wurde bei 0,026 erhoben. Proben, die eine höhere mittlere OD als 0,026 hatten galten als fADA positiv. Bei 7 Patient*innen (41,2%) wurden tADA gemessen, die alle zu ≥ 1 ZP auftraten. 2 dieser Patient*innen (28,6%) hatten zusätzlich zu den tADA auch positive fADA, von denen eine/r nur zu 1 ZP positiv war. Bei allen Patient*innen, bei denen fADA auftraten (N=2 (11,8%)), fanden sich in derselben Serumprobe auch tADA. Bei 10 Patient*innen (59%) traten nie tADA auf. Bei 1 Patient (5,9%) wurden kontinuierlich tADA gemessen.

Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Patient*innen unter Adalimumab

Subtherapeutische Adalimumab Konzentrationen: $<5 \mu\text{g/ml}$. Für die deskriptive Statistik der tADA und fADA wurden ausschließlich die positiven Patient*innen berücksichtigt.

Adalimumab	1. ZP	2. ZP	3. ZP	4. ZP	5. ZP	6. ZP
Anzahl (N)	17	17	12	9	6	5
Druglevel (in $\mu\text{g/ml}$)						
<i>Median</i>	7,32	7,00	9,70	8,44	3,75	8,96
<i>Minimum</i>	0,00	0,00	0,00	2,69	2,86	3,13
<i>Maximum</i>	14,34	13,57	13,53	12,32	13,21	11,18
<i>25. Perzentile</i>	5,35	1,85	5,68	5,76	2,86	4,45
<i>75. Perzentile</i>	10,97	11,13	10,94	10,59	10,58	10,09
<i>Therap. Konz.</i>	13 (76,5%)	10 (58,8%)	10 (83,3%)	7 (77,8%)	2 (33,3%)	4 (80,0%)
<i>Subtherap. Konz.</i>	4 (23,5%)	7 (41,2%)	2 (16,7%)	2 (22,2%)	4 (66,7%)	1 (20,0%)
totale Antikörper (in AU/ml)						
<i>Median</i>	46,86	111,57	31,86	16,86	13,63	
<i>Minimum</i>	44,12	13,73	19,02		12,94	
<i>Maximum</i>	56,27	655,10	44,71		14,31	
<i>25. Perzentile</i>	44,12	30,49	19,02		12,94	
<i>75. Perzentile</i>		416,13				
<i>tADA positiv</i>	3 (17,6%)	6 (35,3%)	2 (16,7%)	1 (11,1%)	2 (33,3%)	0
<i>tADA negativ</i>	14 (82,4%)	11 (64,7%)	10 (83,3%)	8 (88,9%)	4 (66,7%)	5 (100%)
freie Antikörper (in AU/ml)						
<i>Median</i>		356,73	80,77			
<i>Minimum</i>		25,77				
<i>Maximum</i>		687,69				
<i>25. Perzentile</i>		25,77				
<i>75. Perzentile</i>						
<i>fADA positiv</i>	0	2 (11,8%)	1 (8,3%)	0	0	0
<i>fADA negativ</i>	17 (100%)	15 (88,2%)	11 (91,7%)	9 (100%)	6 (100%)	5 (100%)

Von den tADA-positiven Patient*innen hatten 6/7 (85,7%) zu ≥ 1 ZP subtherapeutische Adalimumabkonzentrationen. Bei 3/7 (42,8%) lagen die Adalimumabkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze. Außerdem konnte bei allen Patient*innen, bei denen die Adalimumabkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, tADA und bei 2 (66,7%) Patient*innen ebenfalls fADA nachgewiesen werden.

Eine graphische Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Adalimumabspiegel bieten Abbildung 7 und Abbildung 8.

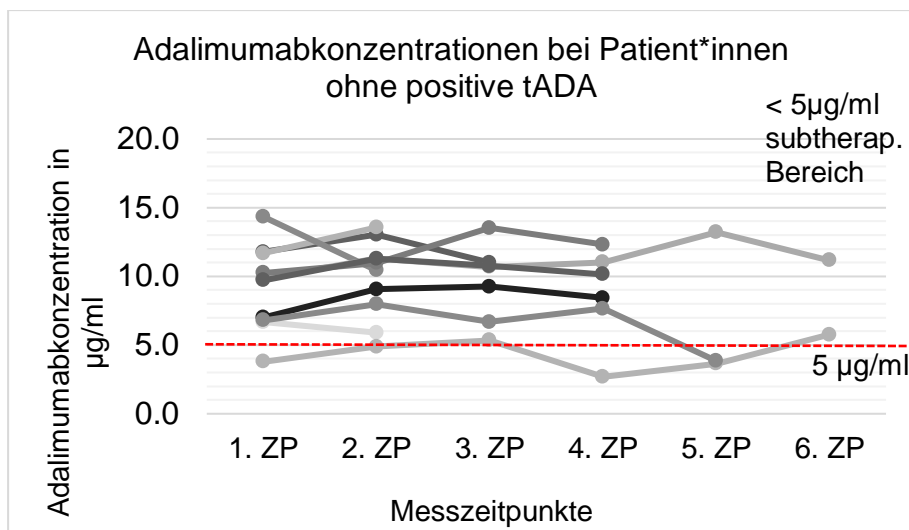


Abbildung 7: Adalimumabkonzentrationen in µg/ml bei N=10 Patient*innen ohne tADA (min. 2, max. 6 ZP)

Jede Linie entspricht einem/einer Patient/in. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 5 µg/ml ist gekennzeichnet.

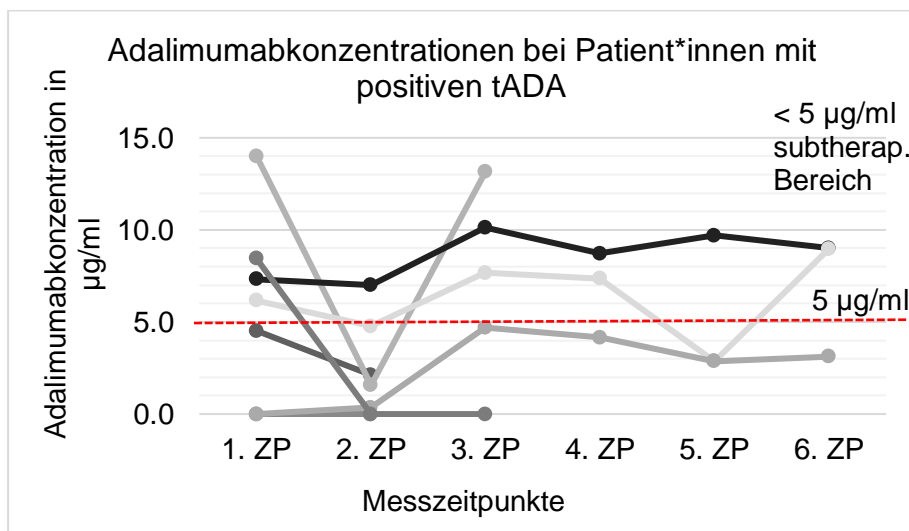


Abbildung 8: Adalimumabkonzentrationen in µg/ml bei N=7 Patient*innen mit tADA (min. 2, max. 6 ZP)

Jede Linie entspricht einem/einer Patient/in. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 5 µg/ml ist gekennzeichnet.

Krankheitsaktivität unter Adalimumab

Die Krankheitsaktivität der RA und PsA Patient*innen wurde über den DAS-28 ermittelt, bei denen eine Krankheitsaktivität in Remission überwog. Die Krankheitsaktivität der AS Patient*innen wurde mittels BASDAI ermittelt. Zu allen ZP lag mehrheitlich eine Krankheitsaktivität in Remission vor. Zu 4 Proben fehlten Parameter. Einen exakten Überblick über die Krankheitsaktivität gibt Tabelle 7.

Tabelle 7: Krankheitsaktivität unter Adalimumab über die Messzeitpunkte gemessen am BASDAI und DAS-28

	1. ZP	2. ZP	3. ZP	4. ZP	5. ZP	6.ZP
RA und PsA mit erhobenem DAS-28-Wert						
<i>Anzahl (N)</i>	12	13	8	6	4	3
<i>Median</i>	2,53	3,17	2,05	1,97	2,32	1,23
<i>Minimum</i>	1,50	0,68	1,51	1,25	0	0,16
<i>Maximum</i>	4,80	4,05	3,78	3,33	2,81	2,22
<i>25. Perzentile</i>	1,80	1,97	1,63	1,62	0,58	0,16
<i>75. Perzentile</i>	3,48	3,94	2,80	2,60	2,69	
Krankheitsaktivität DAS-28						
<i>Remission (<2,6)</i>	6 (50,0%)	6 (46,2%)	6 (75,0%)	5 (83,3%)	3 (75,0%)	3 (100%)
<i>gering (>2,6-3,2)</i>	2 (16,7%)	7 (53,8%)	1 (12,5%)	1 (16,7%)	1 (25,0%)	
<i>moderate (3,2-5,1)</i>	4 (33,3%)		1 (12,5%)			
<i>hoch (>5,1)</i>						
AS mit erhobenem BASDAI-Wert						
<i>Anzahl (N)</i>	4	4	3	3	2	
<i>Median</i>	1,75	2,10	0,80	0,80	0,55	
<i>Minimum</i>	0,40	0,80	0,6	0,80	0,50	
<i>Maximum</i>	8,65	8,84	7,00	5,50	0,60	
<i>25. Perzentile</i>	0,50	0,98	0,60	0,80	0,55	
<i>75. Perzentile</i>	7,16	7,31				
Krankheitsaktivität BASDAI						
<i>Remission (<4)</i>	3 (75,0%)	3 (75,0%)	2 (66,7%)	2 (66,7%)	2 (100%)	
<i>Aktiv (>4)</i>	1 (25,0%)	1 (25,0%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)		

7.2.2 Infliximab

Die in der Infliximabkohorte erhobenen Ergebnisse sind in Tabelle 8 festgehalten.

Bei 20 Patient*innen (66,7%) lag die Infliximabkonzentration zu ≥ 1 ZP unterhalb des therapeutischen Bereichs, von denen bei 7 Patient*innen (35,0%) zu ≥ 1 ZP Spiegel unterhalb der Nachweisgrenze gemessen wurden. Bei 2 Patient*innen (6,7%) kam es zu einem Overflow (Messwerte oberhalb des quantifizierbaren Bereiches).

Die OD der Cut-Off Kontrolle für tADA wurde bei 0,058 gemessen. Proben, die eine höhere mittlere OD als 0,059 hatten galten als tADA positiv. Die OD der Cut-Off Kontrolle für fADA betrug 0,033. Proben, die eine höhere mittlere OD als 0,033 hatten galten als fADA positiv. Bei 19 Patient*innen (63,3%) traten mindestens einmal während des

Messzeitraums tADA auf. Bei 10 (33,3%) Patient*innen wurde kontinuierlich tADA gemessen. 11 (36,7%) Patient*innen waren über den gesamten Messzeitraum tADA negativ. Im Serum von 3 (10,0%) Patient*innen traten über den gesamten Zeitraum positive fADA auf, bei 13 (43,3%) wurden zu ≥ 1 ZP positive fADA gemessen. Bei allen Patient*innen, bei denen fADA auftraten, fanden sich in derselben Serumprobe auch tADA.

Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Patient*innen unter Infliximab

Subtherapeutische Infliximab Konzentrationen: $< 3 \mu\text{g/ml}$. Für die deskriptive Statistik der tADA und fADA wurden ausschließlich die positiven Patient*innen berücksichtigt; (*ohne N= 7 unbehandelte Patient*innen)

Infliximab	1. ZP	2. ZP	3. ZP
Anzahl (N)	30	30	18
Druglevel (in $\mu\text{g/ml}$)	N=23*		
<i>Median</i>	0,83	3,94	4,93
<i>Minimum</i>	0,00	0,00	0,83
<i>Maximum</i>	27,45	30,00	30,00
<i>25. Perzentile</i>	0,00	1,14	1,28
<i>75. Perzentile</i>	10,10	9,33	9,71
<i>Therap. Konz.</i>	6 (26,0%)	17 (56,7%)	11 (61,1%)
<i>Subtherap. Konz.</i>	17 (74,0%)	13 (43,3%)	7 (38,9%)
totale Antikörper in AU/ml			
<i>Median</i>	25,95	18,53	18,10
<i>Minimum</i>	10,17	10,17	2,07
<i>Maximum</i>	517,24	517,24	112,59
<i>25. Perzentile</i>	11,90	11,72	10,86
<i>75. Perzentile</i>	37,03	62,16	32,76
<i>tADA positiv</i>	16 (53,3%)	16 (53,3%)	7 (38,9%)
<i>tADA negativ</i>	14 (46,7%)	14 (46,7%)	11 (61,1%)
freie Antikörper in AU/ml			
<i>Median</i>	17,27	17,27	15,76
<i>Minimum</i>	6,06	3,94	14,55
<i>Maximum</i>	503,03	471,21	31,53
<i>25. Perzentile</i>	14,39	10,61	14,55
<i>75. Perzentile</i>	34,09	35,15	
<i>fADA positiv</i>	13 (43,3%)	7 (23,3%)	3 (16,7%)
<i>fADA negativ</i>	17 (56,7%)	23 (76,7%)	15 (83,3%)

Von den 19 positiv gemessenen tADA Patient*innen hatte nur 1 Patient*in kontinuierlich therapeutische Infliximabspiegel, 94,7% von denen waren demnach zu mindestens einem ZP subtherapeutisch eingestellt. 8 dieser Patient*innen (42,1%) hatten über den

gesamten Messzeitraum subtherapeutische Infiximabspiegel. Hierbei wurden die 7 Patient*innen, die zuvor nicht mit Infiximab behandelt wurden, eingeschlossen. Eine graphische Darstellung zeigen

Abbildung 9 und Abbildung 10.

Bei den Patient*innen, deren Infiximabkonzentration zu ≥ 1 ZP unterhalb der Nachweisgrenze lag, konnten bei 4/7 (57,0%) tADA und bei 4/7 (57,0%) ebenfalls fADA nachgewiesen werden.

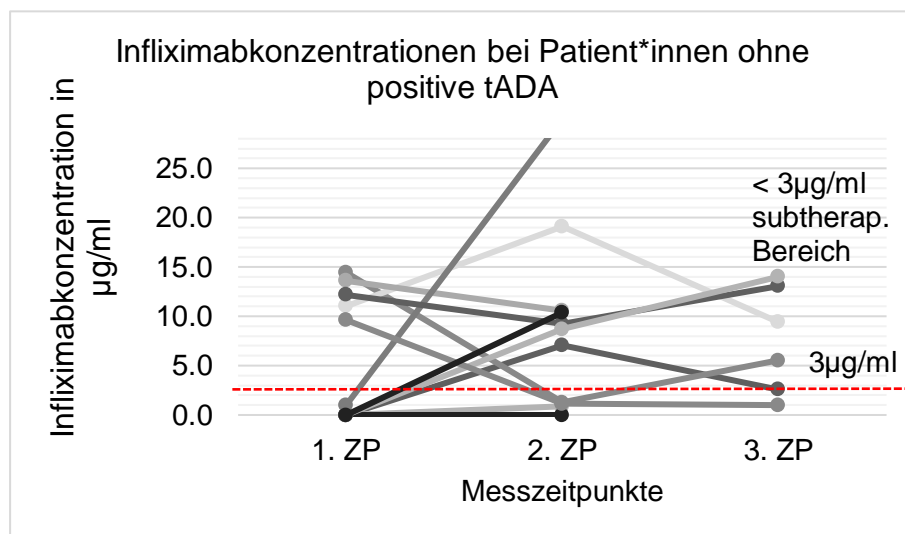


Abbildung 9: Infiximabkonzentrationen in µg/ml im Verlauf bei N=11 Patient*innen ohne tADA (min. 2, max. 3 ZP)

Jede Linie entspricht einem/einer Patient/in. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 3 µg/ml ist gekennzeichnet.

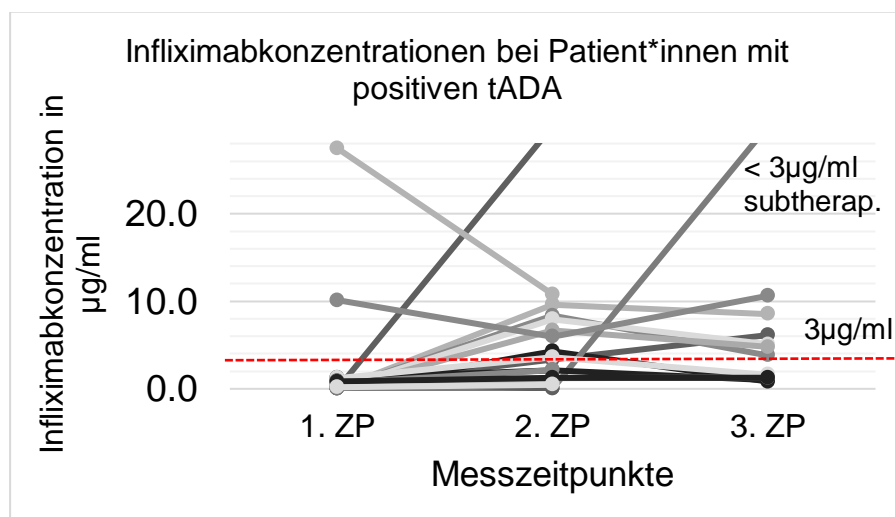


Abbildung 10: Infiximabkonzentrationen in µg/ml im Verlauf bei N=19 Patient*innen mit tADA (min. 2, max. 3 ZP)

Jede Linie entspricht einem/einer Patient/in. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 3 µg/ml ist gekennzeichnet.

Krankheitsaktivität unter Infliximab

Die Krankheitsaktivität der PsA Patient*innen wurde über den DAS-28 ermittelt. In dieser Gruppe überwog der Anteil der Patient*innen, deren Krankheitsaktivität in Remission war. Die Krankheitsaktivität der AS Patient*innen wurde mittels BASDAI ermittelt. Zu allen ZP überwog ebenfalls der Teil der Patient*innen, deren Krankheitsaktivität in Remission lag. Zu 6 Proben fehlten Parameter. Einen exakten Überblick über die Krankheitsaktivität gibt Tabelle 9.

Tabelle 9: Krankheitsaktivität unter Infliximab über die Messzeitpunkte gemessen am BASDAI und DAS-28

	1. ZP	2. ZP	3. ZP
PsA mit erhobenem DAS-28-Wert			
<i>Anzahl</i>	5	5	3
<i>Median</i>	2,1	2,55	2,06
<i>25. Perzentile</i>	0,95	1,97	1,99
<i>75. Perzentile</i>	3,25	3,15	-
<i>Minimum</i>	0,01	1,75	1,99
<i>Maximum</i>	3,96	4,54	2,18
Krankheitsaktivität DAS-28			
<i>Remission (<2,6)</i>	4 (80,0%)	3 (60,0%)	3 (100%)
<i>gering aktiv (>2,6-3,2)</i>			0
<i>moderat aktiv (3,2-5,1)</i>	1 (20,0%)	2 (40,0%)	
<i>hoch (>5,1)</i>			
AS mit erhobenem BASDAI-Wert			
<i>Anzahl</i>	23	23	14
<i>Median</i>	3,5	1,98	2,8
<i>25. Perzentile</i>	1,2	0,43	0,85
<i>75. Perzentile</i>	6,4	3,80	4,84
<i>Minimum</i>	0	0	0
<i>Maximum</i>	7,65	6,43	7,0
Krankheitsaktivität BASDAI			
<i>Remission (<4)</i>	14 (60,9%)	20 (87,6%)	9 (64,3%)
<i>Aktiv (>4)</i>	9 (39,1%)	3 (13,0%)	5 (35,7%)

7.3 Statistische Analyse

7.3.1 Auswirkung von totalen Anti-Drug-Antikörpern auf die korrespondierenden Serumspiegel

Zur Bestätigung unserer Grundannahme wurde eine Korrelation mit Hilfe des Korrelationskoeffizienten (r) nach Spearman zwischen Medikamentenkonzentrationen und Antikörpertiter durchgeführt. Dabei wurden insbesondere die Unterschiede zwischen der Einwirkung von tADA und fADA auf den Medikamentenspiegel untersucht.

Adalimumab:

Es konnte ein schwacher bis mittelstarker Zusammenhang zwischen der Adalimumabkonzentration und dem tADA-Titer hergestellt werden, der sich zum 2. ZP als signifikant herausstellte (1. ZP $r = -0,345$; $p = 0,174$; 2. ZP $r = -0,66$; $p = 0,004$). (siehe Abbildung 11). Wie in Abbildung 12 dargestellt, wurden mittels Mann-Whitney-U-Test in der Gruppe mit positiven tADA niedrigere Adalimumabkonzentrationen als in der Gruppe ohne tADA gemessen (1. ZP $4,5 \mu\text{g/ml}$ versus (vs.) $9,1 \mu\text{g/ml}$; 2. ZP $1,0 \mu\text{g/ml}$ vs. $10,4 \mu\text{g/ml}$). Diese Unterschiede zeigten eine statistische Signifikanz (1. ZP $p = 0,038$; 2. ZP $p = 0,001$).

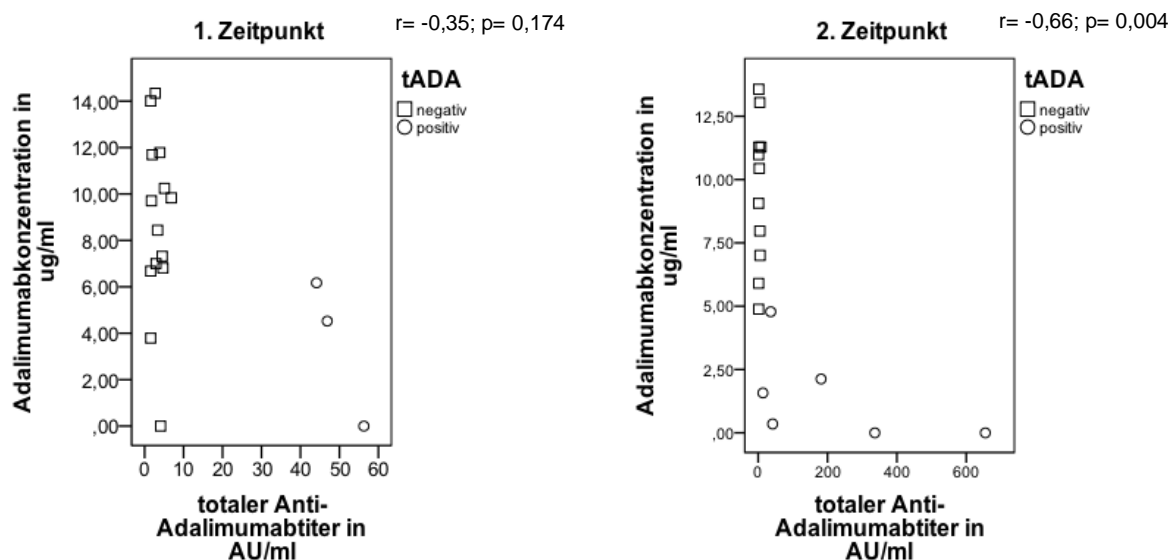


Abbildung 11: Korrelation von Adalimumabkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) mit tADA-Titer (AU/ml) zum 1. und 2. ZP (N= 17)

tADA-positive Proben sind durch einen Kreis markiert, tADA-negative durch ein Quadrat; Korrelation nach Spearman

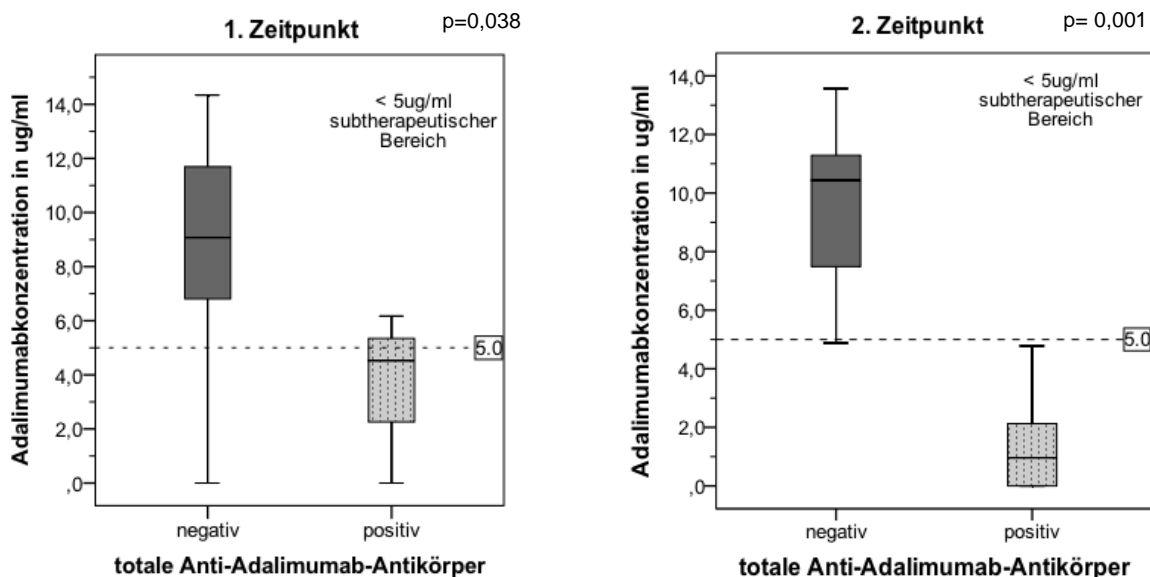


Abbildung 12: Unterschiede der Adalimumabkonzentrationen (µg/ml) bei Patient*innen mit und ohne tADA

Positiv (hellgrau/gemustert), Negativ (dunkelgrau) 1. ZP: positiv/negativ N= 3/14, 2. ZP positiv/negativ N= 6/11. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 5 µg/ml ist gekennzeichnet.; Mann-Whitney-U-Test

Infliximab:

Es konnte ein schwacher Zusammenhang zwischen der Infliximabkonzentration und dem tADA-Titer hergestellt werden, der sich nicht als signifikant herausstellte (1. ZP (N=23) $r= -0,31$ $p= 0,15$; 2. ZP (N=30) $r= -0,31$ $p= 0,1$) (siehe Abbildung 13).

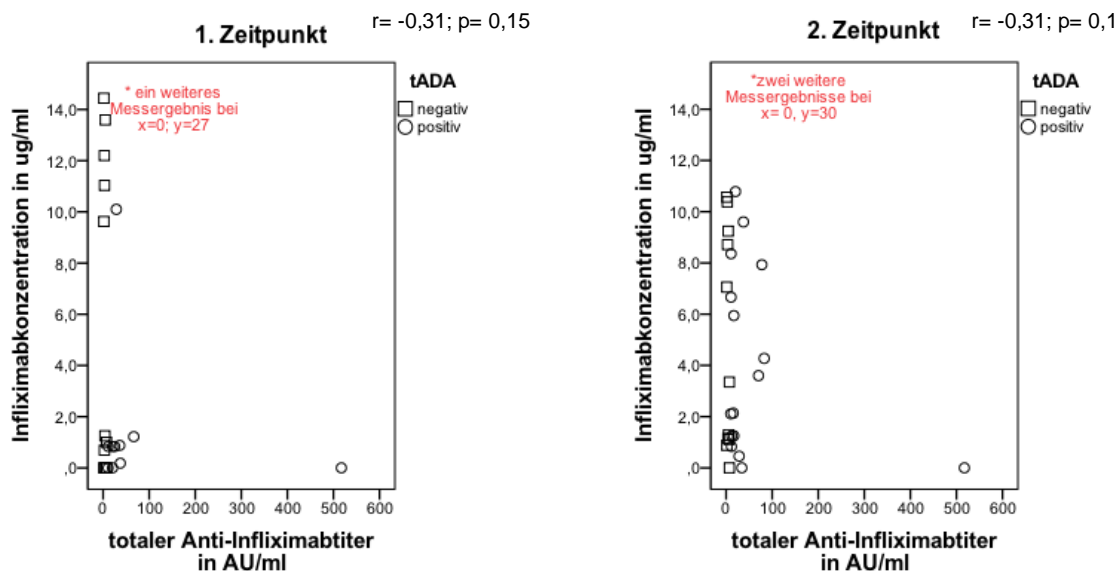


Abbildung 13: Korrelation der Infliximabkonzentration(µg/ml) mit tADA-Titer (AU/ml) zum 1. (N= 23) und 2. (N= 30) ZP

tADA-positive Proben sind durch einen Kreis markiert, tADA-negative durch ein Quadrat; Korrelation nach Spearman

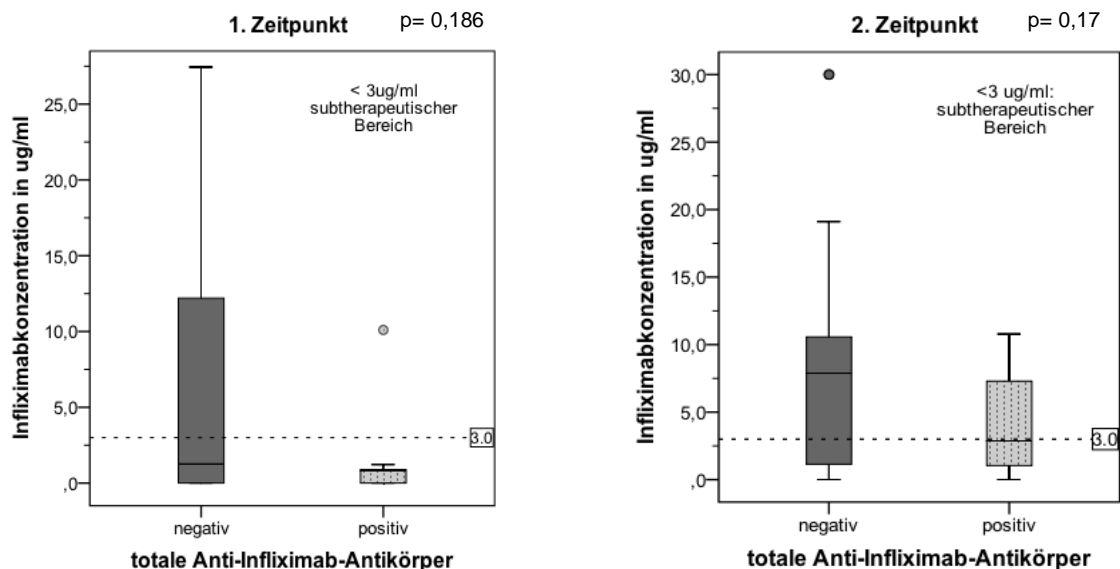


Abbildung 14: Unterschiede der Infiximabkonzentrationen (µg/ml) bei Patient*innen mit und ohne tADA

Positiv (hellgrau/gemustert), Negativ (dunkelgrau) 1. ZP (N=23): positiv/negativ N= 10/13, 2. ZP (N=30) positiv/negativ N= 16/14. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 3 µg/ml ist gekennzeichnet. Ausreißer sind in Form eines Punktes dargestellt; Mann-Whitney-U-Test

Die Mediane der Gruppen mit positiven und negativen tADA für die Infiximabkonzentration betragen zum 1. ZP (N=23) 0,8 µg/ml vs. 1,3 µg/ml und zum 2. ZP (N=30) 2,9 µg/ml vs. 7,9 µg/ml. Sie unterschieden sich im Mann-Whitney-U-Test nicht signifikant voneinander (1. ZP p= 0,186; 2. ZP p= 0,17) (siehe Abbildung 14). Von den 7 Patient*innen, die zum 1. ZP noch nicht wieder mit Infiximab behandelt wurden, konnte bei 1 Person trotzdem ein messbarer Infiximabspiegel festgestellt werden. N=6 Patient*innen (85,7%) hatten zum 1. ZP positive tADA und 5 (71,4%) davon auch positive fADA.

7.3.2 Auswirkung von freien Anti-Drug-Antikörpern auf die korrespondierenden Serumspiegel

Analog zum Vorgehen bei tADA wurde für fADA ebenfalls eine Korrelation nach Spearman vorgenommen und eine Analyse der Medikamentenspiegel in den Untergruppen positive/negative fADA durchgeführt. Im Detail wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Adalimumab

Eine Korrelation wurde aufgrund der geringen Fallzahl nicht durchgeführt.

Bei Patient*innen unter Adalimumab Therapie lag der Adalimumab Median der Gruppe ohne fADA immer über der Gruppe mit positiven fADA. In die Gruppe mit fADA wurden alle Patient*innen eingeschlossen, die zu mindestens einem ZP positive fADA zeigten (N= 2) (1. ZP 7,3 µg/ml vs. 4,2 µg/ml; 2. ZP 8,0 µg/ml vs. 0 µg/ml). Die oben gezeigten Unterschiede waren zum 2. ZP statistisch signifikant (1. ZP $p= 0,332$; 2. ZP $p= 0,025$, Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 15).

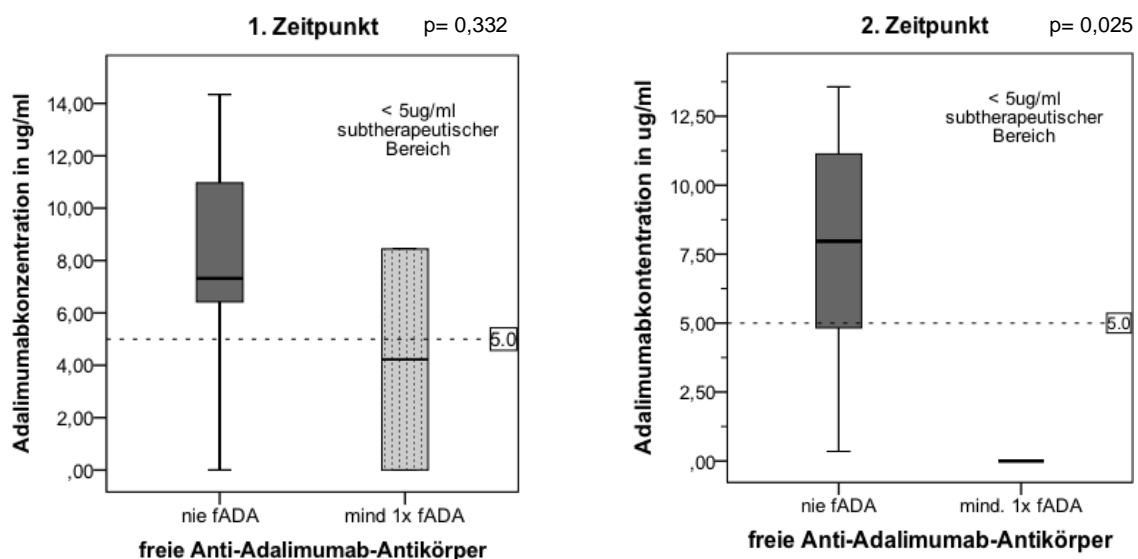


Abbildung 15: Unterschiede der Adalimumabkonzentrationen (µg/ml) bei Patient*innen mit und ohne fADA

Dargestellt sind die Unterschiede in den Adalimumabkonzentrationen in µg/ml zwischen Patient*innen ohne fADA (dunkelgrau) (N= 15) und denen mit mindestens 1x positiven (hellgrau/gemustert) fADA im Messverlauf (N= 2) zum 1. und 2. ZP ermittelt durch den Mann-Whitney-U-Test. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 5 µg/ml ist gekennzeichnet.

Infliximab

Es zeigte sich in der Korrelation nach Spearman ein moderater Zusammenhang zwischen der Infliximabkonzentration und dem fADA-Titer, der zu beiden ZP statistisch signifikant war (1. ZP (N=23) $r= -0,43$ $p= 0,041$, 2. ZP (N=30) $r= -0,51$ $p= 0,004$) (siehe Abbildung 16).

Die Mediane der Gruppen mit positiven und negativen fADA für die Infliximabkonzentrationen betragen zum 1. ZP (N= 23) 0,51 µg/ml vs. 1,25 µg/ml und zum 2. ZP (N=30) 3,3 µg/ml vs. 6,7 µg/ml. Sie unterschieden sich nicht signifikant voneinander (1. ZP $p= 0,88$; 2. ZP $p= 0,14$, Mann-Whitney-U-Test) (siehe Abbildung 17).

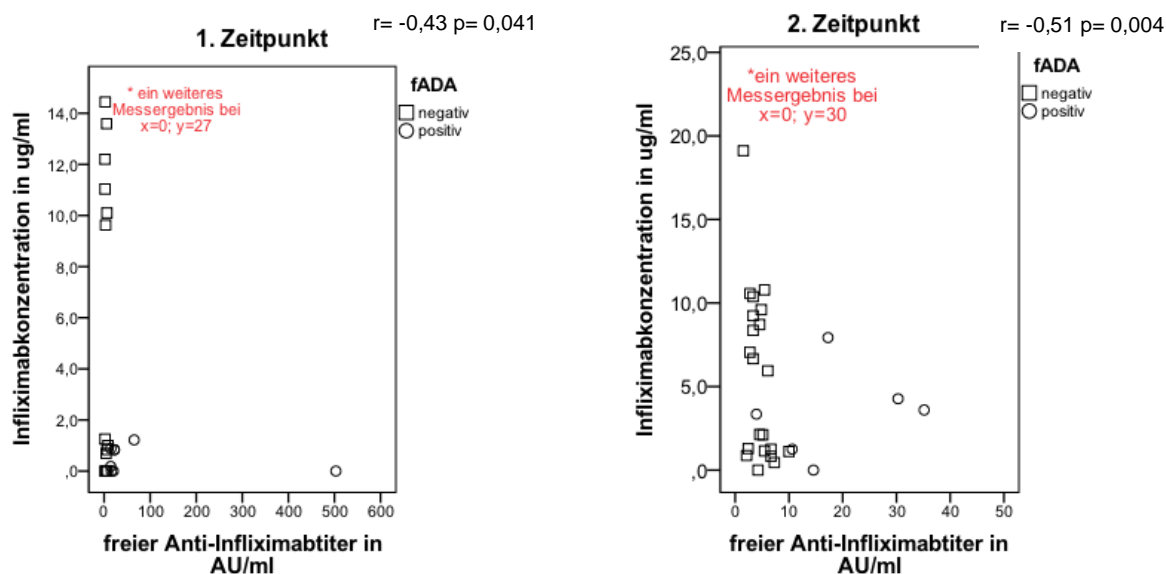


Abbildung 16: Korrelation von Infliximabkonzentration (µg/ml) mit fADA-Titer (AU/ml) zum 1. (N= 23) und 2. (N= 30) ZP

Ergebnisse außerhalb der Skala sind in Rot dargestellt. fADA-positive Proben sind durch einen Kreis markiert, fADA negative durch ein Quadrat.

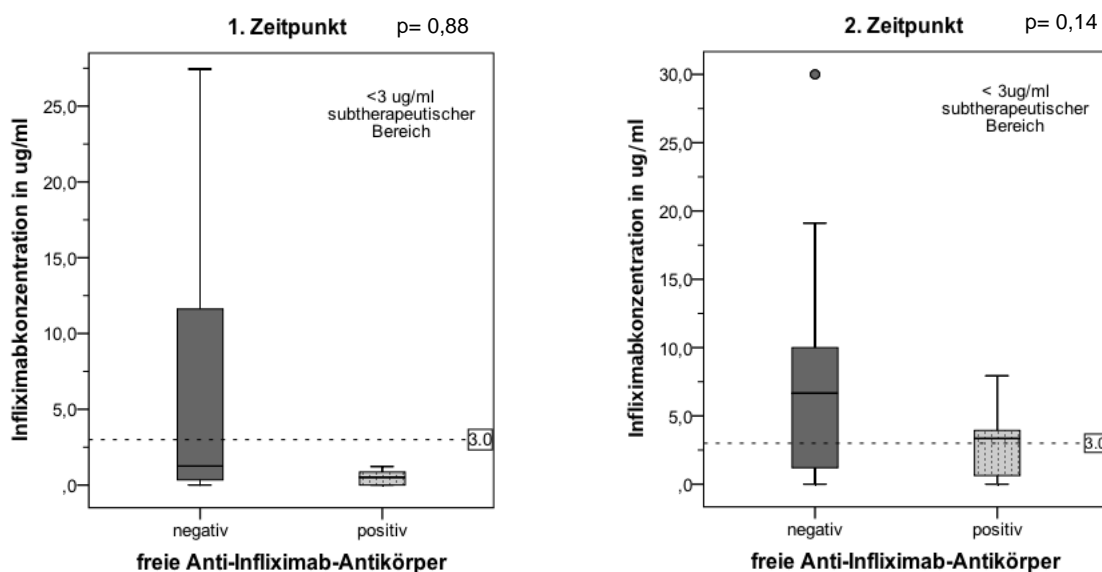


Abbildung 17: Unterschiede der Infliximabkonzentrationen (µg/ml) bei Patient*innen mit und ohne fADA

1. ZP (N=23): positiv/negativ N= 8/15, 2. ZP (N=30) positiv/negativ N= 7/23. Der Übergang zwischen therapeutischem und subtherapeutischem Bereich bei 3 µg/ml ist gekennzeichnet. Zum 2. ZP ist ein Ausreißer in Form eines Punktes dargestellt; Mann-Whitney-U-Test

7.3.3 Auswirkungen der Medikamentenspiegel auf die Krankheitsaktivität

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Medikamentenkonzentration und Krankheitsaktivität herzustellen, wurde zur besseren Beurteilbarkeit zunächst innerhalb einer Medikamentengruppe zwischen DAS-28 und BASDAI unterschieden (siehe Tabelle

10 und Tabelle 11). Da deskriptiv kein Zusammenhang zwischen Median und Krankheitsaktivität festgestellt werden konnte, wurde auf eine anschließende Analyse verzichtet.

Tabelle 10: Adalimumabkonzentrationen (Median in µg/ml mit q25-q75) der jeweiligen Krankheitsaktivitätskategorien gemessen anhand DAS-28 und BASDAI zum 1. und 2. ZP. Zu 1 Probe fehlen Daten

	Adalimumabkonzentration					
	1. ZP			2. ZP		
	Anzahl (N(%))	Median in µg/ml	q25-q75	Anzahl (N(%))	Median in µg/ml	q25-q75
DAS-28						
<i>Remission (<2,6)</i>	6 (50,0%)	7,3	4,3-12,3	6 (46,2%)	3,5	1,3-6,5
<i>gering aktiv (>2,6-3,2)</i>	2 (16,7%)	3,4				
<i>moderat aktiv (3,2-5,1)</i>	4 (33,3%)	6,8	1,7-10,6	7 (53,8%)	8,0	0-13,0
BASDAI						
<i>Remission (<4)</i>	3 (75,0%)	9,8	7,3	3 (75,0%)	10,4	7,0
<i>aktiv (>4)</i>	1 (25,0%)	10,24		1 (25,0%)	10,98	

Tabelle 11: Infliximabkonzentrationen (Median in µg/ml mit q25-q75) der jeweiligen Krankheitsaktivitätskategorien gemessen anhand DAS-28 und BASDAI zum 1.ZP *(N= 23) und 2. ZP. Zu 4 Proben fehlen Daten.

	Infliximabkonzentration					
	1. ZP*			2. ZP		
	Anzahl (N (%))	Median in µg/ml	q25-q75	Anzahl (N (%))	Median in µg/ml	q25-q75
DAS-28						
<i>Remission (<2,6)</i>	4 (80,0%)	0,83	0,2-8,5	3 (60,0%)	8,7	1,3
<i>gering aktiv (>2,6-3,2)</i>	1 (20,0%)	10,1		2 (40,0%)	8,2	6,0
<i>moderat aktiv (3,2-5,1)</i>						
BASDAI						
<i>Remission (<4)</i>	11 (68,7%)	0,83	0-1,2	20 (87,0%)	3,5	1,1-8,3
<i>aktiv (>4)</i>	5 (31,3%)	10,1	0-19,9	3 (13,0%)	10,23	0

7.3.4 Einfluss von totalen und freien Anti-Drug-Antikörpern auf die Krankheitsaktivität

Adalimumab - totale Antikörper:

In der untersuchten Kohorte fand sich kein Zusammenhang zwischen dem Vorhandensein von tADA und der Krankheitsaktivität gemessen am DAS-28. Von den Patient*innen deren Krankheitsaktivität sich in Remission ($<2,6$) befand hatten zum 1. ZP 4 (66,7%) negative und 2 (33,3%) positive tADA. Zum 2.ZP waren 2 (33,3%) negativ und 4 (66,7%) positiv. Gering aktive Erkrankungen wurden ausschließlich zum 1. ZP bei zwei Patient*innen gemessen, die beide tADA negativ waren. In der Gruppe der moderaten Krankheitsaktivität hatten zum 1. ZP 3 Patient*innen (75,0%) negative tADA und 1 Patient*in positive tADA (25,0%). Zum 2. ZP waren 5 Patient*innen tADA negativ (71,4%) und 2 (28,6%) tADA positiv.

Unter getrennter Betrachtung der tADA-positiven und negativen Patient*innen zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Höhe des tADA-Titers und der Krankheitsaktivität. Es wurden aufgrund der Fallzahl nur Proben der Patient*innen ausgewertet, deren Krankheitsaktivität anhand des DAS-28 erhoben wurde.

Adalimumab - freie Antikörper:

Zum 1. ZP wurde bei keiner Person fADA nachgewiesen. Zum 2. ZP war die Krankheitsaktivität der beiden fADA-positiven Patient*innen moderat. Es wurden aufgrund der Fallzahl nur Proben der Patient*innen ausgewertet, deren Krankheitsaktivität anhand des DAS-28 erhoben wurde

Infliximab - totale Antikörper:

In der vorliegenden Kohorte ließ sich zwischen dem Auftreten von positiven tADA und der Krankheitsaktivität gemessen am BASDAI kein eindeutiger Zusammenhang entnehmen. Von den Patient*innen deren Krankheitsaktivität sich in Remission (<4) befand hatten zum 1. ZP 5 (35,7%) negative und 9 (64,3%) positive tADA. Zum 2.ZP waren 9 (45,0%) negativ und 11 (55,0%) positiv. Bei den aktiven Erkrankungen hatten zum 1. ZP 4 (44,4%) negative und 5 (55,6%) positive tADA, zum 2.ZP war 1 (33,3%) Patient*innen tADA negativ und 2 (66,7%) positiv. Zum 1. ZP wurde häufiger eine aktive

Krankheitsaktivität gemessen als zum 2. ZP. Aktive Patient*innen hatten deskriptiv häufiger positive ADA.

Bei gesonderter Betrachtung der Patient*innen mit positiven und negativen tADA und anschließender Unterscheidung in aktive Erkrankung und Remission (BASDAI), zeigte sich deskriptiv, dass die Gruppe mit erhöhter Krankheitsaktivität häufiger mittlere oder hohe tADA-Titer aufwies. Dieser Zusammenhang zeigte sich vor allem zum 2. ZP (siehe Abbildung 18). Die DAS- 28 Gruppe war aufgrund der niedrigen Fallzahl (N= 3) nicht ausreichend zu beurteilen.

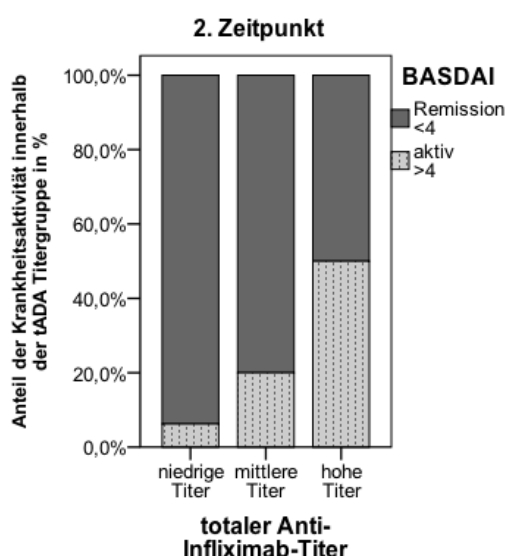


Abbildung 18: Krankheitsaktivität gemessen am BASDAI in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Infliximab
 niedrig= <20 AU/ml, mittel= 20-80 AU/ml, hoch= > 80 AU/ml bei N= 23 Patient*innen

Infliximab - freie Antikörper:

Es konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten von fADA und der Krankheitsaktivität gemessen am BASDAI ermittelt werden. Von den Patient*innen deren Krankheitsaktivität sich in Remission (<4) befand hatten zum 1. ZP 6 (42,9%) negative und 8 (57,1%) positive fADA. Zum 2.ZP waren 15 (75,0%) negativ und 5 (25,0%) positiv. Bei den aktiven Erkrankungen hatten zum 1. ZP 5 (55,6%) negative und 4 (44,4%) positive fADA, zum 2.ZP waren 2 (66,7%) Patient*innen fADA negativ und 1 (33,3%) positiv. Die DAS- 28 Gruppe war aufgrund der niedrigen Fallzahl (N= 3) nicht ausreichend zu beurteilen

7.3.5 Prävalenz von Anti-Drug-Antikörpern bei den unterschiedlichen Krankheitsbildern

Im Folgenden wurden die Adalimumab- und Infliximabkohorte in die Untergruppen der verschiedenen Diagnosen unterteilt. Unter Adalimumab traten generell weniger ADA auf als unter Infliximab. Da sich die Fallzahlen zwischen den einzelnen Krankheitsbildern stark unterscheiden, konnte nur eine deskriptive Beurteilung vorgenommen werden. Auffällig war, dass in beiden Medikamentengruppen PsA Patient*innen ADA entwickelten und die Prävalenz der ADA bei AS Patient*innen unter Infliximab zeitweise über 50% war. Diese Beobachtungen waren alle statistisch in der vorliegenden Kohorte nicht signifikant ($p > 0,05$, Chi-Quadrat-Test) (siehe Tabelle 12 und Tabelle 13).

Tabelle 12: tADA/fADA - Prävalenz der Krankheitsbilder bei Patient*innen unter Adalimumab

Adalimumab					
		1. ZP		2.ZP	
	Anzahl (N)	tADA positiv	fADA positiv	tADA positiv	fADA positiv
RA	10	2 (20,0%)	0	4 (40,0%)	1 (10,0%)
PsA	3	1 (33,0%)		2 (66,7%)	1 (33,3%)
AS	4	0	0	0	0

Tabelle 13: tADA/fADA- Prävalenz der Krankheitsbilder bei Patient*innen unter Infliximab

Infliximab					
		1. ZP		2.ZP	
	Anzahl (N)	tADA positiv	fADA positiv	tADA positiv	fADA positiv
PsA	6	2 (33,3%),	1 (16,7%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)
AS	24	14 (58,3%)	12 (50,0%)	13 (54,2%)	6 (25%)

7.3.6 Vergleich der Prävalenz von Anti-Drug-Antikörpern zwischen Adalimumab und Infliximab

Totale Antikörper:

Beim Vergleich der tADA-Prävalenz zwischen der Adalimumab- und Infliximab-Kohorte war die ADA-Prävalenz der Infliximabgruppe gegenüber Adalimumab erhöht. Zum 1. ZP betrug der Anteil der Patient*innen mit positiven tADA in der Adalimumab Gruppe 17,6% (N=3). In der Infliximab Gruppe waren es 53,3% (N=16). Dieser Unterschied war

statistisch signifikant (χ^2 -p-Wert= 0,017). Zum 2. ZP blieb der oben gezeigte Trend bestehen. Der Anteil mit positiven tADA machte in der Adalimumab Gruppe einen geringeren Anteil aus als in der Infliximab Gruppe (35,3% (N=6) vs. 53,3% (N=16)). Jedoch ließ sich keine statistische Signifikanz mehr feststellen (χ^2 -p-Wert= 0,193) (siehe Abbildung 19).

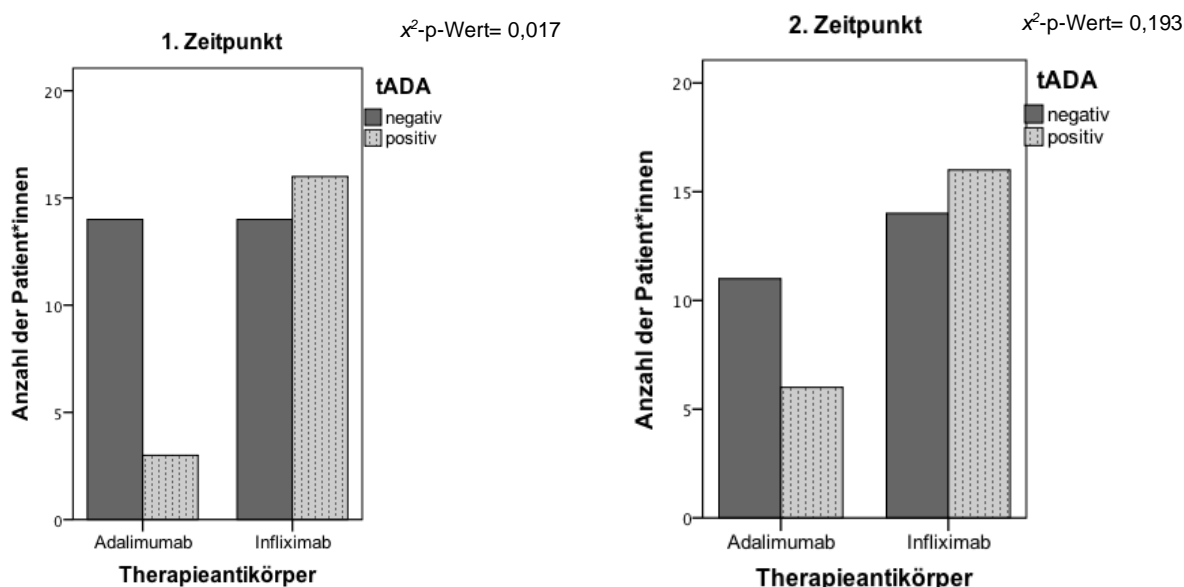


Abbildung 19 Unterschiede in der tADA-Prävalenz bei Adalimumab (N=17) und Infliximab (N=30) 1. und 2. ZP (Chi-Quadrat-Test)

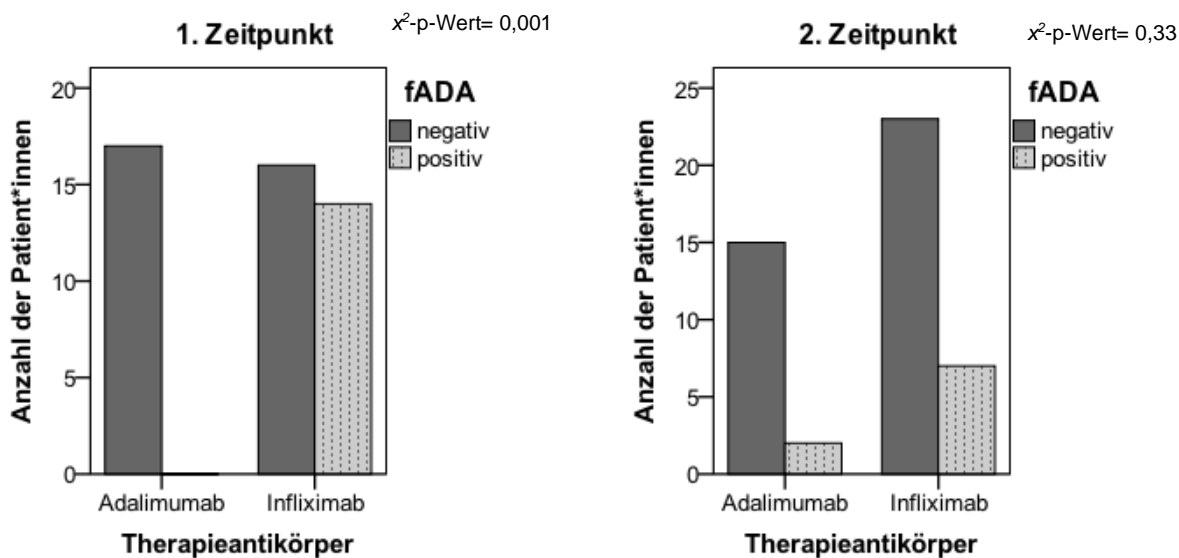


Abbildung 20: Unterschiede in der fADA-Prävalenz bei Adalimumab (N=17) und Infliximab (N=30) 1. und 2. ZP (Chi-Quadrat-Test)

Freie Antikörper:

Der oben beschriebene Unterschied in der Antikörperformation unter Adalimumab und Infliximab war hinsichtlich der fADA-Prävalenz noch stärker ausgeprägt.

Zum 1. ZP war der Anteil der Patient*innen mit positiven fADA in der Adalimumab Gruppe 0%, in der Infliximab Gruppe waren es 43,3% (N=13). Dieser Unterschied war statistisch signifikant (χ^2 -p-Wert= 0,001). Zum 2. ZP blieb der oben gezeigte Trend bestehen. Der Anteil mit positiven fADA machte in der Adalimumab Gruppe einen geringeren Anteil aus als in der Infliximab Gruppe (11,8% (N=2) vs. 23,3% (N=7)). Jedoch ließ sich keine statistische Relevanz mehr feststellen (χ^2 -p-Wert= 0,33) (siehe Abbildung 20).

Die fADA-positiven Proben wurden detaillierter auf die Höhe des tADA-Titers untersucht. Der tADA-Spiegel wurden anhand der AU/ml in niedrige (<20), mittlere (20-80) und hohe (>80) Spiegel eingeteilt. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, traten unter Adalimumab zum 2. ZP Patient*innen mit hohem tADA-Titer zu 66,7% auch fADA auf. Bei mittleren und niedrigen Titern von tADA gegen Adalimumab wurden in dieser Analyse keine fADA gemessen. Bei einem hohen Titer hatten 100% der Infliximabpatient*innen auch fADA, bei einem niedrigen Titer nur 22,2%. Die meisten fADA-positiven Patient*innen unter Infliximab hatten moderate bis hohe tADA Spiegel. In der niedrigen tADA Gruppe gegen Infliximab hatten 22,2% auch fADA (siehe Abbildung 22).

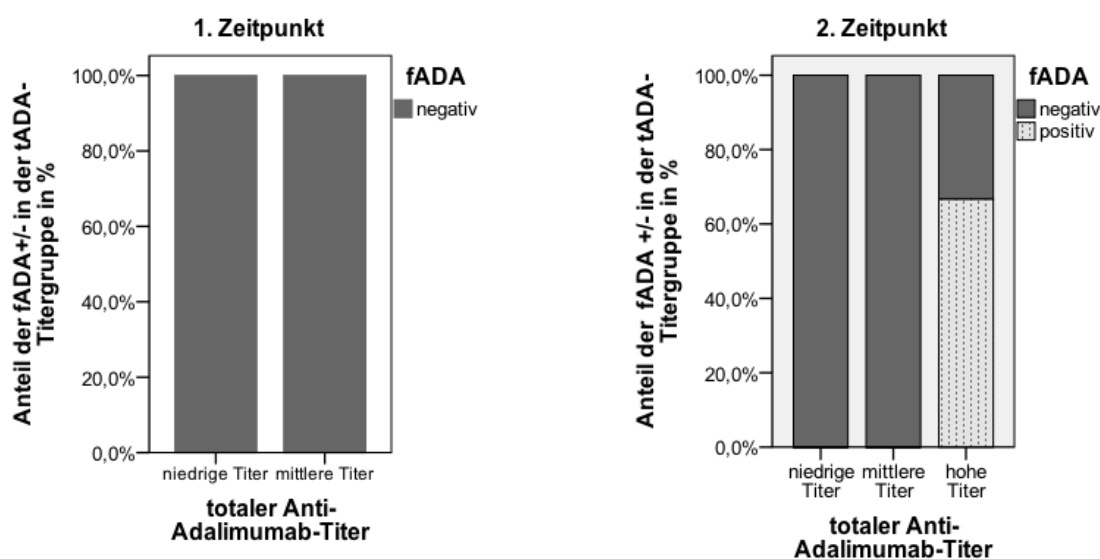


Abbildung 21: fADA in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Adalimumab

1. ZP N= 0/3, 2. ZP N= 2/6 (niedrig= <20 AU/ml, mittel= 20-80 AU/ml, hoch= > 80 AU/ml)

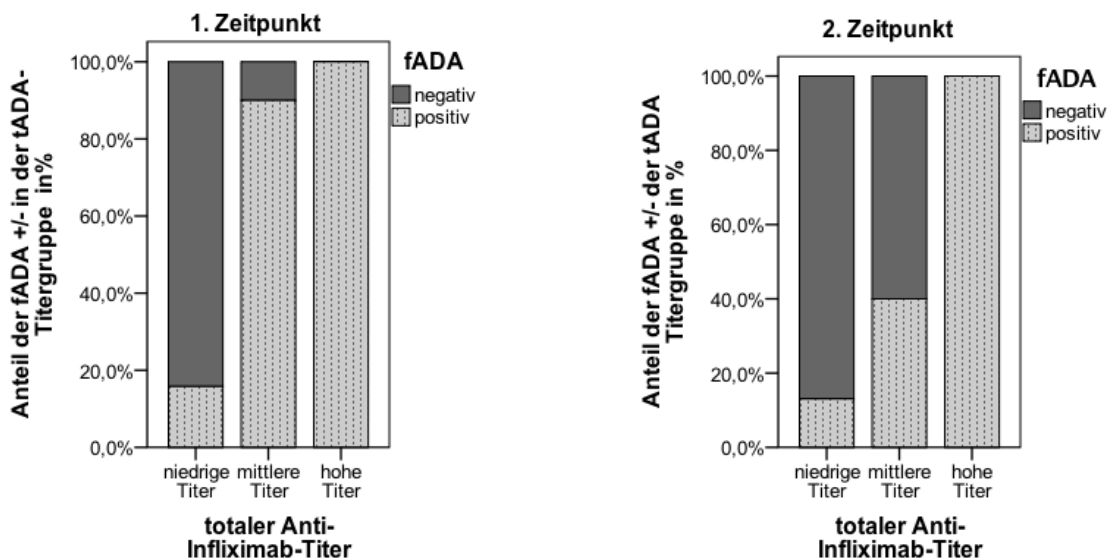


Abbildung 22: fADA in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Infliximab

1. ZP N= 16, 2. ZP N= 16 (niedrig= <20 AU/ml, mittel= 20-80 AU/ml, hoch= > 80 AU/ml)

7.3.7 Einfluss von einer Kombinationstherapie mit einem konventionellen DMARD auf die totale und freie Anti-Drug-Antikörper und Produktion

Bei beiden Medikamenten zeigte sich deskriptiv und analytisch mittels exaktem χ^2 -Test nach Fisher kein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Auftreten von tADA und fADA und der Kombinationstherapie mit einem cDMARD (siehe Tabelle 14 und Tabelle 15). Die Höhe des ADA-Titer Median wurde mittels Mann-Whitney-U-Test zwischen Patient*innen mit und ohne cDMARD“ untersucht. In der Infliximab Gruppe lag der Median des ADA-Titers der Patient*innen mit cDMARD Therapie sowohl bei tADA als auch bei fADA immer leicht über dem, der Patient*innen ohne cDMARD-Therapie. In der Adalimumab Gruppe zeigte sich kein eindeutiger Zusammenhang.

Adalimumab: **tADA** 1. ZP 50,20 AU/ml vs. 46,86 AU/ml, $p=1,0$; 2. ZP 38,92 AU/ml vs. 258,92 AU/ml, $p=0,355$; **fADA** 1. ZP keine Fälle, 2. ZP. 687,69 AU/ml vs. 25,77 AU/ml $p=0,317$.

Infliximab: **tADA** 1. ZP 29,31 AU/ml vs. 20,34 AU/ml, $p=0,263$; 2. ZP 27,15 AU/ml vs. 18,53 AU/ml, $p=0,480$; **fADA** 1. ZP 17,87 AU/ml vs. 17,27 AU/ml, $p=0,558$; 2. ZP 35,15 AU/ml vs. 15,90 AU/ml $p= 0,48$. Es lag keine statistische Signifikanz vor.

Tabelle 14: cDMARD-Therapie bei Patient*innen unter Adalimumab

Dargestellt ist das Auftreten von tADA und fADA unter Adalimumab im Zusammenhang mit einer begleitenden cDMARD Therapie zum 1. und 2. ZP bei N=17 Patient*innen. P-Wert 2-seitig

	cDMARD-Therapie Adalimumab				exakter χ^2 -p-Wert
	ja		nein		
	positiv	negativ	positiv	negativ	
tADA 1. ZP	2 (11,8%)	7 (41,2%)	1 (5,9%)	7 (41,2%)	1,0
tADA 2. ZP	4 (23,5%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)	6 (35,3%)	0,6
fADA 1. ZP		8 (47,1%)		9 (52,9%)	
fADA 2. ZP	1 (5,9%)	8 (47,1%)	1 (5,9%)	7 (41,2%)	1,0

Tabelle 15: cDMARD Therapie bei Patient*innen unter Infliximab

Dargestellt ist das Auftreten von tADA und fADA unter Infliximab im Zusammenhang mit einer begleitenden cDMARD Therapie zum 1. und 2. ZP bei N=30 Patient*innen. P-Wert 2-seitig

	cDMARD-Therapie Infliximab				exakter χ^2 -p-Wert
	ja		nein		
	positiv	negativ	positiv	negativ	
tADA 1. ZP	6 (20,0%)	5 (16,7%)	10 (33,3%)	9 (30,0%)	1,0
tADA 2. ZP	6 (20,0%)	5 (16,7%)	10 (33,3%)	9 (30,0%)	1,0
fADA 1. ZP	5 (16,7%)	6 (20,0%)	8 (26,7%)	11 (36,7%)	1,0
fADA 2. ZP	3 (10,0%)	8 (26,7%)	4 (13,3%)	15 (50,0%)	1,0

7.4 Vergleich der verschiedenen Assays zur Erhebung der Medikamentenkonzentration

Es wurde untersucht, ob die verwendeten Assays zum Nachweis von Adalimumab und Infliximab der Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande) und Immundiagnostik AG (Bensheim, Deutschland) Abweichungen zwischen den erhobenen Werten aufwiesen. In der Korrelationsanalyse nach Spearman wurde bei Adalimumab eine gute bis hohe Übereinstimmung, bei Infliximab zu beiden ZP eine sehr hohe Übereinstimmung zwischen den beiden Messreihen festgestellt. Einen detaillierten Überblick über die erhobenen Unterschiede zwischen den beiden Herstellern bietet Tabelle 16.

Tabelle 16: Interassay Varianz zwischen den Assays zur Erfassung Therapieantikörperkonzentration

Hersteller Sanquin und Immundiagnostik. ID: Immundiagnostik, S: Sanquin, r: Korrelationskoeffizient nach Spearman, p= P-Wert, * das Ergebnis war auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig). Die subtherapeutische Konzentration für Adalimumab beträgt <5 (µg/ml und für Infliximab <3 (µg/ml. Darüber liegende Konzentrationen werden als therapeutisch angesehen.

	Adalimumab				Infliximab			
	ID	S	r	p	ID	S	r	p
1. ZP			0,672*	0,003			0,790	0,000*
Median (µg/ml)	7,3	4,3			0,54	1,12		
Subtherap. Konz. (N)	4	12			23	24		
Therap. Konz. (N)	13	5			7	6		
2. ZP			0,909*	0,000			0,960	0,000*
Median (µg/ml)	7,0	4,2			4,0	7,6		
Subtherap. Konz. (N)	7	9			13	12		
Therap. Konz. (N)	10	8			17	18		

7.5 Anti-Drug-Antikörper-assoziierte Nebenwirkungen

Es gab keine klinischen Hinweise, die auf Infusions- oder Injektionsreaktionen bei ADA-positiven Patient*innen hingewiesen haben. Insbesondere wurden keine allergischen Reaktionen, sowie auch keine sonstigen Nebenwirkungen beobachtet, die in Assoziation mit dem Auftreten von ADA gebracht werden können.

8 Diskussion

Die TNF- α -Inhibitoren Adalimumab und Infliximab können zur Remissionsinduktion und anhaltender Remission chronisch-rheumatischer Erkrankungen führen¹¹⁵. Jedoch zeigen diese Medikamente bei einem nicht zu vernachlässigenden Anteil an Patient*innen keine ausreichende Wirkung^{1,2,116}. Eine mögliche Erklärung für das fehlende Therapieansprechen wird in der Immunogenität von Biologika und der damit einhergehenden Bildung von ADA gesehen. Die durchgeführte Studie untersuchte Nachweismethoden für Medikamentenspiegel und ADA gegen Adalimumab und Infliximab auf deren Wechselwirkungen und Effekte. Es wurden ADA durch zwei verschiedene Messverfahren ermittelt. Folgende Resultate hinsichtlich Klinik, Krankheitsbilder, immunogenen Eigenschaften und Nachweisverfahren konnten dabei gemäß der Arbeitshypothesen ermittelt werden:

- *Die vorliegenden Ergebnisse zeigten einen Zusammenhang zwischen der Höhe des tADA-Titers und der Krankheitsaktivität unter Infliximab. Bei der Therapie mit Adalimumab konnte kein Zusammenhang zwischen Krankheitsaktivität und ADA-Auftreten beobachtet werden. Zwischen der Medikamentenkonzentration und der Krankheitsaktivität bestand bei beiden Medikamenten kein Zusammenhang. Das Auftreten von ADA war nicht mit Infusionsreaktionen oder anderen ADA-assoziierten Nebenwirkungen assoziiert.*
- *Zwischen den verschiedenen Krankheitsbildern zeigte sich keine eindeutige Verteilung der ADA-Prävalenz. Diese variierte sowohl zwischen den Krankheitsbildern als auch den Medikamenten.*
- *Unter Adalimumab war die ADA-Prävalenz gegenüber der von Infliximab geringer.*
- *Die Messergebnisse zwischen den verschiedenen Nachweismethoden variierten zwischen den Assays zum Nachweis von ADA (tADA/fADA). Zwischen den Messergebnissen zum Nachweis des Serumspiegels von Adalimumab/Infliximab bestand zwischen den beiden untersuchten Assays bei gleichem Messverfahren eine hohe Interassay Übereinstimmung.*

Im Folgenden werden die erzielten Ergebnisse mit der aktuellen Studienlage verglichen und eventuelle Abweichungen diskutiert. Weiter wird der aktuelle Stand der Wissenschaft

hinsichtlich eines therapeutischen TDM von chronisch-rheumatischen Erkrankungen dargestellt. Basierend auf den allgemeinen Empfehlungen und den durch die Analyse erzielten Ergebnissen soll diskutiert werden, welche Besonderheiten und Herausforderungen im klinischen Alltag auftreten können und ob ein TDM unter diesen Umständen empfehlenswert ist.

8.1 Anti-Drug-Antikörper beeinflussen den Serumspiegel der Therapieantikörper

Wir konnten bei 41,2% der Adalimumabpatient*innen und 66,7% der Infliximabpatient*innen zu ≥ 1 ZP erniedrigte Serumspiegel feststellen. Bei allen Patient*innen, bei denen die Adalimumabkonzentration unterhalb der Nachweisgrenze lag, traten tADA und bei 66,7% dieser Patient*innen ebenfalls fADA auf. Unter Infliximab traten bei den Patient*innen mit Serumspiegeln unterhalb der Nachweisgrenze zu 57,0% sowohl tADA als auch fADA auf. In unserer Studie bestätigte sich, dass das Auftreten von ADA mehrheitlich mit erniedrigten korrespondierenden Serumspiegeln der Therapieantikörper assoziiert ist. Diese Annahme wurde zuvor in vielen Studien beschrieben ^{4,5,58,62,66}. Es gab jedoch auch Ausnahmen, bei denen ein Abfall der Medikamentenkonzentration bei Auftreten von tADA ausblieb.

Zwischen den beiden untersuchten Messzeitpunkten ließen sich Unterschiede feststellen. 33,3% der Infliximab-Patient*innen hatten über den gesamten Messzeitraum positive tADA. Die fADA-Prävalenz war zum 1. ZP höher als zum 2. ZP was für ein transientes Auftreten spricht. Unter Adalimumab konnten tADA nur bei 1 Patient*in kontinuierlich nachgewiesen werden. Ein transientes Auftreten von ADA wurde von einem Autor*innenteam beschrieben ⁵⁹.

Ein weiteres interessantes Ergebnis unserer Studie war, dass die Subgruppe der 7 Patient*innen vor der Wiederbehandlung mit Infliximab auf die Persistenz von Antikörpern getestet wurden, wobei sich in 6/7 Proben tADA und in 5/7 auch fADA nachweisen ließen. In einer Probe konnten persistierende Infliximab-Spiegel nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit von Infliximab wird mit 7-12 Tagen angegeben, so dass der persistierende Nachweis in dieser Probe am ehesten als ein falsch-positives Ergebnis gewertet werden muss ^{3,26}. Ein mehrheitlicher Abbau von ADA innerhalb eines Jahres wurde von einer Arbeitsgruppe beschrieben, die Patient*innen nach der Unterbrechung der Infliximabtherapie beobachtet haben ¹¹⁷. Das Autor*innenteam verwendete ein eigens

entwickeltes antihuman lambda-chain Assays (AHLC). Diese Beobachtungen stehen im Kontrast zu den Erkenntnissen von van Schouwenburg und zu unseren Ergebnissen. Derzeit gibt es wenige Langzeitstudien, die den Abbau von ADA beobachten. Vertiefende Studien werden auf diesem Gebiet für ein besseres Verständnis notwendig sein. Basierend auf diesen Beobachtungen könnte angenommen werden, dass Hinweise auf persistierende ADA keine Kontraindikation für den Wiederbeginn der Behandlung mit Infliximab sind, was von Ben-Horin *et al.* 2012 ebenfalls beschrieben wurde ¹¹⁷.

8.2 Klinische Wirksamkeit im Zusammenhang mit Anti-Drug-Antikörpern und Therapieantikörperspiegeln

Wir stellten keinen Einfluss der Medikamentenspiegel auf die Krankheitsaktivität fest. In der Literatur wird hingegen ein eindeutiger Zusammenhang zwischen dem Medikamentenspiegel und der Krankheitsaktivität angegeben ⁵. Patient*innen ohne EULAR/ASAS-Therapieansprechen hatten signifikant niedrigere Antikörperserumspiegel als Patient*innen mit gutem Therapieansprechen sowie moderatem Ansprechen ^{4,53}.

Im Gegensatz dazu konnte festgestellt werden, dass das Auftreten von ADA bei Infliximabtherapie mit der Krankheitsaktivität korreliert. In unserer Kohorte hatten Patient*innen unter Infliximab mit hohen ADA-Titern eine höhere Krankheitsaktivität als mit niedrigeren ADA-Titern. Unter Adalimumab konnte kein Zusammenhang zwischen der Krankheitsaktivität und dem ADA-Titer festgestellt werden. Es war jedoch auffällig, dass bei über 50% der Infliximabpatient*innen Krankheitsaktivität in Remission bei gleichzeitig positiven tADA gemessen wurden. Laut Studienlage geht das Auftreten von ADA mit einer Zunahme der Krankheitsaktivität und dadurch mit einem verminderten Therapieansprechen einher. Das EULAR-Therapieansprechen von Patient*innen mit ADA ist signifikant schlechter als ohne ADA ^{4,5,54,58}. Gleiches gilt für AS-Patient*innen, deren Therapieansprechen durch das Assessment of SpondyloArthritis (ASAS) erhoben wird ⁵³.

Van Schouwenburg *et al.* 2013. formulierten die Hypothese, dass geringe Level von ADA in Komplexen das klinische Wirkansprechen nicht beeinflussen würden, was möglicherweise die von uns erhobene hohe Prävalenz von ADA bei den Remissionspatient*innen erklären könnte ⁷³. Diese Studie wurde jedoch bei Adalimumab

und nicht bei Infliximabpatient*innen durchgeführt. Im Gegensatz dazu fanden andere Arbeitsgruppen, dass ein Auftreten von ADA mit einer Zunahme der Krankheitsaktivität und dadurch mit einem vermindertem Therapieansprechen einher geht ^{4,5,53,54,58}. Diese Studien verwendeten alle einen ABT-Assay, die teilweise auch ADA vom IgG4-Typ erfasst haben. Eine vollständige Erfassung von Komplex-gebundenen ADA war jedoch nicht möglich.

Die Einschlusskriterien für unsere Studie waren weit gefasst, um einen repräsentativen klinischen Alltag abzubilden. In randomisiert kontrollierten Studien (RCT) sind die Einschlussbedingungen hingegen strenger und es kommt häufiger zu einem Selektionsbias. Oft muss der DAS-28 zur Baseline mindestens $> 3,2$ betragen ¹¹⁸, was bei uns keine Voraussetzung darstellte. Bei vielen Patient*innen waren bereits zum ZP der ersten Messung in Remission, die sich teilweise auch nicht über die Messzeitpunkte hinweg veränderte. Aufgrund dieser Unterschiede können unsere Messergebnisse von der Studienlage abweichen. Weiter sind die Scores zur Erhebung der Krankheitsaktivität größtenteils subjektiv, vor allem der BASDAI. Außerdem sind Langzeitbeobachtungen im Gegensatz zu kurzen Studienzeiträumen von wenigen Wochen bis Monaten selten ⁸⁸. Die anti-TNF Therapie bestand bei unseren Patient*innen seit mehreren Jahren, wohingegen die RCT-Studienteilnehmer*innen überwiegend TNF- α -Blocker naiv sind. Deshalb wurde bei uns nicht der kurze TNF-naive Zustand beobachtet, in dem laut Studien Veränderungen mit der höchsten Wahrscheinlichkeit auftreten, sondern ein bereits über lange Zeit bestehender Zustand ^{57,61,64}. Zusätzlich erheben Studien nicht die jeweilige Krankheitsaktivität, sondern das EULAR-Therapieansprechen und verwenden Assays, die keine ADA in Komplexen nachweisen ^{62,66,96,99}. Demnach ist ein direkter Vergleich mit den Literaturergebnissen erschwert.

8.3 Immunogenität bei chronisch-inflammatorischen Krankheitsbilder

Es wurden keine eindeutigen ADA-Prävalenzverteilungen innerhalb der verschiedenen Krankheitsbilder beobachtet. Die in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse variieren stark, weshalb sich bei keinem einzelnen Krankheitsbild besonders häufig ADA nachweisen lassen (siehe Tabelle 17).

Tabelle 17: ADA-Prävalenz in Metaanalysen

Dargestellt ist die ADA-Prävalenz bei ausgewählten chronisch-entzündlichen Krankheitsbildern unter Adalimumab und Infliximab in Metaanalysen mit Angaben der Anzahl der ausgewerteten Studien.

Krankheitsbild	N (Studienanzahl)	Medikament	% ADA	Referenz
RA	10	Adalimumab	25%	Thomas <i>et al.</i> 2015 ¹¹⁹
	33	Adalimumab	0-51%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	5	Adalimumab	12-44%	Kriekaert <i>et al.</i> 2010 ⁷⁹
	16	Infliximab	33%	Thomas <i>et al.</i> 2015 ¹¹⁹
	48	Infliximab	8-62%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	5	Infliximab	8-52%	Kriekaert <i>et al.</i> 2010 ⁷⁹
AS	2	Adalimumab	38%	Thomas <i>et al.</i> 2015 ¹¹⁹
	9	Adalimumab	8-39%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	4	Adalimumab	31%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	1	Adalimumab	31%	Kriekaert <i>et al.</i> 2010 ⁷⁹
	10	Infliximab	6-69%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	1	Infliximab	29%	Kriekaert <i>et al.</i> 2010 ⁷⁹
PsA	8	Adalimumab	0-54%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰
	1	Adalimumab	18%	Kriekaert <i>et al.</i> 2010 ⁷⁹
	3	Infliximab	15-33%	Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰

Bei der Auswertung der Metaanalysen traten bei der RA etwas häufiger ADA auf als bei der AS (siehe Tabelle 17). Für PsA sind nur wenige Daten vorhanden und ein eindeutiger Vergleich deshalb erschwert. Auch in unserer Analyse ließen sich keine eindeutigen Trends zur unterschiedlichen Prävalenz der ADA bei den verschiedenen Krankheitsbildern finden (wobei die kleine Kohortengröße als Limitation gesehen werden kann). Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse können diese nur begrenzt mit der Literatur verglichen werden. Starke Prävalenzunterschiede wie in unserem Fall bei den AS-Patient*innen zwischen den jeweiligen Therapien werden in der Literatur nicht beschrieben (siehe Tabelle 17).

Ein wichtiger Einflussfaktor auf die Produktion von ADA ist die Kombinationstherapie mit MTX, welche bei RA Patient*innen häufig und bei AS Patient*innen eher selten Teil des Therapieschemas ist^{39,95}. Die aktuellen S2-Leitlinien für die RA (Stand 2018) sehen vor, dass Patient*innen, bei denen erstmals die Diagnose einer RA gestellt wurde, zügig mit einem cDMARD behandelt werden sollten, selbst bei früher Arthritis mit Verdacht auf RA kann mit einer cDMARD-Therapie begonnen werden, um eine schnelle Remissionsinduktion zu erreichen^{30,38}. In der Therapie der AS scheinen cDMARDs erfolglos zu sein, weshalb eine Kombinationstherapie mit cDMARDs laut Leitlinien nicht primär empfohlen wird¹²¹. Bei der PsA kann MTX begleitend verabreicht werden, der

Nutzen ist aber weniger gut untersucht als bei der RA ¹²². In der Literatur ist eine verminderte ADA-Prävalenz unter begleitender cDMARD Therapie beschrieben ^{78,79}. In der von uns untersuchten Kohorte zeigte die begleitende Therapie mit cDMARDs keinen eindeutigen Einfluss auf die ADA-Produktion. ADA traten sowohl unter anti-TNF-Monotherapie als auch unter Kombinationstherapie mit einem cDMARD auf, die in unserer Kohorte bei jedem der drei Krankheitsbilder eingesetzt wurden. Der ADA-Titer von Patient*innen unter einer Kombinationstherapie mit Infliximab und cDMARD lag deskriptiv über dem der Kontrollgruppe mit Infliximab Monotherapie.

Das „Drug Survival“ (Therapietreue eines Medikamentes), ist sowohl für Infliximab als auch für Adalimumab bei der AS höher als bei der RA, trotz geringerem Einsatz einer immunmodulierenden Kombinationstherapie ¹²³. Die Unterschiede in der ADA-Produktion bei der AS verglichen mit der RA können mit der Entzündungsaktivität der einzelnen Erkrankungen in Zusammenhang gebracht werden. Die Autoren spekulieren, dass bei der AS der immunsupprimierende Effekt der TNF-Inhibitoren eher allein ausreichend ist, eine Immunreaktion gegen das Therapeutikum vorzubeugen, wohin gegen bei der RA das entzündliche Zytokinmilieu eine ADA-Produktion begünstigt ¹.

8.4 Immunogenität von Adalimumab und Infliximab

Eine der wichtigsten Feststellung war, dass die ADA-Entstehung unter Adalimumab geringer war als unter Infliximab. In der Adalimumab-Kohorte entwickelten 41,2% der Patient*innen zu mindestens einem Messzeitpunkt nachweisbare tADA, in der Infliximab-Gruppe waren es 63,3%. Insbesondere fADA traten unter Adalimumab nur in 4,5% der Proben auf (3/66 $\hat{=}$ N=2 Patient*innen), unter Infliximab waren es 29,1% (23/79 $\hat{=}$ N=13 Patient*innen). Laut Studienlage treten bei Patient*innen, die mit Infliximab behandelt wurden, häufiger ADA auf als unter Adalimumab-Therapie, auch wenn die Prävalenz zwischen den Studien variiert. Es wird über eine verstärkte immunogene Reaktion von Infliximab aufgrund der chimären Antikörperstruktur berichtet ^{2,54,64,119,120}.

Tabelle 18: ADA-Prävalenz bei Adalimumab und Infliximab in Metaanalysen

Metaanalyse	TNF- α -Inhibitor	ADA-Prävalenz
Vincent <i>et al.</i> 2013 ²	Adalimumab	0,04-87%
	Infliximab	6-61%
Strand <i>et al.</i> 2017 ¹²⁰	Adalimumab	0-54%
	Infliximab	0-83%
Kalden <i>et al.</i> 2017 ¹	Adalimumab	1-31%
	Infliximab	7-53%

Wie in Tabelle 18 beschrieben, ist bei allen Autoren bis auf Vincent *et al.* 2013 die ADA-Prävalenz unter Infliximab gegenüber Adalimumab erhöht.

Die von uns erhobenen Daten werden durch die Werte der Metaanalysen bestätigt, sie können in die prozentualen Spannen je Medikament eingeordnet werden.

8.5 Besonderheiten und Unterschiede in den jeweiligen Messverfahren

8.5.1 Nachweis der Therapieantikörperkonzentrationen

Die Messergebnisse der ELISA der beiden Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande) und Immundiagnostik (Bensheim, Deutschland) zur Erfassung der Therapieantikörperkonzentration zeigen in der Korrelationsanalyse eine deutliche bis sehr hohe Übereinstimmung.

Studien belegen ebenfalls hohe Übereinstimmungen zwischen den Assays⁹⁰. Das Funktionsprinzip der von uns verwendeten Assays beider Hersteller zum Nachweis von Infliximab/Adalimumab ist nahezu identisch. Trotzdem gibt es zwischen den Assays einige idiosynkratische Unterschiede, die die geringe Diskrepanz in der quantitativen Evaluation erklären können: Unterschiede in Nachweisgrenzen und Sensitivitäten, Kalibrierungsstandards, Kurvenanpassungen, Probenverdünnung, Inkubationszeiten, sowie Reagenzstabilität. Trotz dieser hohen Übereinstimmung sollte bei Follow-up Untersuchungen auf die einheitliche Verwendung der Assays geachtet werden, um Interpretationsfehlern und eventuell daraus resultierenden therapeutischen Maßnahmen vorzubeugen⁹⁰.

8.5.2 Nachweis und Bedeutung von totalen und freien Anti-Drug-Antikörpern

In der durchgeführten Analyse wurden ADA unter Adalimumab und Infliximab jeweils durch den tADA- und fADA-Assay erhoben. Die dabei erzielten Messergebnisse zwischen den tADA und fADA unterschieden sich. Bei 41,2% der Adalimumab und bei

63,3% der Infliximab Patient*innen zeigten sich tADA, bei 11,8% bzw. 43,3% auch fADA. Unter Adalimumab traten nur zum 2. ZP bei hohen tADA-Titern bei 66,7% der Patient*innen auch fADA auf, bei Infliximab konnten bei allen Patient*innen mit hohen tADA-Titern fADA beobachtet werden. Bei dem Nachweis von fADA wurden die niedrigsten anti-TNF-Serumspiegel sowohl von Adalimumab als auch von Infliximab gemessen.

Ramos *et al.* 2016 untersuchten Infliximabproben mit den gleichen auch von uns verwendeten Assays des Herstellers Immundiagnostik: Bei 64% der Patient*innen ließen sich tADA, bei 36% auch fADA nachweisen. Dabei fanden sich tADA über den gesamten Zeitraum zwischen zwei Injektionen, wohingegen fADA nur episodisch gemessen wurden. Die meisten fADA Patient*innen hatten moderate oder hohe tADA-Titer. In der niedrigen tADA-Gruppe waren 38% auch fADA positiv, auch wenn die fADA-Titer gering waren ¹¹⁰. Diese Daten stimmen sehr gut mit unseren überein. Für Adalimumab konnten keine Studien gefunden werden, die den gleichen Assay verwendeten. Van Schouwenburg *et al.* 2013 konnten in ihrer Adalimumab Langzeitbeobachtung mittels pH-shift Assay in Komplexen gebundene ADA häufiger und früher (innerhalb der ersten 28 Wochen) nachweisen als frei vorliegende ADA ⁵⁹. In einer vorherigen Studie entwickelten sie die Annahme, dass diese im Komplex gebundenen ADA vor allem in Form von kleinen Immunkomplexen vorliegen und nur langsam abgebaut werden, weshalb sie vermehrt nachweisbar sind ⁷³.

Die Auswirkungen von im Komplex vorliegenden ADA auf das klinische Therapieansprechen ist noch unklar. Einerseits wird spekuliert, dass die kleinen Komplexe den Fc-Rezeptor blockieren, aber aufgrund der kleinen Größe keinen Signalweg auslösen müssen. Andererseits kann eine Langzeitbelastung mit kleinen Immunkomplexen das Risiko von Typ-III allergischen Reaktionen wie im Sinne einer Serum-Krankheit erhöhen ⁵⁹. Auch hier werden vertiefende Studien zur besseren Verständlichkeit zukünftig notwendig sein.

8.6 Sicherheit

In der vorliegenden Datenerhebung wurden keine relevanten Hinweise auf Infusionsreaktionen oder sonstige Nebenwirkungen, die in Assoziation mit dem Auftreten von ADA gebracht werden können, beobachtet. Andere Autor*innenteams fanden sicherheitsrelevante Aspekte, beispielweise, dass hohe Serumspiegel von TNF- α -Inhibitoren mit einem 50% erhöhten Infektionsrisiko gegenüber der Gruppe mit niedrigen/normalen Serumspiegeln einhergingen ¹²⁴. Die meisten infusionsbedingten Reaktionen sind mild bis moderat und treten in den ersten zwei Stunden nach Infusion/Injektion auf, welche in der Regel durch den Einsatz von Antihistaminika oder Glucocorticoide gemildert werden können ¹²⁵. Darunter fallen vor allem Hauterscheinungen wie Urtikaria, aber auch kritische Zustände wie respiratorische Insuffizienz und systemischer Blutdruckabfall ^{118,126}.

Die in die Studie eingeschlossenen Patient*innen wurden bereits über einen längeren Zeitraum mit dem TNF- α -Inhibitor behandelt. Es ließ sich davon ausgehen, dass die lange Therapiedauer durch eine gute Verträglichkeit der Medikamente bedingt war. Deshalb war die Abwesenheit von infusions- und injektionsbedingten Reaktionen oder sonstigen Nebenwirkungen, die in Assoziation mit dem Auftreten von ADA gebracht werden können, zu erwarten.

8.7 Therapeutisches Drugmonitoring in der Rheumatologie

Die RA und auch weitere entzündlich-rheumatische Erkrankungen, bei denen Biologika eingesetzt werden, sind in ihrer aktiven Form mit einer schlechten Prognose assoziiert. Ohne effektive Behandlung kann es zu Zerstörung von Gelenken mit Funktionsverlust bis hin zur Invalidität sowie zu einer Mitbeteiligung innerer Organe mit verkürzter Lebenserwartung kommen ^{127,128}. Unter optimaler Therapieeinstellung kann die Prognose erheblich verbessert und dauerhafte Schäden sowie erhöhte Mortalität vermieden werden, sodass die Lebensqualität und -Erwartung annähernd der Normalbevölkerung entspricht ¹¹⁵.

Der klinische Alltag in der Rheumatologie sieht derzeit kein TDM vor. Das Therapieansprechen, Dosisanpassung oder weiteres Vorgehen nach primärem oder sekundärem Wirkverlust wird aktuell nicht weiter untersucht und Wirkstoffkonzentrationen oder ADA-Konzentrationen werden nicht erfasst. Demnach basieren therapeutische Dosisanpassungen oder ein Substanzwechsel ausschließlich

auf klinischer Einschätzung, ohne das exakte Wissen über die Faktoren, die den Wirkverlust erklären können. Die Studienlage zum TDM ist für chronisch-gastroenterologische Erkrankungen ergiebiger als für chronisch-inflammatorische Gelenkerkrankungen, weshalb im Folgenden auch mit Inflammatory Bowel Disease (IBD)-Studien zitiert werden. Fast alle Autor*innen sprechen sich für ein TDM bei IBD aus. Zunehmend gibt es auch Studien für ein TDM bei rheumatische Erkrankungen.

Viele Studien befürworten die Etablierung eines routinemäßigen TDM in der klinischen Praxis ^{114,129,130}. Afif *et al.* 2010 konnten zeigen, dass ein TDM von Serumspiegel und ADA-Konzentrationen bei Morbus Crohn Patient*innen, die Infliximab erhielten, dazu führte, dass durch die bessere Diagnostik ein TNF- α -Inhibitor Wechsel mit einem Ansprechen von 92% einherging, wohingegen eine Erhöhung der Dosis nur ein Ansprechen von 17% erbrachte. Patient*innen mit subtherapeutischen Serumspiegeln profitierten mehr von einer Dosiserhöhung als einem anti-TNF-Wechsel ¹³¹. Eine weitere Studie zeigte, dass Patient*innen mit IBD, die nicht auf eine Therapieeskalation ansprachen, zu Beginn der Therapie geringere Infliximabspiegel aufwiesen, als diejenigen mit Langzeitansprechen (2,32 $\mu\text{g/ml}$ vs. 8,66 $\mu\text{g/ml}$). Deshalb könnte ein früh erniedrigter Spiegel ein prädiktiver Faktor für späteren Wirkverlust darstellen ¹³². Bartelds *et al.* 2011 beschrieben, dass 67% der ADA-positiven RA-Patient*innen unter Adalimumab die ADA in den ersten 28 Wochen der Therapie entwickeln, 10% sogar bereits nach 4 Wochen ¹³³. Ein anderes Autor*innenteam ¹³⁴ zeigte, dass bei therapieresistenten RA Patient*innen unter Serumspiegelüberwachung in über 50% die Therapieentscheidungen geändert wurden und das Patient*innen mit niedrigen Infliximabspiegeln eher von einer Dosiserhöhung als einem Biologikawechsel profitierten. Diejenigen mit hohen Infliximabspiegeln profitierten jedoch mehr von einem anti-TNF-Wechsel ¹³⁴. Der frühe und schnelle Nachweis von ADA kann vor potentiell gefährlichen, infusionsbedingten Reaktionen schützen, da die Reaktion stärker und dadurch riskanter für die Patient*innen ausfallen können ^{52,55,118,126}. Jani *et al.* 2018 untersuchten den Einfluss von anti-TNF Serumspiegeln auf das Infektionsrisiko. Hohe Serumspiegel von TNF- α -Inhibitoren gingen mit einem 50% erhöhten Infektionsrisiko gegenüber der Gruppe mit niedrigen/normalen Serumspiegeln einher ¹²⁴. Ebenso wie eine Therapieeskalation ist eine Dosisreduktion bei Patient*innen, deren Krankheitsaktivität sich in klinischer Remission befinden und die gleichzeitig hohe therapeutischen Medikamentenspiegeln haben, möglich. TDM kann helfen diese zu überwachen und eine Über- bzw.

Untertherapie zu vermeiden ¹³⁵. Bouman *et al.* 2017 bestätigten diese Aussage, jedoch sah das Autor*innenteam keine weiteren Vorteile eines TDM ¹³⁶. Auch andere Autor*innen sehen das TDM eher kritisch und empfehlen keine Entscheidung zur Kontrolle der Krankheitsaktivität auf Basis einer Bestimmung von Serumspiegeln ¹³⁷.

8.7.1 Wirtschaftliche Bedeutung des therapeutischen Drugmonitorings

Bei Beachtung der hohen Kosten der TNF- α -Inhibitoren und den mit dem Wirkverlust oder UAW assoziierten Kosten wird schnell deutlich, dass ein konsequentes Drugmonitoring auch eine wirtschaftliche Konsequenz hätte. Martelli *et al.* 2016 untersuchten die wirtschaftlichen Folgen des TDM im Detail: 7 Studien (2 RCT, 5 mit Modellierungsansatz) von IBD und RA Patient*innen wurden eingeschlossen. Durch TDM wurde bei den RCT eine Kostenersparnis von 28-34% erzielt. Durch strategisches TDM konnte im Modell bei der Therapie von Morbus Crohn \$5396 innerhalb eines Jahres bzw. 13130 Euro pro Patient*in nach 5 Jahren Follow-Up eingespart werden. Für die RA wurden ebenfalls erhebliche Kostenersparnisse beschrieben. Es wurden keine negativen Auswirkungen auf die Therapiewirksamkeit durch das TDM festgestellt ¹³⁸. Weitere Studien kamen zu ähnlichen Ergebnissen ^{139,140}.

8.7.2 Standardisierte Nachweisverfahren – Hindernis und Herausforderung für therapeutisches Drugmonitoring

Die Implementierung von TDM bei der Therapie von TNF- α -Inhibitoren ist eine bisher nicht gelöste Herausforderung im klinischen-rheumatologischen Alltag, größtenteils bedingt durch eine fehlende Standardisierung des Nachweisverfahrens und erhöhtem Zeitaufwand. Als Beispiel hierfür wird im Folgenden eine wegweisende Publikation untersucht.

Afonso *et al.* 2016 vergleichen in ihrer Studie drei verschiedene Nachweismethoden sowohl zum Nachweis des Infliximabserumspiegels als auch ADA gegen Infliximab. Dabei wurden die Messergebnisse des tADA Assays (SFPE) (Hersteller Immundiagnostik, siehe Methoden S.36), des Bridging ELISA (BE) und des AHLC Assay miteinander verglichen. Die Autoren berichteten über Schwierigkeiten bei der Evaluation von Cut-Off Werten, die besonders bei Assays zu Erhebung von ADA problematisch sind.

Aufgrund der fehlenden Standardisierung und daraus bedingten Unterschiede zwischen den Assays unterscheiden sich die Einheiten der Messergebnisse. Weiter definieren nur einige Assays ein Positiv-Limit als Cut-Off⁹⁰. Dazu kommt, dass BE Assays nicht nur von der Menge der ADA, sondern auch von deren Affinität zum Antigen abhängig sind^{65,88}. Folge ist eine Intervariabilität des Assays, die vor allem für Werte um die Nachweisgrenze eine Rolle spielt, da diese variieren können.

Die AHLC und SFPE Assays weisen häufiger ADA als der BE Assay nach. Die im BE als ADA-negative erkannten Proben waren Infliximab positiv oder hatten ADA vom IgG4-Typ. IgG4 ADA sind monovalent und können keine Brücke zwischen dem markierten Infliximab binden, das für den Detektionsschritt verwendet wird⁹⁰. Hart *et al.* 2010 bestätigen die Annahme, dass ADA vom IgG4-Typ durch ein BE nicht verlässlich detektiert werden können⁸⁹. Weiter konnte das BE keine ADA in Proben mit geringen (subtherapeutischen) ADA-Spiegel nachweisen. Beim SFPE Assay zeigten sich nur Interferenzen bei sehr hohen Infliximabspiegeln. Unterschiede zwischen den Messergebnissen waren am deutlichsten bei zweifach negativen (Infliximab-/ADA-) oder zweifach positiven (Infliximab+/ADA+) Proben erkennbar. Die unterschiedlich festgelegten Cut-Offs zur Unterscheidung zwischen positiv und negativ verstärkten diese Beobachtung⁹⁰.

Laut Hersteller ist eine Erfassung der IgG4-ADA, die einen Fab-Arm Exchange durchlaufen haben, mit dem SFPE-Assay nicht möglich. Eine entsprechende Angabe in der Studie von Afonso *et al.* 2016 nicht zu finden.

Gunn *et al.* 2016. beleuchten in ihrem Review Artikel, dass es unangemessen sei, die verschiedenen Verfahren zum Nachweis von ADA untereinander zu vergleichen, da erhebliche methodische Unterschiede zwischen den jeweiligen Nachweisverfahren einen Vergleich zwischen diesen unmöglich machen würden. Jede Methode sei einzigartig für ihren Assay und das zu untersuchende Medikament. Es sei den Autor*innen nach zwar verlockend, die Inzidenz von Immunogenität und Charakteristika von Biologika untereinander zu vergleichen, ihrer Meinung nach aber wissenschaftlich nicht korrekt und aufgrund der daraus resultierenden nicht validen Aussagen sogar gefährlich⁷⁰.

Amrani *et al.* 2019 haben erstmalig ein in vivo Testverfahren mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung zum Nachweis von

neutralisierenden ADA gegen Infliximab entwickelt ¹⁴¹. Die herkömmlichen Nachweisverfahren wie ELISA und RIA erfassen die gesamten ADA und differenzieren nicht zwischen den beiden ADA-Typen. Dadurch kann es vorkommen, dass nur nicht-neutralisierende ADA gemessen werden, da diese bereits in einem frühem Stadium gebildet werden und auch transient auftreten können. Die Pharmakodynamik des Infliximab beeinflussenden neutralisierenden Antikörper, deren Nachweis eine klinische Relevanz hinsichtlich weiterer therapeutischer Entscheidungen hätte, könnte demnach gegebenenfalls ausbleiben ¹⁴¹.

Es ist bemerkenswert und problematisch, dass in vielen publizierten Studien (jeder 4. bis 5. Publikation) keine Angaben darüber gemacht werden, welchen Assays verwendet wurden. Die am häufigsten verwendeten Assays sind ELISA, gefolgt von RIA ⁸⁸.

Die vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen die Vielfalt der vorhandenen Nachweismethoden von ADA, wobei hier nur wenige ausgewählte Verfahren vorgestellt wurden. Jede Methode hat ihre Vor- und Nachteile. Damit einher geht eine erschwerte Vergleichbarkeit zwischen den Messergebnissen der jeweiligen Studien, die von Gunn *et al.* 2016 sogar als unmöglich beschrieben wird ⁷⁰. Deutlich wird die Notwendigkeit einer Standardisierung der Nachweisverfahren, damit die wertvollen Informationen, die durch die Assays erlangt werden können, auch einen belastbaren Mehrwert im klinischen Alltag bieten können. Ansonsten kann die Aussage jeweils nur studienintern gedeutet werden und ein valider Stellenwert im klinischen Monitoring von chronisch-rheumatischen Erkrankungen kann nicht ausreichend gewährleistet werden.

8.7.3 Therapeutisches Drugmonitoring im klinischen Alltag

Vincent *et al.* 2013 entwickelten einen Algorithmus für ein mögliches Vorgehen bei Patient*innen mit primärem oder sekundärem Wirkverlust unter Therapie mit TNF- α -Blockern (siehe Abbildung 23). Dieser ermöglicht die genauere Differenzierung des Wirkverlustes in Pharmakon- oder TNF-assoziierten Wirkverlust, was für eine weitere Therapieentscheidung von Bedeutung ist. Bei suboptimaler Serumkonzentration und negativen ADA (mAk-/ADA-) wird von einer zu niedrigen Konzentration des Therapieantikörpers und nicht von einer mangelnden Wirksamkeit ausgegangen. Eine Erhöhung der Dosis oder der Applikationsfrequenz ist die Therapieempfehlung.

Gegenteiliges gilt bei optimaler anti-TNF-Konzentration und positiven ADA (mAk+/ADA+), hier wird von einem pharmakonspezifischen Wirkverlust ausgegangen und ein Wechsel zu einem anderen anti-TNF-Inhibitor empfohlen ².

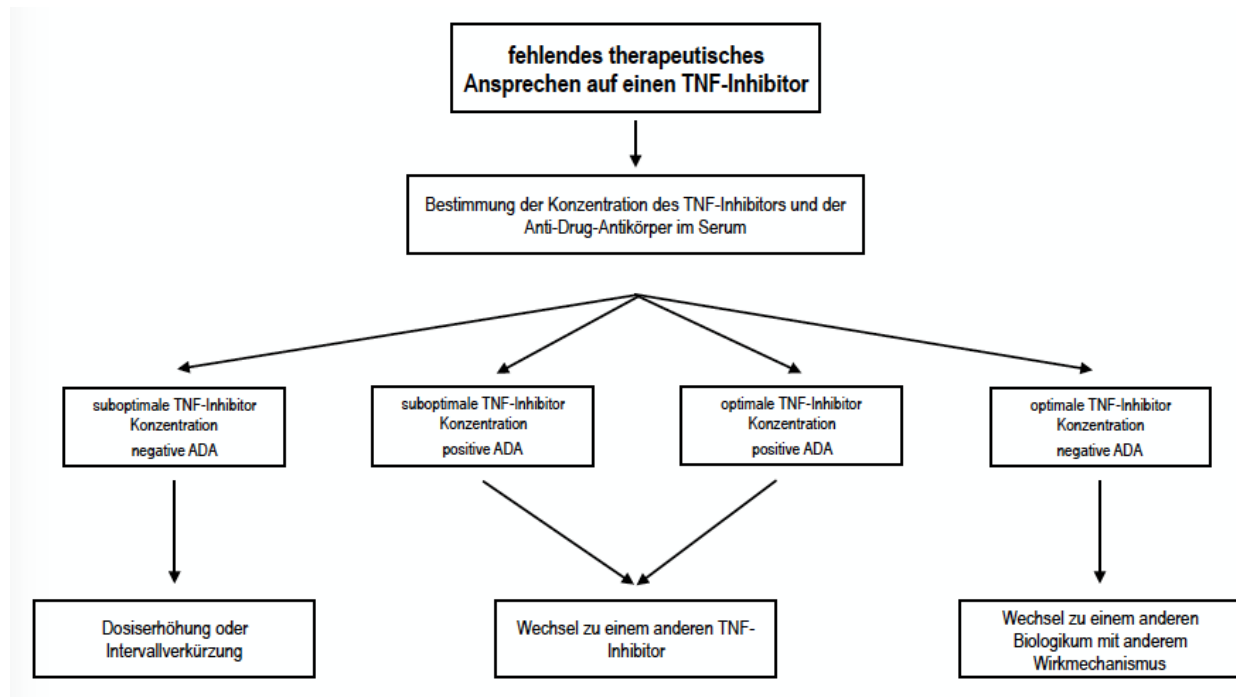


Abbildung 23: Entscheidungsalgorithmus zum Vorgehen bei Wirkverlust von TNF-Inhibitoren

Dargestellt ist ein Entscheidungsalgorithmus für TDM für TNF-Inhibitor Serumspiegel und ADA bei Patient*innen mit primärem oder sekundärem Wirkverlust unter anti-TNF Therapie der Autoren Vincent et al. 2013. (Abbildung wurde in Anlehnung an Vincent et al. 2013 hergestellt) ²

Afonso et al. 2016 ⁹⁰ weisen darauf hin, dass in der Klinik die unterschiedlichen Ergebnisse der Nachweismethoden berücksichtigt werden müssen. Das jeweilige Testergebnis kann, abhängig von der Nachweismethode, unterschiedlich ausfallen. Es gibt eine hohe Übereinstimmung der verschiedenen Assays zwischen der Konstellation Infliximab+/ADA- bzw. Infliximab -/ADA+, weshalb die Auswahl des Assays hier kaum einen Einfluss auf die therapeutische Entscheidung hat. Gegenteiliges gilt bei Patient*innen, die zweifach positiv oder negativ sind, da in diesem Fall die Übereinstimmung zwischen den Assays variiert und deshalb die Auswahl des Assays durchaus von Bedeutung für das jeweilige Testergebnis ist. Deshalb sollte bei therapeutischen Interventionen wie Behandlungsintensivierung (bei Infliximab -/ ADA -), oder einem Wechsel der Medikamentenklasse bzw. Kombinationstherapie mit Immunmodulatoren (bei Infliximab+/ADA+) bedacht werden, dass diese aufgrund von Ergebnissen vorgenommen wurden, die stark von den jeweiligen Assays abhängig sind ⁹⁰.

Bei der Bewertung des Algorithmus für den klinischen Alltag mithilfe unserer Ergebnisse zeigen sich einige Einschränkungen, die vor allem die Infliximabkohorte betreffen. Wir konnten feststellen, dass viele Patient*innen, deren Krankheitsaktivität sich in Remission befand, ADA-positiv waren. Diese Patient*innen Gruppe würde nach dem vorliegenden Algorithmus nicht identifiziert werden, da eine Überprüfung des ADA-Status nur bei klinischem Wirkverlust vorgenommen wird. Wir konnten jedoch zeigen, dass diese Konstellation der klinischen Remission bei gleichzeitig positiven ADA im klinischen Alltag vertreten ist.

Eine Untersuchung von ADA und Infliximabspiegel unabhängig vom klinischen Wirkverlust würde auch Patient*innen in klinischer Remission mit einschließen und ebenfalls eine Reevaluation der Therapie ermöglichen. Weiter zeigt die Studienlage, dass ADA vor allem innerhalb der ersten 28 Wochen nach Therapieinduktion auftreten, weshalb ein früh beginnendes TDM die frühe Aufdeckung von Immunogenität bewirken könnte und so eine frühzeitige Anpassung der Therapie möglich wäre. Es sollte berücksichtigt werden, dass ADA nicht immer zu einem Wirkverlust von Infliximab führen und sogar Jahre nach Beendigung der Therapie persistieren können.

Auf Basis unserer Untersuchung erscheint eine Unterscheidung in tADA und fADA sinnvoll. Das verwendete Assay zur Erhebung der ADA sollte aufgrund der unterschiedlich ausgeprägten Nachweishäufigkeiten von ADA unbedingt angegeben werden. Eine Verwendung des tADA Assays ist unserer Meinung nach sinnvoll, da es unabhängig von den Interventionszeitpunkten die tADA zuverlässig misst und im Vergleich zu anderen Assays die besten Messergebnisse in Anwesenheit von exogenem korrespondierendem Therapieantikörper zeigte ^{90,110}. Es erfasst mehr ADA-positive Patient*innen, was eine frühere Reevaluation der Therapie ermöglichen könnte.

Im nächsten Schritt kann insbesondere bei hohen tADA Spiegeln die Bestimmung von fADA sinnvoll sein.

Durch ein TDM könnten Dosisescalationen, TNF- α -Inhibitor-Wechsel oder Substanzklassenwechsel mit Labordiagnostik gestützt und so besser begründet werden. Die Patient*innensicherheit kann durch eine Früherkennung immunogener Reaktionen auf das Therapeutikum verbessert werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, auch in Abwesenheit klinischer Verschlechterung den Wirkstoff oder die Wirkstoffklasse zu

wechseln. Außerdem können optimale Wirkstoffspiegel erzielt werden, so dass Patient*innen weder überdosiert noch unterdosiert sind. Die Ergebnisse müssen jedoch immer auf den individuellen Fall im Zusammenhang mit der klinischen Situation bezogen werden, da ADA sogar bei klinischer Remission auftreten können.

8.8 Stärken und Schwächen der Studie

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine retrospektive, unverblindete Studie, die aufgrund des Studiendesigns speziellen Einschränkungen unterliegt.

Diese betreffen vor allem die interne und externe Validität. Abweichungen der internen Validität zeigten sich vor allem durch eine fehlende Standardisierung im Versuchsaufbau und weit gefasste Einschlussbedingungen. Die Patient*innen wurden nicht einheitlich rekrutiert, es gab keine festgelegten Messzeitpunkte, die Daten zur Krankheitsaktivität waren nicht einheitlich und bedingten Abweichungen in der Ermittlung der Krankheitsaktivität. Andererseits wurde die Krankheitsaktivität durch standardisierte Scores erhoben und die Durchführung der Tests nach zuvor validierten Anleitungen vorgenommen. Die externe Validität ist die Generalisierung der Ergebnisse unabhängig von Person, Ort, Instrument und ZP. Diese unterlag den Einschränkungen der Proband*innencharakteristika. Eine Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit der vorhandenen Literatur unterlag Abweichungen der verwendeten Messmethoden.

8.8.1 Proband*innenkollektiv

Als wichtigste Limitation dieser Studie ist die geringe Proband*innengröße sowie die Inhomogenität der Kohorte zu nennen. Das Kollektiv der Versuchsgruppe mit 17 Adalimumab und 30 Infliximab Patient*innen war klein. Durch die häufige Unterteilung in Untergruppen (Krankheitsaktivität, Krankheitsbilder) innerhalb der Medikamentengruppen wurde die Wahrscheinlichkeit eines zufällig bedingten Unterschiedes erhöht. Da diese Studie ohne Baseline durchgeführt wurde und die Patient*innen die Medikamente teilweise schon über einen langen Zeitraum vor Studienbeginn erhielten, können Konfundierungsfaktoren, die zum Auftreten von ADA oder zur Einschränkung der TNF- α -Therapie führen können, nicht ausgeschlossen werden. Die Patient*innen wurden ungeachtet von Alter, Krankheitsdauer, Nebendiagnosen, Krankheitsstadium, Krankheitsaktivität, weiterer Medikation, vorheriger Therapie mit einem anderen TNF- α -Blocker, Rheumafaktor,

Raucheranamnese, etc. ausgewählt. Die Krankheitsaktivität der Kohorte befand sich zum Studienbeginn mehrheitlich in Remission. Es war keine Mindestaktivität in der Krankheitsaktivität zur Baseline erforderlich. Weiter wurden der letzten Injektionszeitpunkt nicht berücksichtigt, was vor allem bei den Adalimumab Patient*innen zu unterschiedlichen Wirkstoffspiegeln führen könnte. Bei den Infliximabpatient*innen erfolgte die Serumabnahme vor der nächsten Infusion, jedoch waren die Abstände zwischen den Infusionen nicht einheitlich. Außerdem lagen pro Patient*in unterschiedlich viele Proben vor.

Wie in RCT gezeigt, lassen sich die Pharmakokinetik und -dynamik von ADA zwar am besten bei anti-TNF-naiven Patient*innen bewerten, jedoch war das Ziel unserer Studie, diese Phänomene explizit unter den Bedingungen des klinischen Alltages zu beobachten. Es ist anzunehmen, dass das gewählte Patient*innenkollektiv repräsentativ für ein Kollektiv aus der täglichen Routine ist, da die Ein- und Ausschlusskriterien sehr breit gehalten wurden. Jedoch kann die Studie einem gewissen Selektionsbias unterliegen, da ausschließlich aus den Fachambulanzen der Universitätsklinik rekrutiert wurde, in denen oft besondere und schwere Krankheitsverläufe behandelt werden. Durch das Screening der Medikamentenspiegel wurden Proben ausgewählt, deren Serumspiegel auf das Vorhandensein von ADA schließen ließ. Diese Vorauswahl unterlag einem Selektionsbias zugunsten positiver ADA-Produktion. Jedoch konnten dadurch mehr Patient*innen mit ADA identifiziert und die Auswirkung auf die anderen Parameter beobachtet werden. All diese die Inhomogenität betreffenden Faktoren erschwerten die Vergleichbarkeit unserer Studie mit bisherigen Studien.

8.8.2 Daten zur klinischen Krankheitsaktivität

Für die Erhebung der klinischen Daten musste teilweise auf retrospektiv erhobene Daten zurückgegriffen werden. Die Dokumentation in der klinischen Praxis wird während des Routinebetriebes durchgeführt, weshalb in der Gesamtschau nur die essentiellen Informationen verfügbar sind, die eine exakte Datenerhebung erschweren können. Dieses Problem betraf vor allem die Adalimumab Proben.

8.8.3 Serologische Testqualität

Wie bereits im Teil „Nachweismethoden (8.7.2)“ diskutiert, hat die Testqualität einen erheblichen Einfluss auf die Reliabilität sowie Validität der Ergebnisse. In dieser Arbeit

wurden verschiedene ELISA Methoden verwendet, die alle unterschiedliche Ergebnisse erbrachten. Aus den herstellerepezifischen Anleitungen können Titerabweichungen entstehen, die unterschiedliche Ergebnisse bedingen können. Dazu zählen auch temperaturabhängige Lagerungen, Verdünnungen, Vorinkubationszeiten, OD-Berechnungen. Obwohl nach bestem Gewissen und der Empfehlungen für gute wissenschaftliche Praxis gearbeitet wurde, können Fehler hinsichtlich Probengewinnung, Assay-Durchführung und Statistik nicht vollständig ausgeschlossen werden.

8.9 Geplante Veröffentlichungen und weiterführende Untersuchungen

Eine Publikation von Teilergebnissen mit dem Titel „Evaluation von Immunoassays zum Nachweis von Anti-Drug Antikörpern gegen Infliximab und korrespondierenden Infliximab-Serumspiegeln bei Spondyloarthritis im klinischen Alltag “ wurde von der Fachzeitschrift „Aktuelle Rheumatologie“ (Thieme) akzeptiert.

Nach Analyse der Limitationen können folgende sinnvolle weiterführende Untersuchungen bzw. Modifikationen unserer Studie in Betracht gezogen werden:

- *größeres Proband*innenkollektiv mit ausreichend Fallzahlen je Krankheitsbild*
- *Langzeitbeobachtungen mit fixen Kontrollzeitpunkten, wenn möglich mit Daten ab Therapiebeginn*
- *Einheitliche und vollständige Erfassung von Krankheitsaktivität, Vor- und Begleiterkrankungen, Komedikation (v.a. Immunmodulatoren) und infusions-/injektionsassoziierten Nebenwirkungen, sowie der Krankheitsaktivität entweder über den DAS-28 (CRP/BSG) oder den Simple Disease Activity Index (SDAI). Anstelle des BASDAI könnte auch der Ankylosing Spondylitis Disease Activity Score (ASDAS) zur besseren Beurteilung der Krankheitsaktivität unter einem TNF- α -Inhibitor verwendet werden*
- *Nachweis von neutralisierenden ADA mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (wie in 8.7.2 beschrieben) und Vergleich dieser mit tADA und fADA. Dadurch könnten die neutralisierenden ADA gegenüber der gesamt ADA identifiziert und ggf. eine klinische Relevanz festgestellt werden.*
- *Durchführung einer Studie, die entsprechend der gemessenen Befunde strategische Therapieentscheidung trifft und deren Outcome beobachtet*

Ergänzende Studien zu dem Thema könnten sich inhaltlich mit folgenden Problemstellungen beschäftigen:

- *Pharmakokinetik und Dynamik von persistierenden ADA*
- *Pharmakokinetik und Dynamik von ADA bei Dosisreduktion des Therapieantikörpers*

8.10 Zukunftsmarkt Biosimilars

Die Biologikatherapie ist eine sehr effektive, jedoch auch eine sehr kostenintensive Therapie. 2016 war Humira® (AbbVie) das am häufigsten verschriebene Biopharmazeutikum in den Vereinigten Staaten von Amerika und erbrachte einen Umsatz von 16 Milliarden Euro¹⁴². Aufgrund der hohen Kosten ist der Zugang zu diesen Substanzen limitiert. Im Gegensatz dazu ist der Gebrauch von Biosimilars durch ihren niedrigeren Preis von beachtlichem wirtschaftlichem Interesse. Mit dem wachsenden Markt an Biosimilars gibt es künftig mehr Optionen für Gesundheitssysteme einerseits früher den Zugang zu einem Biologikum zu ermöglichen, als auch von einem teuren Originalpräparat zu einer kostengünstigeren Alternative zu wechseln. Dadurch kann der Druck auf die Gesundheitssysteme verringert und ein früherer und schnellerer Zugang zu einer Biologikatherapie ermöglicht werden^{12,143}. Es wird eine Kostenersparnis von 11,8-33,4 Milliarden Euro zwischen 2007 und 2020 in der Europäischen Union erwartet¹⁴⁴. Bisherige Studien haben sich in jüngster Vergangenheit mit dem Wechsel zum Biosimilar beschäftigt und keinen Unterschied in Sicherheit, Wirksamkeit und Immunogenität zum Originalpräparat, oder durch den Wechsel feststellen können¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. TDM wurde als hilfreiches Tool für den Wechsel bezeichnet, da so z.B. eine optimale Infliximabeinstellung gemäß der in der Literatur empfohlenen Werte erfolgen kann¹⁴⁸. Durch die medikamentöse Therapie nähert sich die Lebenserwartung von Patient*innen, die von einer chronisch-inflammatorischen Erkrankung betroffen sind, der der Allgemeinbevölkerung an^{128,149}. Insbesondere wegen der längeren Erkrankungsdauer ist es essentiell wichtig, dass die Medikamentensicherheit für diese langen Einnahmedauern garantiert ist und die Lebensqualität verbessert wird¹²⁸. Durch den systemischen Charakter dieser Erkrankungen bedarf das optimale Patient*innenmanagement eine umfassende Krankheitsbetrachtung, das sowohl subjektive als auch objektive Parameter erfasst. Zusätzlich zu den Scores zur Erfassung der Krankheitsaktivität (DAS-28 oder

BASDAI) sollte radiologische und laborchemische Diagnostik erfolgen, da die Scores alleine nicht ausreichend zur Beurteilung des Krankheitsverlaufs sind ^{93-95,150}.

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass die Erfassung von Serumspiegeln und ADA-Status noch eine Herausforderung für den klinischen Alltag darstellt, aber eine sehr effektive Methode ist, die objektiven Beurteilungsparameter für chronisch-inflammatorische Erkrankungen zu erweitern auf deren Basis wegweisende Entscheidungen für weitere Therapiemodifikation getroffen werden können. Dies ist eine vielversprechende Möglichkeit, Wirkverlust zu verstehen, die Ursache dafür zu identifizieren und eine schnelle und gezielte Therapieumstellung zu ermöglichen. Ohne TDM dauert die Identifizierung des Wirkverlustes und die anschließende Therapieumstellung unter Umständen länger, ist damit kostenintensiver und für die Patient*innen und deren Krankheitsverlauf nicht profitabel. TDM wird zukünftig durch den vermehrten Einsatz von Biosimilars einen (noch) wichtigeren Stellenwert im Patient*innenmanagement haben, da deren immunogene Wirkung noch unzureichend bekannt ist. Erste ELISA dafür sind bereits entwickelt worden ¹⁴⁰.

Ziel sollte es sein, eine individuelle Therapie zu gewährleisten, die im Idealfall das optimale Therapieschema auf Basis von belastbaren, quantifizierbaren biochemischen Parametern findet. Im Sinne der multimodalen Therapie sollten dabei die subjektiven psychosozialen Faktoren jedes Einzelnen berücksichtigt werden.

9 Literaturverzeichnis

1. Kalden JR, Schulze-Koops H. Immunogenicity and loss of response to TNF inhibitors: implications for rheumatoid arthritis treatment. *Nature reviews Rheumatology* 2017;13:707-18.
2. Vincent FB, Morand EF, Murphy K, Mackay F, Mariette X, Marcelli C. Antidrug antibodies (ADAb) to tumour necrosis factor (TNF)-specific neutralising agents in chronic inflammatory diseases: a real issue, a clinical perspective. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:165-78.
3. Ordas I, Mould DR, Feagan BG, Sandborn WJ. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clinical pharmacology and therapeutics* 2012;91:635-46.
4. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak PP, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66:921-6.
5. Chen DY, Chen YM, Tsai WC, Tseng JC, Chen YH, Hsieh CW, Hung WT, Lan JL. Significant associations of antidrug antibody levels with serum drug trough levels and therapeutic response of adalimumab and etanercept treatment in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2014;74:e16.
6. Verband forschender Arzneimittelhersteller. Hightech im Dienst der Patienten. Stand 2018 (zitiert am 10.04.2018) URL: <https://www.vfa.de/download/broschuere-biopharmazeutika.pdf>.
7. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nature Reviews Drug Discovery* 2002;1:457.
8. Quianzon CC, Cheikh I. History of insulin. *Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives* 2012;2:10.3402/jchimp.v2i2.18701.
9. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1985;82:7580-4.
10. Puck TT, Fisher HW. GENETICS OF SOMATIC MAMMALIAN CELLS. *The Journal of experimental medicine* 1956;104:427-34.
11. Meibohm B (2006) *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of biotech drugs*. Weinheim: Wiley-VCH, S. 11, S. 45-58, S. 314-321.
12. Rinaudo-Gaujous M, Paul S, Tedesco ED, Genin C, Roblin X, Peyrin-Biroulet L. Review article: biosimilars are the next generation of drugs for liver and gastrointestinal diseases. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2013;38:914-24.
13. Knight DM, Trinh H, Le J, Siegel S, Shealy D, McDonough M, Scallon B, Moore MA, Vilcek J, Daddona P, Ghayeb J. Construction and initial characterization of a mouse-human chimeric anti-TNF antibody. *Molecular immunology* 1993;30:1443-53.
14. Walsh G. *BIOPHARMACEUTICALS BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY*: John Wiley & Sons Ltd, The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex PO19 8SQ, England; 2003.
15. Voronina EV, Seregin YA, Litvinova NA, Shvets VI, Shukurov RR. Design of a stable cell line producing a recombinant monoclonal anti-TNF α antibody based on a CHO cell line. *SpringerPlus* 2016;5:1584.
16. Kalden JR. [Biologics]. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2016;75:604-10.
17. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annual review of immunology* 1992;10:411-52.

18. Naumann L, Feist E, Burmester GR. Antizytokintherapie. *Internist* 2013;54:449-63.
19. Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD, Chang M, Pan YC, Mathison J, Ulevitch R, Cerami A. Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. *Nature* 1985;316:552-4.
20. Dinarello CA, Cannon JG, Wolff SM, Bernheim HA, Beutler B, Cerami A, Figari IS, Palladino MA, Jr, O'Connor JV. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 1986;163:1433-50.
21. Apostolaki M, Armaka M, Victoratos P, Kollias G. Cellular mechanisms of TNF function in models of inflammation and autoimmunity. *Current directions in autoimmunity* 2010;11:1-26.
22. Lorenz HM, Kalden JR. Zytokin- und Anti-Zytokintherapie bei der rheumatoiden Arthritis. *Internist* 2001;42:55-63.
23. Maini RN, Taylor PC, Paleolog E, Charles P, Ballara S, Brennan FM, Feldmann M. Anti-tumour necrosis factor specific antibody (infliximab) treatment provides insights into the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 1999;58 Suppl 1:156-60.
24. Paleolog EM, Young S, Stark AC, McCloskey RV, Feldmann M, Maini RN. Modulation of angiogenic vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1998;41:1258-65.
25. Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1994;152:4149-56.
26. MSH Sharp & Dohme GmbH. Infliximab Fachinformationen. Version 2018 (zitiert am 06.08.2018). URL: <https://www.msd.de/fileadmin/files/fachinformationen/remicade.pdf>
27. MSH Sharp & Dohme GmbH. Simponi Fachinformation. Stand 2018. (zitiert am 06.08.2018). URL: https://www.msd.de/fileadmin/files/.../simponi_injektor_spritze_50mg.pdf
28. European Medicines Agency. Cimzia- Zusammenfassung des EPAR für die Öffentlichkeit. Stand 2018 (zitiert am 08.08.2018). URL: http://www.ema.europa.eu/docs/de_DE/document_library/EPAR_Summary_for_the_public/human/001037/WC500069733.pdf
29. Pfizer. Enbrel Fachinformation. Stand 07/2018 (zitiert am 06.08.2018). URL: <https://www.pfizer.de/medikamente-produkte/rezeptpflichtige-medikamente/pfizer/produkte/detailansicht/enbrelR-2550mg-fertigspritze/>
30. Albrecht K, Krüger K, Wollenhaupt J, Alten R, Backhaus M, Baerwald C, Bolten W, Braun J, Burkhardt H, Burmester GR, Gaubitz M, Gause A, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Kuipers J, Krause A, Lorenz H-M, Manger B, Nüßlein H, Pott H-G, Rubbert-Roth A, Schneider M, Specker C, Schulze-Koops H, Tony H-P, Wassenberg S, Müller-Ladner U. German guidelines for the sequential medical treatment of rheumatoid arthritis with traditional and biologic disease-modifying antirheumatic drugs. *Rheumatology international* 2014;34:1-9.
31. Singh JA, Cameron C, Noorbaloochi S, Cullis T, Tucker M, Christensen R, Ghogomu ET, Coyle D, Clifford T, Tugwell P, Wells GA. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2015;386:258-65.
32. Galloway JB, Hyrich KL, Mercer LK, Dixon WG, Fu B, Ustianowski AP, Watson KD, Lunt M, Symmons DP. Anti-TNF therapy is associated with an increased risk of serious infections in patients with rheumatoid arthritis especially in the first 6 months of treatment:

updated results from the British Society for Rheumatology Biologics Register with special emphasis on risks in the elderly. *Rheumatology* (Oxford, England) 2011;50:124-31.

33.Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Weisman M, Emery P, Feldmann M, Harriman GR, Maini RN. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-Tumor Necrosis Factor Trial in Rheumatoid Arthritis with Concomitant Therapy Study Group. *The New England journal of medicine* 2000;343:1594-602.

34.Poddubnyy D. Rheumatoide Arthritis. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Version. Berlin: ABW-Wissenschaftsverlag, 2016: 2626-2640

35.Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2001;358:903-11.

36.Lorenz HM. [Rheumatoid arthritis: diagnostics and therapy 2012]. *Der Orthopade* 2012;41:514-9.

37.Lipsky PE. Why does rheumatoid arthritis involve the joints? *The New England journal of medicine* 2007;356:2419-20.

38.Fiehn C, Holle J, Iking-Konert C, Leipe J, Weseloh C, Frerix M, Alten R, Behrens F, Baerwald C, Braun J, Burkhardt H, Burmester G, Detert J, Gaubitz M, Gause A, Gromnica-Ihle E, Kellner H, Krause A, Kuipers J, Lorenz H-M, Müller-Ladner U, Nothacker M, Nüsslein H, Rubbert-Roth A, Schneider M, Schulze-Koops H, Seitz S, Sitter H, Specker C, Tony H-P, Wassenberg S, Wollenhaupt J, Krüger K. S2e-Leitlinie: Therapie der rheumatoiden Arthritis mit krankheitsmodifizierenden Medikamenten. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2018;77:35-53.

39.Smolen JS, Landewe R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, Nam J, Ramiro S, Voshaar M, van Vollenhoven R, Aletaha D, Aringer M, Boers M, Buckley CD, Buttgerit F, Bykerk V, Cardiel M, Combe B, Cutolo M, van Eijk-Hustings Y, Emery P, Finckh A, Gabay C, Gomez-Reino J, Gossec L, Gottenberg JE, Hazes JMW, Huizinga T, Jani M, Karateev D, Kouloumas M, Kvien T, Li Z, Mariette X, McInnes I, Mysler E, Nash P, Pavelka K, Poor G, Richez C, van Riel P, Rubbert-Roth A, Saag K, da Silva J, Stamm T, Takeuchi T, Westhovens R, de Wit M, van der Heijde D. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2016 update. *Annals of the rheumatic diseases* 2017;76:960-77.

40.Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie. Rheuma in Zahlen Betroffene Menschen in Deutschland. 31.12.2014 (zitiert am 03.02.2018). URL: <https://dgrh.de/Start/DGRh/Presse/Daten-und-Fakten/Rheuma-in-Zahlen.html>

41.Braun J, Bollow M, Remlinger G, Eggens U, Rudwaleit M, Distler A, Sieper J. Prevalence of spondylarthropathies in HLA-B27 positive and negative blood donors. *Arthritis and rheumatism* 1998;41:58-67.

42.van der Linden S, van der Heijde D. ANKYLOSING SPONDYLITIS: Clinical Features. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 1998;24:663-76.

43.Braun J, Sieper J. Ankylosing spondylitis. *Lancet* 2007;369:1379-90.

44.Sieper J, Braun J, Dougados M, Baeten D. Axial spondyloarthritis. *Nature reviews Disease primers* 2015;1:15013.

45.Poddubnyy D. Spondyloarthritiden. In: Suttrop N, Möckel M, Siegmund B, Dietel M, Hrsg. *Harrisons Innere Medizin*. 19. Version. Berlin: ABW-Wissenschaftsverlag, 2016: 2664-2667

46.Myers WA, Gottlieb AB, Mease P. Psoriasis and psoriatic arthritis: clinical features and disease mechanisms. *Clinics in dermatology* 2006;24:438-47.

47.Nossent JC, Gran JT. Epidemiological and clinical characteristics of psoriatic arthritis in northern Norway. *Scand J Rheumatol* 2009;38:251-5.

48. Amherd-Hoekstra A, Naher H, Lorenz HM, Enk AH. Psoriatic arthritis: a review. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 2010;8:332-9.
49. Mrowietz U, Reich K. Psoriasis--new insights into pathogenesis and treatment. *Deutsches Arzteblatt international* 2009;106:11-8, quiz 9.
50. Smolen JS, Aletaha D, Koeller M, Weisman MH, Emery P. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. *The Lancet* 2007;370:1861-74.
51. Aletaha D, Smolen JS. Effectiveness profiles and dose dependent retention of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. An observational study. *The Journal of Rheumatology* 2002;29:1631-8.
52. van der Laken CJ, Voskuyl AE, Roos JC, Stigter van Walsum M, de Groot ER, Wolbink G, Dijkmans BA, Aarden LA. Imaging and serum analysis of immune complex formation of radiolabelled infliximab and anti-infliximab in responders and non-responders to therapy for rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66:253-6.
53. de Vries MK, Wolbink GJ, Stapel SO, de Vrieze H, van Denderen JC, Dijkmans BA, Aarden LA, van der Horst-Bruinsma IE. Decreased clinical response to infliximab in ankylosing spondylitis is correlated with anti-infliximab formation. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66:1252-4.
54. Garces S, Demengeot J, Benito-Garcia E. The immunogenicity of anti-TNF therapy in immune-mediated inflammatory diseases: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1947-55.
55. Ben-Horin S, Yavzori M, Katz L, Kopylov U, Picard O, Fudim E, Coscas D, Bar-Meir S, Goldstein I, Chowers Y. The immunogenic part of infliximab is the F(ab')₂, but measuring antibodies to the intact infliximab molecule is more clinically useful. *Gut* 2011;60:41-8.
56. Magdelaine-Beuzelin C, Vermeire S, Goodall M, Baert F, Noman M, Assche GV, Ohresser M, Degenne D, Dugoujon JM, Jefferis R, Rutgeerts P, Lefranc MP, Watier H. IgG1 heavy chain-coding gene polymorphism (G1m allotypes) and development of antibodies-to-infliximab. *Pharmacogenetics and genomics* 2009;19:383-7.
57. Arends S, Lebbink HR, Spoorenberg A, Bungener LB, Roozendaal C, van der Veer E, Houtman PM, Griep EN, Limburg PC, Kallenberg CG, Wolbink GJ, Brouwer E. The formation of autoantibodies and antibodies to TNF-alpha blocking agents in relation to clinical response in patients with ankylosing spondylitis. *Clinical and experimental rheumatology* 2010;28:661-8.
58. 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 and rheumatism* 2006;54:711-5.
59. van Schouwenburg PA, Krieckaert CL, Rispens T, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. Long-term measurement of anti-adalimumab using pH-shift-anti-idiotypic antigen binding test shows predictive value and transient antibody formation. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:1680-6.
60. Svenson M, Geborek P, Saxne T, Bendtzen K. Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals: assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. *Rheumatology (Oxford, England)* 2007;46:1828-34.
61. Jamnitski A, Bartelds GM, Nurmohamed MT, van Schouwenburg PA, van Schaardenburg D, Stapel SO, Dijkmans BA, Aarden L, Wolbink GJ. The presence or absence of antibodies to infliximab or adalimumab determines the outcome of switching to etanercept. *Annals of the rheumatic diseases* 2011;70:284-8.

62. Mok CC, van der Kleij D, Wolbink GJ. Drug levels, anti-drug antibodies, and clinical efficacy of the anti-TNF α biologics in rheumatic diseases. *Clinical rheumatology* 2013;32:1429-35.
63. Frederiksen MT, Ainsworth MA, Brynskov J, Thomsen OO, Bendtzen K, Steenholdt C. Antibodies against infliximab are associated with de novo development of antibodies to adalimumab and therapeutic failure in infliximab-to-adalimumab switchers with IBD. *Inflammatory bowel diseases* 2014;20:1714-21.
64. Radstake TR, Svenson M, Eijsbouts AM, van den Hoogen FH, Enevold C, van Riel PL, Bendtzen K. Formation of antibodies against infliximab and adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:1739-45.
65. van Schouwenburg PA, Bartelds GM, Hart MH, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. A novel method for the detection of antibodies to adalimumab in the presence of drug reveals "hidden" immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *Journal of immunological methods* 2010;362:82-8.
66. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BAC, Tak PP, Wolbink GJ. Clinical response to adalimumab: relationship to anti-adalimumab antibodies and serum adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2007;66:921-6.
67. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridg RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *mAbs* 2010;2:256-65.
68. Bendtzen K, Ainsworth M, Steenholdt C, Thomsen OO, Brynskov J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor- α antibodies. *Scandinavian journal of gastroenterology* 2009;44:774-81.
69. Kosmac M, Avcin T, Toplak N, Simonini G, Cimaz R, Curin Serbec V. Exploring the binding sites of anti-infliximab antibodies in pediatric patients with rheumatic diseases treated with infliximab. *Pediatric research* 2011;69:243-8.
70. Gunn GR, 3rd, Sealey DC, Jamali F, Meibohm B, Ghosh S, Shankar G. From the bench to clinical practice: understanding the challenges and uncertainties in immunogenicity testing for biopharmaceuticals. *Clinical and experimental immunology* 2016;184:137-46.
71. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: II. Clinical Relevance of Methods Used for Anti-Drug Antibody Detection. *Front Immunol* 2015;6:109.
72. Rojas JR, Taylor RP, Cunningham MR, Rutkoski TJ, Vennarini J, Jang H, Graham MA, Geboes K, Rousselle SD, Wagner CL. Formation, distribution, and elimination of infliximab and anti-infliximab immune complexes in cynomolgus monkeys. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2005;313:578-85.
73. van Schouwenburg PA, van de Stadt LA, de Jong RN, van Buren EE, Kruithof S, de Groot E, Hart M, van Ham SM, Rispens T, Aarden L, Wolbink GJ, Wouters D. Adalimumab elicits a restricted anti-idiotypic antibody response in autoimmune patients resulting in functional neutralisation. *Annals of the rheumatic diseases* 2013;72:104-9.
74. Smolen J, Landewé RB, Mease P, Brzezicki J, Mason D, Luijtens K, van Vollenhoven RF, Kavanaugh A, Schiff M, Burmester GR, Strand V, Vencovský J, van der Heijde D. Efficacy and safety of certolizumab pegol plus methotrexate in active rheumatoid arthritis: the RAPID 2 study. A randomised controlled trial. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:797-804.
75. Korswagen LA, Bartelds GM, Krieckaert CL, Turkstra F, Nurmohamed MT, van Schaardenburg D, Wijbrandts CA, Tak PP, Lems WF, Dijkmans BA, van Vugt RM,

Wolbink GJ. Venous and arterial thromboembolic events in adalimumab-treated patients with antiadalimumab antibodies: a case series and cohort study. *Arthritis and rheumatism* 2011;63:877-83.

76. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Wolbink GJ, de Vries N, Tak PP, Dijkmans BA, Crusius JB, van der Horst-Bruinsma IE. Anti-adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms. *Arthritis and rheumatism* 2009;60:2541-2.

77. Astermark J, Oldenburg J, Carlson J, Pavlova A, Kavakli K, Berntorp E, Lefvert AK. Polymorphisms in the TNFA gene and the risk of inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood* 2006;108:3739-45.

78. Jani M, Barton A, Warren RB, Griffiths CEM, Chinoy H. The role of DMARDs in reducing the immunogenicity of TNF inhibitors in chronic inflammatory diseases. *Rheumatology (Oxford, England)* 2014;53:213-22.

79. Krieckaert CL, Bartelds GM, Lems WF, Wolbink GJ. The effect of immunomodulators on the immunogenicity of TNF-blocking therapeutic monoclonal antibodies: a review. *Arthritis Res Ther* 2010;12:217.

80. Maini RN, Breedveld FC, Kalden JR, Smolen JS, Davis D, Macfarlane JD, Antoni C, Leeb B, Elliott MJ, Woody JN, Schaible TF, Feldmann M. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 1998;41:1552-63.

81. Breban M, Ravaud P, Claudepierre P, Baron G, Henry YD, Hudry C, Euller-Ziegler L, Pham T, Solau-Gervais E, Chary-Valckenaere I, Marcelli C, Perdriger A, Le Loet X, Wendling D, Fautrel B, Fournie B, Combe B, Gaudin P, Jousse S, Mariette X, Baleyrier A, Trape G, Dougados M. Maintenance of infliximab treatment in ankylosing spondylitis: results of a one-year randomized controlled trial comparing systematic versus on-demand treatment. *Arthritis and rheumatism* 2008;58:88-97.

82. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J-J, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P. Pure Red-Cell Aplasia and Antierythropoietin Antibodies in Patients Treated with Recombinant Erythropoietin. *New England Journal of Medicine* 2002;346:469-75.

83. Hwang WY, Foote J. Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods (San Diego, Calif)* 2005;36:3-10.

84. de Vries MK, van der Horst-Bruinsma IE, Nurmohamed MT, Aarden LA, Stapel SO, Peters MJ, van Denderen JC, Dijkmans BA, Wolbink GJ. Immunogenicity does not influence treatment with etanercept in patients with ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2009;68:531-5.

85. Moreland LW, Schiff MH, Baumgartner SW, Tindall EA, Fleischmann RM, Bulpitt KJ, Weaver AL, Keystone EC, Furst DE, Mease PJ, Ruderman EM, Horwitz DA, Arkfeld DG, Garrison L, Burge DJ, Blosch CM, Lange ML, McDonnell ND, Weinblatt ME. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 1999;130:478-86.

86. Bartelds GM, de Groot E, Nurmohamed MT, Hart MH, van Eede PH, Wijbrandts CA, Crusius JB, Dijkmans BA, Tak PP, Aarden L, Wolbink GJ. Surprising negative association between IgG1 allotype disparity and anti-adalimumab formation: a cohort study. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R221.

87. Stickler MM, Reddy A, Xiong JM, Hinton PR, DuBridge R, Harding FA. The human G1m1 allotype associates with CD4+ T-cell responsiveness to a highly conserved IgG1 constant region peptide and confers an asparaginyl endopeptidase cleavage site. *Genes and Immunity* 2011;12:213-21.

88. Gorovits B, Baltrukonis DJ, Bhattacharya I, Birchler MA, Finco D, Sikkema D, Vincent MS, Lula S, Marshall L, Hickling TP. Immunoassay methods used in clinical studies for the detection of anti-drug antibodies to adalimumab and infliximab. *Clinical and experimental immunology* 2018;192:348-65.
89. Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink G-J, Killestein J, de Groot ER, Aarden LA, Rispens T. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *Journal of immunological methods* 2011;372:196-203.
90. Afonso J, Lopes S, Goncalves R, Caldeira P, Lago P, Tavares de Sousa H, Ramos J, Goncalves AR, Ministro P, Rosa I, Vieira AI, Coelho R, Tavares P, Soares J, Sousa AL, Carvalho D, Sousa P, da Silva JP, Meira T, Silva Ferreira F, Dias CC, Chowery Y, Ben-Horin S, Magro F. Detection of anti-infliximab antibodies is impacted by antibody titer, infliximab level and IgG4 antibodies: a systematic comparison of three different assays. *Therapeutic advances in gastroenterology* 2016;9:781-94.
91. Hart MH, de Vrieze H, Wouters D, Wolbink GJ, Killestein J, de Groot ER, Aarden LA, Rispens T. Differential effect of drug interference in immunogenicity assays. *Journal of immunological methods* 2011;372:196-203.
92. Imaeda H, Andoh A, Fujiyama Y. Development of a new immunoassay for the accurate determination of anti-infliximab antibodies in inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology* 2012;47:136-43.
93. van der Heijde D. Radiographic progression in rheumatoid arthritis: does it reflect outcome? Does it reflect treatment? *Annals of the rheumatic diseases* 2001;60 Suppl 3:iii47-50.
94. van Riel PL, Renskers L. The Disease Activity Score (DAS) and the Disease Activity Score using 28 joint counts (DAS28) in the management of rheumatoid arthritis. *Clinical and experimental rheumatology* 2016;34:S40-s4.
95. Kiltz U, Rudwaleit M, Sieper J, Braun J. [Evidence-based recommendations on diagnostics and therapy of axial spondyloarthritis : S3 guidelines of the German Society of Rheumatology (DGRh) in cooperation with the Association of the Scientific Medical Societies in Germany (AWMF)]. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2017;76:111-7.
96. Bartelds GM, Wijbrandts CA, Nurmohamed MT, Stapel S, Lems WF, Aarden L, Dijkmans BA, Tak PP, Wolbink GJ. Anti-infliximab and anti-adalimumab antibodies in relation to response to adalimumab in infliximab switchers and anti-tumour necrosis factor naive patients: a cohort study. *Annals of the rheumatic diseases* 2010;69:817-21.
97. Hyrich KL, Lunt M, Watson KD, Symmons DP, Silman AJ. Outcomes after switching from one anti-tumor necrosis factor alpha agent to a second anti-tumor necrosis factor alpha agent in patients with rheumatoid arthritis: results from a large UK national cohort study. *Arthritis and rheumatism* 2007;56:13-20.
98. 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. *Clinical rheumatology* 2008;27:1021-8.
99. Wijbrandts CA, Dijkgraaf MG, Kraan MC, Vinkenoog M, Smeets TJ, Dinant H, Vos K, Lems WF, Wolbink GJ, Sijpkens D, Dijkmans BA, Tak PP. The clinical response to infliximab in rheumatoid arthritis is in part dependent on pretreatment tumour necrosis factor alpha expression in the synovium. *Annals of the rheumatic diseases* 2008;67:1139-44.
100. van Gestel AM, Haagsma CJ, van Riel PL. Validation of rheumatoid arthritis improvement criteria that include simplified joint counts. *Arthritis and rheumatism* 1998;41:1845-50.

101. Hensor EM, Emery P, Bingham SJ, Conaghan PG. Discrepancies in categorizing rheumatoid arthritis patients by DAS-28(ESR) and DAS-28(CRP): can they be reduced? *Rheumatology (Oxford, England)* 2010;49:1521-9.
102. Fransen J, van Riel PL. The Disease Activity Score and the EULAR response criteria. *Clinical and experimental rheumatology* 2005;23:S93-9.
103. Kiltz U, Rudwaleit M, Sieper J, Krause D, Hermann K-G, Braun J. DGRh-S3-Leitlinie Axiale Spondyloarthritis inklusive Morbus Bechterew und Frühformen. *Zeitschrift für Rheumatologie* 2014;73:49-65.
104. Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A. A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 1994;21:2286-91.
105. Deutsche Vereinigung Morbus Bechterew e.V. Bundesverband. Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) zur Erfassung der Krankheitsaktivität. (zitiert am 02.03.2019) URL: <https://www.bechterew.de/fileadmin/Dokumente/basdai.pdf>
106. Sanquin Blood Supply Foundation. MabTrack level infliximab. Version 5. publication date 22.05.2018 (accessed at 13.08.2018). URL: <https://www.sanquin.org/products-and-services/reagents/products/immune-reagents/biologics/m2920>
107. Sanquin Blood Supply Foundation. MabTrack level adalimumab. Version 5. publication date 18.05.2018 (accessed at 02.03.2019) URL: <https://www.sanquin.org/products-and-services/reagents/products/immune-reagents/biologics/m2910>
108. Immundiagnostik AG. IDKmonitor® Infliximab drug level, ELISA. Version gültig ab 23.08.2015 (zitiert am 13.08.2018). URL: ["http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/klinische-immunologie.html?tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Ban%5D=K%209655&tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Bag%5D=407&cHash=04424ba842"](http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/klinische-immunologie.html?tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Ban%5D=K%209655&tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Bag%5D=407&cHash=04424ba842)
109. Immundiagnostik AG. IDKmonitor® Infliximab total ADA ELISA. Version gültig ab 23.04.2015 (zitiert am 13.08.2018). URL: ["http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/klinische-immunologie.html?tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Ban%5D=K%209654&tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Bag%5D=407&cHash=b514c5491f"](http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/klinische-immunologie.html?tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Ban%5D=K%209654&tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Bag%5D=407&cHash=b514c5491f)
110. Roque Ramos L, Barosa R, Nunes A, Regalado A, Vieira A, Freitas J, Demengeot J, Garcês S (2016). P545 The effect of total and free anti-drug antibodies on infliximab pharmacokinetics between 2 drug administrations. *Journal of Crohn's and Colitis* 2016;10:S377
111. Immundiagnostik AG. IDKmonitor® Infliximab free ADA ELISA. Version gültig ab 21.08.2015 (zitiert am 13.08.2018). URL: http://www.immundiagnostik.com/home/produkte/testkits-assays/klinische-immunologie.html?tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Ban%5D=K%209650&tx_mokom01immunprodukte_pi1%5Bag%5D=407&cHash=3079e87a8a
112. Pouw MF, Krieckaert CL, Nurmohamed MT, van der Kleij D, Aarden L, Rispens T, Wolbink G. Key findings towards optimising adalimumab treatment: the concentration-effect curve. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;74:513-8.
113. Mazor Y, Almog R, Kopylov U, Ben Hur D, Blatt A, Dahan A, Waterman M, Ben-Horin S, Chowers Y. Adalimumab drug and antibody levels as predictors of clinical and laboratory response in patients with Crohn's disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2014;40:620-8.
114. Mitchell RA, Shuster C, Shahidi N, Galorport C, DeMarco ML, Rosenfeld G, Enns RA, Bressler B. The Utility of Infliximab Therapeutic Drug Monitoring among Patients with

Inflammatory Bowel Disease and Concerns for Loss of Response: A Retrospective Analysis of a Real-World Experience. *Canadian journal of gastroenterology & hepatology* 2016;2016:5203898.

115. Berufsverband deutscher Rheumatologen. Autoimmunbedingte, entzündlich-rheumatische Krankheiten. (zitiert am 11.01.2015) URL: <http://www.bdrh.de/informationen-fuer-patienten/wissenswertes-ueber-rheuma/rheumatoide-arthritis.htm>

116. Bendtzen K. Immunogenicity of Anti-TNF- α Biotherapies: I. Individualized Medicine Based on Immunopharmacological Evidence. *Frontiers in Immunology* 2015;6:152.

117. Ben-Horin S, Mazor Y, Yanai H, Ron Y, Kopylov U, Yavzori M, Picard O, Fudim E, Maor Y, Lahat A, Coscas D, Eliakim R, Dotan I, Chowers Y. The decline of anti-drug antibody titres after discontinuation of anti-TNFs: implications for predicting re-induction outcome in IBD. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 2012;35:714-22.

118. Krintel SB, Grunert VP, Hetland ML, Johansen JS, Rothfuss M, Palermo G, Essioux L, Klause U. The frequency of anti-infliximab antibodies in patients with rheumatoid arthritis treated in routine care and the associations with adverse drug reactions and treatment failure. *Rheumatology* 2013;52:1245-53.

119. Thomas SS, Borazan N, Barroso N, Duan L, Taroumian S, Kretzmann B, Bardales R, Elashoff D, Vangala S, Furst DE. Comparative Immunogenicity of TNF Inhibitors: Impact on Clinical Efficacy and Tolerability in the Management of Autoimmune Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2015;29:241-58.

120. Strand V, Balsa A, Al-Saleh J, Barile-Fabris L, Horiuchi T, Takeuchi T, Lula S, Hawes C, Kola B, Marshall L. Immunogenicity of Biologics in Chronic Inflammatory Diseases: A Systematic Review. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2017;31:299-316.

121. Zochling J, van der Heijde D, Dougados M, Braun J. Current evidence for the management of ankylosing spondylitis: a systematic literature review for the ASAS/EULAR management recommendations in ankylosing spondylitis. *Annals of the rheumatic diseases* 2006;65:423-32.

122. Lemos LL, de Oliveira Costa J, Almeida AM, Junior HO, Barbosa MM, Kakehasi AM, Acurcio FA. Treatment of psoriatic arthritis with anti-TNF agents: a systematic review and meta-analysis of efficacy, effectiveness and safety. *Rheumatology international* 2014;34:1345-60.

123. Martina B, Giulio FE. Ten-Year Drug Survival of Anti-TNF Agents in the Treatment of Inflammatory Arthritides. *Drug Development Research* 2014;75:S38-S41.

124. Jani M, Dixon WG, Lunt M, De Cock D, Isaacs J, Morgan A, Wilson A, Plant D, Watson K, Barton A, Hyrich K. OP0229 The association of biologic drug-levels with infection risk: results from the british society for rheumatology biologics register for rheumatoid arthritis 2018.

125. Mok CC, Tsai WC, Chen DY, Wei JC. Immunogenicity of anti-TNF biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert opinion on biological therapy* 2016;16:201-11.

126. 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;65:657-61.

127. Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, Saxne T, Geborek P. Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2005;32:1213-8.

128. Naz SM, Symmons DP. Mortality in established rheumatoid arthritis. Best practice & research Clinical rheumatology 2007;21:871-83.
129. Rigby WFC, Lampl K, Low JM, Furst DE. Review of Routine Laboratory Monitoring for Patients with Rheumatoid Arthritis Receiving Biologic or Nonbiologic DMARDs. International journal of rheumatology 2017;2017:9614241.
130. Garces S, Antunes M, Benito-Garcia E, da Silva JC, Aarden L, Demengeot J. A preliminary algorithm introducing immunogenicity assessment in the management of patients with RA receiving tumour necrosis factor inhibitor therapies. Annals of the rheumatic diseases 2014;73:1138-43.
131. Afif W, Loftus EV, Jr., Faubion WA, Kane SV, Bruining DH, Hanson KA, Sandborn WJ. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease. The American journal of gastroenterology 2010;105:1133-9.
132. Liefferinckx C, Minsart C, Toubreau JF, Cremer A, Amininejad L, Quertinmont E, Deviere J, Gils A, van Gossum A, Franchimont D. Infliximab Trough Levels at Induction to Predict Treatment Failure During Maintenance. Inflammatory bowel diseases 2017;23:1371-81.
133. 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;305:1460-8.
134. Mulleman D, Meric JC, Paintaud G, Ducourau E, Magdelaine-Beuzelin C, Valat JP, Goupille P. Infliximab concentration monitoring improves the control of disease activity in rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2009;11:R178.
135. Chen DY, Chen YM, Hsieh TY, Hung WT, Hsieh CW, Chen HH, Tang KT, Lan JL. Drug trough levels predict therapeutic responses to dose reduction of adalimumab for rheumatoid arthritis patients during 24 weeks of follow-up. Rheumatology (Oxford, England) 2016;55:143-8.
136. Bouman C, van Herwaarden N, van den Hoogen F, van der Maas A, van den Bemt B, den Broeder AA. Prediction of successful dose reduction or discontinuation of adalimumab, etanercept, or infliximab in rheumatoid arthritis patients using serum drug levels and antidrug antibody measurement. Expert opinion on drug metabolism & toxicology 2017;13:597-604.
137. Meric JC, Mulleman D, Ducourau E, Lauferon F, Miow Lin DC, Watier H, Goupille P, Paintaud G. Therapeutic drug monitoring of infliximab in spondyloarthritis: an observational open-label study. Therapeutic drug monitoring 2011;33:411-6.
138. Martelli L, Olivera P, Roblin X, Attar A, Peyrin-Biroulet L. Cost-effectiveness of drug monitoring of anti-TNF therapy in inflammatory bowel disease and rheumatoid arthritis: a systematic review. Journal of gastroenterology 2017;52:19-25.
139. Sanchez-Hernandez JG, Rebollo N, Munoz F, Martin-Suarez A, Calvo MV. Therapeutic drug monitoring of tumour necrosis factor inhibitors in the management of chronic inflammatory diseases. Annals of clinical biochemistry 2018;56:4563218782286.
140. Gils A. Combining Therapeutic Drug Monitoring with Biosimilars, a Strategy to Improve the Efficacy of Biologicals for Treating Inflammatory Bowel Diseases at an Affordable Cost. Digestive diseases (Basel, Switzerland) 2017;35:61-8.
141. El Amrani M, Göbel C, Egas AC, Nierkens S, Hack CE, Huitema ADR, van Maarseveen EM. Quantification of neutralizing anti-drug antibodies and their neutralizing capacity using competitive displacement and tandem mass spectrometry: Infliximab as proof of principle. Journal of Translational Autoimmunity 2019;1:100004.

142. Philippidis A. Genetic Engineering % Biotechnology News. The top 15 Best-Selling Drugs in 2016 (zitiert am 04.08.2018) URL: <http://www.genengnews.com/the-lists/the-top-15-best-selling-drugs-of-2016/77900868>
143. Braun J, Kudrin A. Switching to biosimilar infliximab (CT-P13): Evidence of clinical safety, effectiveness and impact on public health. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization* 2016;44:257-66.
144. Hausteil R. Saving money in the European healthcare systems with biosimilars 2012.
145. Benucci M, Gobbi FL, Bandinelli F, Damiani A, Infantino M, Grossi V, Manfredi M, Parisi S, Fusaro E, Batticciotto A, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Meacci F. Safety, efficacy and immunogenicity of switching from innovator to biosimilar infliximab in patients with spondyloarthritis: a 6-month real-life observational study. *Immunologic research* 2017;65:419-22.
146. Smits LJ, Derikx LA, de Jong DJ, Boshuizen RS, van Esch AA, Drenth JP, Hoentjen F. Clinical Outcomes Following a Switch from Remicade(R) to the Biosimilar CT-P13 in Inflammatory Bowel Disease Patients: A Prospective Observational Cohort Study. *Journal of Crohn's & colitis* 2016;10:1287-93.
147. Jorgensen KK, Olsen IC, Goll GL, Lorentzen M, Bolstad N, Haavardsholm EA, Lundin KEA, Mork C, Jahnsen J, Kvien TK. Switching from originator infliximab to biosimilar CT-P13 compared with maintained treatment with originator infliximab (NOR-SWITCH): a 52-week, randomised, double-blind, non-inferiority trial. *Lancet* 2017;389:2304-16.
148. Schmitz EMH, Benoy-De Keuster S, Meier AJL, Scharnhorst V, Traksel RAM, Broeren MAC, Derijks LJJ. Therapeutic drug monitoring (TDM) as a tool in the switch from infliximab innovator to biosimilar in rheumatic patients: results of a 12-month observational prospective cohort study. *Clinical rheumatology* 2017;36:2129-34.
149. Listing J, Kekow J, Manger B, Burmester G-R, Pattloch D, Zink A, Strangfeld A. Mortality in rheumatoid arthritis: the impact of disease activity, treatment with glucocorticoids, TNF α inhibitors and rituximab. *Annals of the rheumatic diseases* 2015;74:415-21.
150. Porter D, Gadsby K, Thompson P, White J, McClinton C, Oliver S. DAS28 and Rheumatoid Arthritis: The Need for Standardization. *Musculoskeletal care* 2011;9:222-7.

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekülstruktur der TNF- α -Inhibitoren.....	15
Abbildung 2: Immunogenität von Biopharmazeutika.	19
Abbildung 3: Flowchart zur Probengewinnung- und bearbeitung.	29
Tabelle 1: DAS-28 (BSG)/(CRP) Interpretation	31
Tabelle 2: EULAR-Therapieansprechen anhand des DAS-28.....	31
Tabelle 3: therapeutische Konzentrationen Infliximab nach Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande)	34
Abbildung 4: ELISA-Prinzip zum Nachweis von Adalimumab bzw. Infliximab	37
Tabelle 4: therapeutische Konzentrationen Adalimumab nach Hersteller Sanquin (Amsterdam, Niederlande)	35
Abbildung 5: ELISA-Prinzip zum Nachweis von totalen ADA gegen Adalimumab bzw. Infliximab.	37
Abbildung 6: ELISA-Prinzip zum Nachweis von freien ADA gegen Adalimumab/Infliximab.	39
Tabelle 5: Studiencharakteristika	42
Tabelle 6: Deskriptive Statistik der Patient*innen unter Adalimumab.....	44
Abbildung 7: Adalimumabkonzentrationen bei N=10 Patient*innen ohne tADA.....	45
Abbildung 8: Adalimumabkonzentrationen bei N=7 Patient*innen mit tADA	45
Tabelle 7: Krankheitsaktivität unter Adalimumab über die Messzeitpunkte gemessen am BASDAI und DAS-28.....	46
Tabelle 8: Deskriptive Statistik der Patient*innen unter Infliximab.....	47
Abbildung 9: Infliximabkonzentrationen bei N=11 Patient*innen ohne tADA	48
Abbildung 10: Infliximabkonzentrationen bei N=19 Patient*innen mit tADA	48
Tabelle 9: Krankheitsaktivität unter Infliximab über die Messzeitpunkte gemessen am BASDAI und DAS-28.....	49
Abbildung 11: Korrelation von Adalimumabkonzentration mit tADA-Titer zum 1. und 2. ZP	50
Abbildung 12: Unterschiede der Adalimumabkonzentrationen bei Patient*innen mit und ohne tADA.....	51
Abbildung 13: Korrelation der Infliximabkonzentration mit tADA-Titer zum 1. und 2. ZP	51

Abbildung 14: Unterschiede der Infliximabkonzentrationen bei Patient*innen mit und ohne tADA	52
Abbildung 15: Unterschiede der Adalimumabkonzentrationen bei Patient*innen mit und ohne fADA.....	53
Abbildung 16: Korrelation von Infliximabkonzentration mit fADA-Titer zum 1. und 2. ZP	54
Abbildung 17: Unterschiede der Infliximabkonzentrationen bei Patient*innen mit und ohne fADA	54
Tabelle 10: Adalimumabkonzentrationen der jeweiligen Krankheitsaktivitäts-kategorien gemessen anhand DAS-28 und BASDAI zum 1. und 2. ZP.	55
Tabelle 11: Infliximabkonzentrationen der jeweiligen Krankheitsaktivitäts-kategorien gemessen anhand DAS-28 und BASDAI zum 1.ZP	55
Abbildung 18: Krankheitsaktivität gemessen am BASDAI in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Infliximab	57
Tabelle 12: tADA/fADA-Prävalenz der Krankheitsbilder bei Patient*innen unter Adalimumab	58
Tabelle 13: tADA/fADA- Prävalenz der Krankheitsbilder bei Patient*innen unter Infliximab	58
Abbildung 19: Unterschiede in der tADA-Prävalenz bei Adalimumab und Infliximab	59
Abbildung 20: Unterschiede in der fADA-Prävalenz bei Adalimumab und Infliximab ...	59
Abbildung 21: fADA in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Adalimumab.....	60
Abbildung 22: fADA in Abhängigkeit des tADA-Titers bei Infliximab.....	61
Tabelle 14: cDMARD-Therapie bei Patient*innen unter Adalimumab	62
Tabelle 15: cDMARD Therapie bei Patient*innen unter Infliximab	62
Tabelle 16: Interassay Varianz zwischen den Assays zur Erfassung Therapieantikörperkonzentration.....	63
Tabelle 17: ADA-Prävalenz in Metaanalysen	68
Tabelle 18: ADA-Prävalenz bei Adalimumab und Infliximab in Metaanalysen	70
Abbildung 23: Entscheidungsalgorithmus zum Vorgehen bei Wirkverlust von TNF-Inhibitoren	77

11 Tabellarischer Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Helene von Bremen, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „**Drugmonitoring von TNF- α -Inhibitoren bei chronisch - rheumatischen Erkrankungen im klinischen Alltag**“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

13 Danksagung

Diese Promotionsschrift wurden von vielen Menschen unterstützt, denen ich meinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Eugen Feist, der meine Arbeit mit viel Verständnis unterstützte und mir stehst motivierend, zuversichtlich und beratend zur Seite stand. Unsere Zusammenarbeit habe ich als sehr konstruktiv und bereichernd empfunden.

Ich danke Prof. Dr. med. Gerd Burmester für die Unterstützung meiner Arbeit.

Ich danke Dr. Lorena Martinez Gamboa, die den experimentellen Teil dieser Arbeit fantastisch betreute, immer ein offenes Ohr für mich hatte und maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beitrug.

Ich danke Prof. Dr. Denis Poddubbnny für die Bereitstellung von Seren und der entsprechenden Patient*innencharakteristik.

Weiter gilt mein Dank den Mitarbeiter*innen der Abteilung für Neue Therapien der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie und klinische Immunologie, Charité Campus Mitte, sowie den Mitarbeiter*innen der Rheumatologischen Fachambulanz für die Unterstützung und die angenehme und freundliche Zusammenarbeit. Besonders möchte ich Dr. Jan Zernicke für die umfassende Unterstützung meiner Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, Barbara von Bremen und Michael Sieberath-von Bremen, die mich auf dem Weg durch mein Studium und diese Arbeit begleitet und mich stets liebevoll und anspornend unterstützen. Zu guter Letzt danke ich Jonas Auer, der für mich sowohl als wertvoller und konstruktiver Ratgeber, als auch emotional, ein wichtiger Rückhalt war. Danke für deinen Beistand und deine Geduld.