

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Gerir a imunogenicidade em anticorpos terapêuticos

Ana Catarina da Silva Ferreira Sebastião

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2017

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Gerir a imunogenicidade em anticorpos terapêuticos

Ana Catarina da Silva Ferreira Sebastião

Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de
Farmácia

Orientador: Professor Doutor João Gonçalves

2017

Resumo

Os anticorpos monoclonais são uma terapêutica altamente específica, possuem diminutos efeitos adversos e são o foco da pesquisa para tratamento das doenças de carácter moderado a grave, como as doenças inflamatórias crónicas, destacando a artrite reumatóide, as doenças inflamatórias do intestino e a psoríase. Para o tratamento destas doenças é de destacar o uso de construções de anticorpos que visam o $TNF\alpha$, nomeadamente o Infliximab e o Adalimumab. Estes fármacos podem reduzir drasticamente a actividade da doença e em alguns doentes induzem a sua remissão total. Porém nem todos os doentes possuem resposta ao tratamento e se possuírem, pode não ser favorável. Os doentes podem apresentar uma falha na resposta à terapêutica, as razões para essa falha de resposta são parcialmente conhecidas, sabe-se que uma das razões é o surgimento de imunogenicidade. A imunogenicidade existe em medicamentos originais e biossimilares podendo surgir com impactos diferentes. Esta é influenciada por vários factores, de destacar os factores relacionados com o produto e com o doente. Uma das facetas da imunogenicidade é a capacidade que os doentes desenvolvam anticorpos anti-fármaco (ADAs), que podem ser anticorpos neutralizantes ou não neutralizantes, sendo que ambos contribuem para a falha do tratamento. A necessidade de monitorizar os doentes para níveis circulantes de fármacos anti- $TNF\alpha$ funcionais e de ADAs é extremamente necessário para o sucesso do tratamento. O uso de imunossuppressores concomitantemente com os mAb, o uso de doses ideais entre outros podem ajudar na optimização da terapêutica do doente. Deve-se manter a adaptação individual da terapêutica ao doente, de modo a atingir padrões de efectividade e tendo em conta o custo-benefício a longo prazo. Num futuro próximo, o desafio para quem está a desenvolver novos fármacos biológicos é tentar minimizar os efeitos da imunogenicidade e o seu impacto no doente.

Palavras Chave

Anticorpo terapêutico

Imunogenicidade

Infliximab

Adalimumab

Abstract

Monoclonal antibodies are a highly specific therapy, have minor adverse effects and are the focus of research for the treatment of moderate to severe diseases, such as chronic inflammatory diseases, rheumatoid arthritis, inflammatory bowel diseases and psoriasis. For the treatment of these diseases, the use of antibody constructs targeting TNF α should be highlighted, namely Infliximab and Adalimumab. These drugs can drastically reduce disease activity and in some patients induce their complete remission. However, not all patients have a response to treatment and if they do, it may not be favorable. Patients may show a failure in response to therapy, the reasons for this failure to respond are partially known, one of the reasons known to be the emergence of immunogenicity. Immunogenicity exists in original and biosimilars drugs and may arise with different impacts. Immunogenicity is influenced by several factors, the more relevant being related to the product and the patient.

One of the facets of immunogenicity consists of the ability of patients to develop anti-drug antibodies (ADAs): they may be neutralizing or non-neutralizing antibodies, both of which contribute to failure of treatment. The need to monitor patients for circulating levels of functional anti-TNF drugs and ADAs is extremely necessary for successful treatment. The use of immunosuppressors concomitantly with mAbs, the use of optimal doses among others, may aid in the optimization of patient therapy. Individual treatment adaptation to the patient should be maintained in order to achieve standards of effectiveness and taking into account long-term cost-benefit. The challenge for anyone developing new biological drugs is to try to minimize the effects of immunogenicity and its impact on the patient in the near future.

Keywords

Therapeutic antibody

Immunogenicity

Infliximab

Adalimumab

Índice

Resumo	3
Palavras Chave	3
Abstract	4
Keywords	4
Índice imagens	6
Abreviaturas	6
Introdução	7
Objectivos	9
Materiais e Métodos	10
Resultados e Discussão	10
Biossimilares	10
Doenças alvo dos anticorpos	11
Imunogenicidade	12
<i>ADAs e Tolerância imunológica</i>	12
<i>PK- Anticorpos neutralizantes e não neutralizantes</i>	14
<i>Biossimilares</i>	15
<i>Factores que influenciam a Imunogenicidade</i>	15
<i>Glicosilação</i>	20
<i>Consequências da imunogenicidade</i>	21
Estudos de detecção de ADAs.....	23
<i>Interferentes</i>	23
<i>Métodos de detecção de Anticorpos</i>	23
Imunogenicidade dos mAbs	26
<i>Anticorpos</i>	27
<i>PK dos mAbs e imunogenicidade</i>	28
<i>Consequências clínicas da imunogenicidade dos mAbs</i>	29
<i>Dosagem dos mAbs</i>	30
<i>Reacção cruzada em anticorpos</i>	31
<i>Uso de imunossuppressores na terapia com mAbs</i>	32
Farmacovigilância	34
Conclusão	36
Referências Bibliográficas	37
Anexos	49

Índice imagens

Ilustração 1-Anticorpo

Ilustração 2- Factores que influenciam a imunogenicidade

Ilustração 3- Rede complexa sobre a imunogenicidade

Ilustração 4- RGA

Ilustração 5-Resposta dos ADAs

Ilustração 6-% de imunogenicidades nos mAbs

Abreviaturas

ADA- Anti-drug antibodies

AIM- Autorização de introdução no mercado

ANA- Anti -Nuclear antibody

APC- Antigen-presenting cell

AR- Artrite Reumatóide

CD- Crohn's disease

CDR- Cluster of differentiation regions

ELISA- Enzyme-linked immunosorbent assay

FDA- Food and Drug Administration

IBD- Inflammatory bowel disease

IFX-Infliximab

IL- Interleucina

IM- Intra-muscular

IMC- Índice de massa corporal

IV- Intravenoso

LES- Lúpus Eritematoso Sistémico

mAb- Monoclonal antibody

MHC-Major histocompatibility complex

MTX-Metotrexato

OMS- Organização Mundial da Saúde

PAHA- Procainamide hydroxylamine

PCR- Proteína C reactiva

PGR- Plano Gestão de Risco

PTMs- Posttranslational modifications

RGA- Reporter gene Assay

RIA- Radioimmunoassay

SC- Sub-cutâneo

TNF α - Tumor Necrosis Factor Alfa

TNFi- TNF inibidores

TPP- Recombinant therapeutic protein product

UC- Ulcerative colitis

Introdução

A imunologia contribui para a compreensão do funcionamento do sistema imunitário e da sua importância fundamental enquanto suporte e manutenção da vida. A era da imunologia remonta a 1890 com a descoberta dos anticorpos como protagonistas da imunidade protectora (1). Os anticorpos podem-se obter com recurso à técnica do hibridoma, a mais comum e a única utilizada a princípio, ou por técnicas de engenharia genética, hibridação génica e vectores de clonagem. Kohler e Milstein em 1975 descreveram a produção dos primeiros anticorpos monoclonais através da técnica de hibridação celular somática, que gerou os hibridomas ou híbridos de células. (Anexo I) Por sua vez, estas células geram anticorpos e linhagens celulares de replicação contínua (2). Uns anos mais tarde, Kohler e Milstein desenvolveram os hibridomas no Laboratório de pesquisa médica do Conselho de Biologia Molecular em Cambridge no Reino Unido (3). Estes cientistas geraram uma linhagem de células estáveis, hibridomas resultantes da fusão de duas células diferentes, que secretavam um isótipo de uma imunoglobulina específica para um determinado antígeno, surgindo assim pela primeira vez o anticorpo monoclonal.

O primeiro anticorpo monoclonal aprovado para uso em humanos foi o muromonab, um anticorpo anti-CD3 de ratinho, que era usado em clínica para profilaxia ou tratamento de alotransplantes (4). Porém foram evidentes as diferenças entre o sistema imunitário humano e o do ratinho: os doentes desenvolveram anticorpos humanos anti-ratinhos (4) (5). Para reduzir estes efeitos nefastos, com importante imunogenicidade, passaram-se a produzir anticorpos monoclonais quiméricos e humanizados através da tecnologia do DNA recombinante (6). Os anticorpos monoclonais quiméricos possuem o domínio variável de ligação ao antígeno, a porção Fab, originária de espécies utilizadas na imunização, como por exemplo o ratinho, fundido com o domínio constante, porção Fc, proveniente de humanos (7). Já os anticorpos monoclonais humanizados contêm sequências Fab constituídas por pequenas porções provenientes de ratinhos fundidas com os domínios constantes das sequências humanas (7). Estes anticorpos são produzidos através de tecnologia de DNA recombinante (8) e durante o processo os CDR das imunoglobulinas do ratinho, são transferidas para a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina humana (9). Em comparação com os anticorpos quiméricos (Anexo II), os humanizados têm uma menor probabilidade de desenvolver anticorpos anti-ratinhos (10). Porém a humanização pode provocar a redução da capacidade de ligação ao alvo, implicando a necessidade de encontrar uma forma de aumentar essa afinidade, assim torna-se fundamental fazer alterações nos aminoácidos que constituem as regiões que determinam a complementaridade de ligação ao alvo (11). Podemos falar ainda mAbs totalmente humanos, estes têm menor imunogenicidade (12). Estes anticorpos, são produzidos através de sistemas *in vitro*, como bibliotecas de fagos, envolvendo a expressão recombinante de domínios Fab humanos num bacteriófago e subsequente seleção dos anticorpos monoclonais com

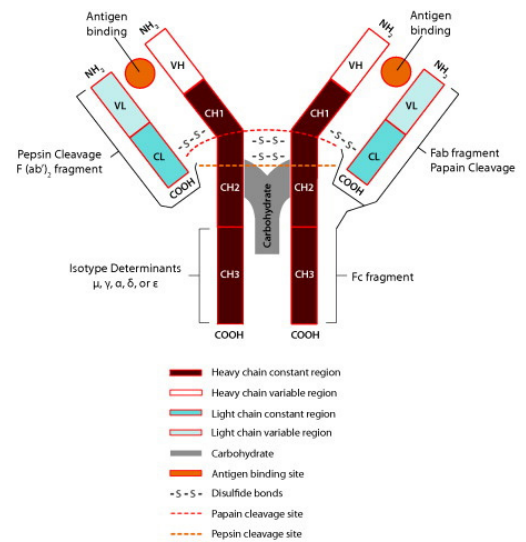


Ilustração 1 Anticorpo

<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/antibody-basics.html>

base nas propriedades de ligação ao antigénio pretendido. Outro modo de produção é utilizando as plataformas *in vivo*, com ratinhos transgénicos, onde se introduzem genes de imunoglobulina humana no genoma do ratinho. O ratinho transgénico é então imunizado com um antigénio específico, estimulando a produção de anticorpos monoclonais humanos, que serão posteriormente isolados e clonados a partir dos linfócitos B do ratinho (13) (14) (15). A seleção dos anticorpos *in vivo* é vantajoso relativamente à seleção *in vitro*. Assim sendo, os produtos biofarmacêuticos, de onde se destacam os anticorpos terapêuticos, são fármacos produzidos por um organismo vivo, na maioria das vezes fabricado por genética de células bacterianas vivas, animais ou vegetais (16).

Os mAb são medicamentos de origem proteica, constituídos por moléculas de grandes dimensões, compostas por milhares de átomos, instáveis e de elevada complexidade (17). Relativamente às características do mAb, espera-se que tenha a capacidade de se dobrar e expressar de forma eficiente, assim como possuir propriedades farmacocinéticas suficientes para competir com outros anticorpos na ligação ao antigénio (7). Dos mAb espera-se ainda uma grande especificidade de ligação ao antigénio.

Ao contrário dos medicamentos com origem em síntese química, que podem ser produzidos com um elevado grau de pureza e que são facilmente replicados, o princípio activo do medicamento biológico é constituído por uma mistura de subespécies moleculares, cujo produto final é fortemente dependente do processo de produção e da variabilidade dos produtos utilizados, que conferem ao produto final um elevado grau de micro heterogeneidade entre os diferentes lotes produzidos (18). Durante o processo de produção, são vários os factores que podem originar variações nos medicamentos biológicos, alterando o seu perfil de segurança e eficácia: podemos destacar a selecção da linha celular, características biofísicas das proteínas, alterações na temperatura ou nas condições de pH durante as fases de fabrico, manuseamento e conservação do produto nas várias etapas, formulação do produto farmacológico, escala de produção e local de produção. (17)

Os mAb, como terapêutica alvo, são altamente específicos, possuem diminutos efeitos adversos e são o foco de pesquisa nas doenças que necessitam de tratamento clínico ou cirúrgico agressivo (19). Três fármacos anti-TNF α estão actualmente aprovados para uso clínico em doentes com várias doenças inflamatórias crónicas: o Infliximab (Anexo III), o Etanercept e o Adalimumab (Anexo IV), (20). Estes fármacos proporcionam aos doentes cuidados avançados, fornecendo tratamentos altamente eficazes e direccionados para uma série de doenças crónicas e ameaçadoras para a vida, como doenças neoplásicas hematológicas e neoplasias sólidas, bem como doenças sistémicas imunomediadas, como a AR, IBD, LES e psoríase (21).

A introdução de agentes anti-TNF α no fim dos anos 90 tem mudado o paradigma de doenças como as acima referidas, estudos têm demonstrado que esta classe de fármacos podem induzir remissão sustentada numa coorte de doentes, evitando assim o uso crónico de esteróides, reduzindo hospitalizações e evitando actos cirúrgicos devido a complicações (22) .

Vários estudos indicam que os doentes sujeitos a tratamento com agentes anti-TNF α podem desenvolver efeitos adversos à terapêutica, assim como estes fármacos deixarem de ser eficazes, por vários motivos. Existe evidência que cerca

de um terço dos doentes não respondem primariamente ao IFX, a causa pode ser por uma depuração rápida do fármaco na ausência de qualquer reacção imune ao fármaco (23). Sabe-se também que a recorrência de sintomas clínicos após remissão induzida com anti-TNF α é comum, acredita-se que cerca de 60% dos doentes experimentam recorrência de sintomas na prática clínica ao longo do tempo (24). Existem muitos motivos para este surgimento, foram identificados alguns num estudo em doentes com IBD (anexo V), porém os agentes anti TNF α têm também o potencial de induzir uma resposta imunitária, esta resposta é complexa e além da formação de anticorpos, envolve a activação das células T e respostas imunes inatas que podem contribuir para os efeitos adversos (25). Esta ocorrência é um dos principais problemas que os medicamentos biotecnológicos têm de resolver num futuro próximo, de modo a poder ser uma resposta sustentada para doenças altamente incapacitantes (26) (27).

A imunogenicidade dos medicamentos que levam os doentes a desenvolver ADAs é um problema agora reconhecido por muitos investigadores, agências de monitorização de fármacos, companhias de seguros de saúde e fabricantes de fármacos (20). A consequência de uma reacção imune a uma terapêutica de origem proteica, como os mAb, pode incluir perda de eficácia assim como episódios de anafilaxia.

A imunogenicidade pode ser multifactorial, onde os factores relacionados com produto e o doente são os principais e têm um impacto documentado na resposta imune às terapêuticas proteicas, incluindo medicamentos anti-TNF α , mas muitos factores ainda são desconhecidos (60). A evidência clínica directa para respostas ADA foi descrita em doentes que receberam produtos biológicos anti-TNF α , mas a extensão do problema ainda não é totalmente conhecida e não foi totalmente descrita.

Torna-se assim primordial contornar esta situação, tendo um conhecimento profundo sobre a imunogenicidade e aprendendo a geri-la na prática clínica, em prol do bem-estar dos doentes.

O foco do presente trabalho será sobre a gestão da imunogenicidade que surge pelo uso de mAbs no tratamento de IBD, AR e doença psoriática.

Objectivos

O grande objectivo deste trabalho é apreender o processo de gestão da imunogenicidade do doente tratado com anticorpos monoclonais. Podendo destacar alguns objectivos mais específicos:

1. Compreender as várias facetas da imunogenicidade
2. Consequências da imunogenicidade
3. Clinicamente como é feita a medicação de ADAs
4. Em termos clínicos como se procede perante a imunogenicidade dos mAbs

Questão de partida: Como se gere a imunogenicidade resultante dos anticorpos terapêuticos?

Materiais e Métodos

Para a construção da introdução do presente trabalho, onde explanei as palavras-chave e tema do trabalho, optei por uma revisão bibliográfica não tão afunilada no tempo, pois a descoberta primordial dos anticorpos remete ao século passado e achei oportuno alargar a faixa cronológica da pesquisa. Assim explorei os temas fármacos biológicos, anticorpo terapêutico, e imunogenicidade. Seleccionei os artigos sobre o tema imunogenicidade e anticorpos terapêuticos, com enfoque nos anticorpos Infliximab e Adalimumab, já que são os TNFi que vêm descritos em maior relevância na literatura devido à sua amplitude de aplicabilidade. Este enfoque surgiu da necessidade de me restringir à sua aplicabilidade a doenças como a AR, IBD e psoríase, de modo a simplificar o estudo. A opção de não abordagem da aplicabilidade destes fármacos em doenças oncológicas foi no sentido de me focar num tema mais profundamente, não descurando a extrema importância das doenças neoplásicas, podendo ser alvo de estudo numa próxima abordagem. Abordei também o tema que acho importante e se enquadra na actualidade que são os biossimilares e o seu contexto no tema da imunogenicidade.

No que concerne aos resultados e discussão, limitei a data dos artigos de 2015 até ao presente, pois queria a informação e opiniões mais actualizadas sobre o tema, porém posteriormente foi necessário ir procurando fontes também presentes nesses artigos, cronologicamente mais antigas, para poder consolidar conhecimentos e perspectivas.

Tentarei fazer uma abordagem global do tema, apresentando os pontos mais importantes.

Resultados e Discussão

Biossimilares

A perda de patente dos primeiros agentes biológicos levou ao desenvolvimento de moléculas com estrutura similar aos originais, denominados de biossimilares. O surgimento dos biossimilares objectiva-se com a diminuição dos custos associados às terapêuticas biológicas e aumento da acessibilidade a estes medicamentos, particularmente importante no tratamento de doenças crónicas. Assim, em virtude de seu preço mais baixo, os biossimilares têm o potencial de reduzir os custos de saúde em relação aos produtos biológicos de referência (28), aumentando assim o acesso a medicamentos biológicos para os doentes que necessitam.

Os biossimilares são medicamentos biológicos que são similares em termos de qualidade, segurança e eficácia a medicamentos biológicos de referência já aprovados, nos quais a segurança e a eficácia no uso clínico foi devidamente demonstrada através de estudos pré-clínicos e clínicos (29). Estes fármacos devem garantir similaridade, em relação ao produto de referência, no que concerne a parâmetros como a sequência de aminoácidos, conformação, modificação pós-transducional, imunogenicidade, função e a afinidade aos seus ligandos. No entanto, os medicamentos biossimilares não são genéricos, pois os genéricos têm estruturas químicas e processos de produção mais simples sendo considerados idênticos aos

respectivos medicamentos de referência, qualitativa e quantitativamente e em termos de biodisponibilidade e bioequivalência (30).

Em Julho de 2012 foi aprovado o Remsima, o primeiro anticorpo monoclonal considerado um biossimiliar do IFX. Já em 2013, a EMA aprovou a sua utilização na Europa, baseada num único ensaio de equivalência, efectuado em doentes com AR, suplementado num estudo de farmacocinética na espondilite anquilosante, tendo sido ainda aprovado nas restantes indicações do IFX, como a doença de Crohn, colite ulcerosa, artrite psoriática e psoríase, apesar do fármaco não ter sido estudado nestas populações (31).

Doenças alvo dos anticorpos

A psoríase crónica em placas é uma doença cutânea inflamatória imunomediada, caracterizada por um processo inflamatório de infiltração celular, hiperproliferação epidérmica e dilatação de microvasos, porém o processo fisiopatológico na sua íntegra permanece ainda desconhecido. Várias citosinas e factores de crescimento, como TNF- α , IL-23, IL-22, IL-17 estão envolvidos no processo fisiopatológico (32) (33). Esta doença tem um importante impacto na qualidade de vida dos doentes e estima-se que afecte 250 mil Portugueses (34). Um maior conhecimento sobre a patogénese da psoríase levou ao desenvolvimento de fármacos biotecnológicos, que interferem selectivamente nos mecanismos de acção da doença, destacando-se os agentes biológicos. Estes revolucionaram o tratamento da psoríase, demonstrando ser seguros e eficazes, constituindo uma alternativa aos tratamentos sistémicos convencionais e um importante instrumento ao dispor no tratamento da psoríase moderada a grave (35). Estão disponíveis actualmente quatro agentes biológicos para o tratamento da psoríase: **Adalimumab**, Etanercept, **Infliximab** e Ustekinumab.

A Inflammatory bowel disease (IBD) engloba pelo menos duas formas de inflamação intestinal: colite ulcerosa e doença de Crohn. Embora muitos outros distúrbios inflamatórios afectem o tracto gastrointestinal, a maioria pode ser distinguida por um agente ou processo etiológico subjacente específico ou pelo carácter e manifestações da actividade inflamatória. Estas doenças estão associadas a uma grande variedade de complicações, abrangendo os efeitos secundários do processo inflamatório no tracto gastrointestinal e manifestações extraintestinais associadas (36).

Os principais factores responsáveis pela IBD incluem componentes genéticos, elementos ambientais, flora microbiana e respostas imunes. A investigação da patogénese da IBD tem sido dominada há muito tempo pelos estudos de imunidade da mucosa, especialmente a resposta das células T. As evidências disponíveis sugerem que as disfunções das vias imunitárias inatas e adaptativas contribuem para o intestino aberrante na resposta inflamatória em doentes com IBD. A maioria dos estudos nas últimas duas décadas focou-se no papel das respostas imunitárias adaptativas anormais na patogénese da IBD. O foco na resposta imune adaptativa tem levado finalmente à noção de que os dois principais tipos de IBD representam formas claramente distintas de inflamação do intestino: a doença de Chron tem sido considerada como sendo conduzida por uma resposta celular tipo Th1 e a colite ulcerosa foi associada a uma resposta não convencional celular Th2 (37) (38).

A Artrite Reumatóide AR é uma doença crónica auto-imune (Anexo VI) que causa destruição articular progressiva e comorbilidades associadas nos domínios vasculares, metabólicos e ósseos. Esta patologia atinge cerca de 1% da população, podendo surgir em qualquer idade, sendo mais prevalente em mulheres do que em homens. Pensa-se que a sua patogénese primária seja causada por uma disfunção auto-imune que se desenvolve em fases pouco distintas e definidas. Numa fase de artrite pré-reumatóide, antes do início clínico da doença articular, geralmente podem ser detectados mediadores imunes sistémicos, como os auto-anticorpos e citosinas. Essa fase estende-se e geralmente evolui para a AR estabelecida que é caracterizada por inflamação crónica, danos tecidulares e pela sua respectiva remodelação. Os avanços científicos nas terapias específicas imunológicas-direcionadas, incluindo inibidores biológicos e quinases, revolucionaram a resposta clínica e melhoraram os resultados observáveis no doente de forma notável. Estes fármacos também ajudaram a desvendar os mecanismos moleculares e celulares cruciais dentro do complexo de redes inflamatórias que propagam e perpetuam a doença. Assim, os sucessos e falhas de terapias específicas imunes para doentes com AR são uma oportunidade inestimável para dissecar mecanismos da doença (39).

Imunogenicidade

ADAs e Tolerância imunológica

A tolerância imunológica baseia-se numa complexa série de mecanismos que impedem o sistema imunitário de responder a antigénios do self. O nosso sistema imunitário desenvolve a capacidade de distinguir entre self e não-self, de modo a que seja possível ter protecção contra agentes externos e não reagir contra as nossas próprias células. Para alcançar essa distinção, os mecanismos de tolerância central e periférica, que envolvem a participação de diferentes populações de células, estão constantemente activos no nosso organismo. (40) (41)

A tolerância central (Anexo VII) é o mecanismo através do qual as células imaturas T e B se tornam não reactivas em relação ao próprio indivíduo, estas células desenvolvem-se nos órgãos linfóides primários. A tolerância periférica incide sobre os linfócitos maduros que escapam à selecção negativa e nos órgãos linfóides periféricos são submetidos a exclusão e supressão (42).

A auto-tolerância imune dentro dos limites da existência normal, ou seja, sem intervenção médica, refere-se à incapacidade de desenvolver doença auto-imune clínica, mantendo a capacidade de resposta imune robusta a agentes infecciosos. Esta definição não significa que um indivíduo auto tolerante esteja livre de eventos auto-reactivos: há uma grande evidência de que as auto-reatividades subclínicas ocorrem num sistema imunológico que funciona normalmente. Os eventos auto-reactivos podem ser um reflexo de tolerância imperfeita, no entanto a auto-reatividade fraca é importante para manter a vitalidade dos imunócitos num processo chamado proliferação homeostática (43) (44). Os indivíduos que permanecem em grande parte livres de doenças auto-imunes desenvolveram com sucesso mecanismos de tolerância imunológica.

As respostas dos anticorpos dependentes de células T pressupõem uma interacção complexa entre APC, células T, citosinas e células B, conduzindo subsequentemente à activação de células B com a produção de anticorpos. Dentro

desta cascata, existem factores imunológicos centrais e periféricos que juntos formam a base da tolerância imunológica para as proteínas endógenas. A tolerância imunológica às proteínas endógenas é variável, em geral a tolerância é mais fraca para proteínas de baixa abundância do que para proteínas de alta abundância (18). O sistema imunitário pode gerar anticorpos contra proteínas terapêuticas por dois mecanismos gerais: um depende da co-estimulação de células T e das células B enquanto o outro é independente das células T (45).

Podemos destacar factores que podem afectar o equilíbrio *in vivo* entre a imunogenicidade e a tolerância: 1-especificações de fabrico de fármacos como a formulação e a agregação; 2-protocolos de administração de fármaco como a dose, via e frequência de administração; 3-doentes imunocomprometidos e 4-predisposição genética dos indivíduos que receberam o medicamento. O complexo do gene humano que codifica para proteínas MHC de classe II inclui três locus (HLA -DR, -DQ e -DP), cada um contendo genes para as subunidades alfa e beta de uma molécula de MHC. As proteínas MHC variam nas suas especificidades de ligação ao antígeno e, portanto, os indivíduos podem responder de forma diferente a um determinado antígeno, dependendo do tipo HLA (46).

A imunogenicidade pode ser gerada tanto nas vias dependentes das células T como nas independentes (48). Nas vias dependentes das células T, as células T são activadas através do reconhecimento de péptidos antigénicos apresentados por moléculas principais de classe II de MHC, que se comportam como APCs. As células T activadas estimulam as células B para gerarem ADAs específicos. Os ADAs gerados a partir do caminho dependente da célula T são geralmente IgG que permutam de classe e amadurecem por afinidade (49). Na via independente das células T, as células B podem ser activadas por ligandos multivariados através da reticulação do receptor das células B (50). A relação de posição dos epítomos auxiliares de células T e B pode influenciar a imunogenicidade (51) (52). Os péptidos em que um epítopo de células T se sobrepõem com um epítopo de células B tendem a gerar anticorpos de afinidades superiores do que a co-imunização de epítomos separados por posição. Uma diferença na sequência de aminoácidos entre uma proteína endógena e uma proteína terapêutica pode modificar epítomos de células T (18).

Pensa-se que os agregados que exibem epítomos para-cristalinos repetitivos podem reticular os receptores de células B e activar estas células numa via independente celular (53). As ADA geradas na via independente de células T provavelmente seriam IgM com algumas IgG de baixa afinidade (54) (55) (56). As TPP/ anticorpos terapêuticos de origem não humana podem induzir a imunogenicidade através do reconhecimento dos antígenos externos, enquanto as de origem humana poderiam induzir principalmente a imunogenicidade devido à quebra da tolerância imune (57).

A imunogenicidade em mAbs, ou seja, a propensão para que os doentes desenvolvam ADA contra os mAb, surge numa proporção de doentes através de mecanismos dependentes da tiróide, com alta afinidade e memória imunológica assim como independentes da tiróide, com baixa afinidade e memória ocasional (58). Estes ADAs são tipicamente anticorpos IgG que podem prejudicar a ligação do agente biológico à citosina alvo ou acelerar a depuração do fármaco pelo sistema reticulo-endotelial (59).

Os ADA foram associados a riscos de segurança que variam entre eventos leves a fatais. A presença de ADA após administração de terapia biológica não se traduz

necessariamente em consequências clinicamente significativas pela eficácia ou segurança. De facto, os eventos adversos associados à imunogenicidade, como a hipersensibilidade, são relativamente incomuns (69) (70).

Alguns investigadores acreditam que o desenvolvimento de ADAs é de importância limitada, porque nem sempre existem consequências clínicas observáveis do desenvolvimento dos anticorpos. Esta crença, infelizmente, surgiu da experiência clínica, onde vários factores podem contribuir para interpretações erróneas. O uso de testes que produzem resultados ADAs falso positivos contribuem para o problema, como acontece em todos os casos em que os anticorpos são induzidos por terapêuticas proteicas (113).

A formação de ADA contra uma proteína terapêutica pode ter uma consequência clínica potencialmente fatal, se ocorrer reactividade cruzada com uma proteína endógena, quando esta tem um papel não redundante nas principais funções fisiológicas. Por exemplo, os ADAs que reagem de forma cruzada com eritropoetina endógena causaram anemia em doentes com insuficiência renal, tratados com alfa-epoetina. Novas construções, como moléculas híbridas fundidas em moléculas funcionais fisiológicas, devem ser cuidadosamente investigadas para ADAs de reacção cruzada com proteínas endógenas relevantes (18).

No que concerne às consequências na eficácia, os ADAs podem influenciar a eficácia eliminando a acção farmacológica do produto ou alterando seu perfil farmacocinético

PK- Anticorpos neutralizantes e não neutralizantes

Os produtos fabricados pela biotecnologia induzem uma resposta imunitária complexa que consiste na indução da formação de anticorpos neutralizantes, através da activação das células T ou activação da resposta imunitária inata. Estes fenómenos podem contribuir para que surjam respostas potencialmente adversas: perda da eficácia, anafilaxia para proteínas terapêuticas usadas como substituição, um potencial de reactividade cruzada com o homólogo endógeno (60) (61), podendo também surgir síndrome auto-imune fatal, devido à reactividade cruzada com proteínas endógenas (62)

A geração de ADAs, neutralizantes e não neutralizantes, é cada vez mais reconhecida como um mecanismo que explica a eficácia reduzida ou a falha terapêutica de alguns produtos biofarmacêuticos (18). Os anticorpos neutralizantes podem reagir de forma cruzada com proteínas endógenas, levando a síndromes de deficiência (71) (72). A perda de eficácia do fármaco biológico pode ocorrer devido a alteração da sua farmacocinética ou, noutros casos, à presença de anticorpos neutralizantes ligados a locais activos, reduzindo assim a actividade dos fármacos (64).

Sabe-se que os anticorpos neutralizantes são anticorpos que defendem a célula de um antigénio, neutralizando qualquer possível efeito biológico, que o antigénio poderia provocar, já os anticorpos não neutralizantes ligam-se ao antigénio, mas não o neutralizam, são assim auxiliaadoras do complemento e das células fagocíticas (20). Os anticorpos neutralizantes podem causar uma redução ou perda de eficácia ao se ligarem ao local ativo ou próximo dele, podem ainda induzir mudanças conformacionais, levando a perda de eficácia farmacológica.

Normalmente, os anticorpos não neutralizantes devem ser associados a menos consequências clínicas. No entanto, tais anticorpos podem reduzir a exposição à

proteína terapêutica e assim influenciar indirectamente a eficácia do fármaco/proteína terapêutica. Os efeitos dos ADAs podem variar de zero a perda de eficácia completa. Em algumas situações, a eficácia é reduzida gradualmente ao longo do tempo sem uma correlação clara com os títulos de ADA (18). De destacar que em alguns casos os anticorpos não neutralizantes podem acelerar a depuração das proteínas terapêuticas, resultando numa redução da eficácia do fármaco (63).

Alguns doentes não respondem de forma alguma ao fármaco biológico que é administrado, ocorrendo uma falha na resposta primária, ou respondem inicialmente, mas apresentam recidivas, insuficiência de resposta secundária, apesar de uma dosagem aumentada e / ou administração mais frequente dos fármacos. O(s) motivo(s) para estas falhas de resposta não são inteiramente claros, mas as diferenças inter-individuais e intra-individuais na biodisponibilidade e farmacocinética podem contribuir para o problema (18).

O IFX é um caso particular, visto ser um mAb quimérico, o que significa que a presença de regiões variáveis de ratinho podem induzir rapidamente a formação de ADA neutralizantes de elevada afinidade. Este processo de taquifilaxia depende também do tipo de patologia envolvida, sendo a resposta auto-imune e inflamatória um factor de risco elevado que pode ser exacerbado. Deste modo, é importante que os anticorpos terapêuticos e os bioequivalentes sejam testados com comparabilidade em estudos clínicos de duração e tamanho suficientes para determinar quais as taxas de imunogenicidade e os efeitos adversos (95).

Bioequivalentes

A capacidade de provocar uma resposta imune com produção de ADAs é um problema transversal a todos os agentes biológicos, incluindo os bioequivalentes, com implicações clínicas importantes, especialmente em termos de segurança (65). Desta forma, devido às possíveis diferenças de estrutura entre os agentes biológicos originais e os bioequivalentes, é possível que a capacidade imunogénica possa ser diferente entre eles. Esta situação poderá e deverá ser alvo de investigação num futuro próximo.

Devemos estar cientes dessas tecnologias aprimoradas e não presumir que os novos produtos biofarmacêuticos, incluindo os bioequivalentes, sejam mais imunogénicos. De facto com o surgimento dos bioequivalentes e o requisito de comparações para referenciar produtos em ensaios clínicos, as tecnologias de ponta podem produzir novas informações sobre a imunogenicidade de biofármacos já aprovados anteriormente (66).

Table 1 Factors influencing immunogenicity of biopharmaceuticals

Category	Example
Treatment-associated	Mechanism of action
	Route of administration
	Frequency of administration
	Duration of therapy
Patient-associated	Disease type
	Disease status
	Immune system function
	Genetic factors
	Concomitant disease
	Concomitant medications
	Prior exposure
Prior sensitization	
Drug property-associated	Recombinant expression system
	Post-translational protein modifications
	Impurities
	Contaminants
	Aggregates

Factores que influenciam a Imunogenicidade

Face ao crescente número de proteínas biológicas, produzidas pela biotecnologia, usadas como agentes terapêuticos, surgiu uma preocupação acrescida relacionada com o facto destas poderem produzir respostas imunitárias nos doentes sob tratamento. Estas respostas podem ser mediadas por diversos factores (18).

Aí incluímos os mAb que também têm a capacidade de serem reconhecidos pelo

organismo como corpos estranhos e, deste modo, apresentam um potencial inerente de desencadear reações imunitárias devido à sua composição e elevado peso molecular (47), presença de variações na sequência de aminoácidos ou mudanças na estrutura proteica como resultado de modificações pós-tradução ou outras mudanças durante todas as etapas do processo de fabrico, armazenamento e administração.

Uma grande quantidade de factores pode influenciar a imunogenicidade, que pode ser classificada em três grandes categorias que podem ser sub-divididas:

1. **Factores associados ao tratamento;**
2. **Factores associados ao doentes**
3. **Propriedade do fármaco (66)**

A presença ou ausência desses factores, quando uma proteína/anticorpo é administrado no contexto de uma população específica de doentes, o regime de tratamento é usado para avaliar o risco de imunogenicidade e orientar o desenvolvimento de estratégias de mitigação de risco.

Os factores relacionados com o doente e a doença que predis põem para uma resposta imune incluem: idade, doença, historial genético, estado imunitário incluindo imunomodulação terapêutica, medicação concomitante e esquema posológico, outros tratamentos concomitantes e anticorpos pré-existentes, de destaque os anticorpos terapêuticos, devido à exposição anterior ao produto ou produtos contendo substâncias com similaridade estrutural, bem como a sensibilização dos doentes devido a impurezas e excipientes relacionados com processo e ao produto, (66) (17).

Já os factores associados ao doente, que se pensa que afectem a imunogenicidade, incluem antecedentes genéticos e sensibilização prévia. Inclui também a função do sistema imunitário, que quando comprometida, pode diminuir a probabilidade de produção de anticorpos (75), estado patológico e polimorfismos do MHC, o que pode afetar a magnitude das respostas imunitárias dependentes de células T (47).

Estudos indicam que fumar e o aumento do IMC estão associados a uma resposta atenuada ao IFX, (76) (77) (78) enquanto investigadores identificaram a idade mais jovem como uma variável independente favorecendo a resposta a curto prazo ao IFX (79).

Foram ainda demonstrados que os níveis de PCR aumentam a taxa de depuração do IFX, diminuindo assim os níveis séricos e a resposta clínica deste biofármaco. Além disso, recentemente foi relatado que uma diminuição significativa da PCR logo após a indução pode ser indicativa de resposta duradoura à terapia com IFX (80) (81)

Os factores genéticos podem alterar as respostas imunes a uma proteína terapêutica e levar à variabilidade inter-paciente. A variabilidade genética ao nível das moléculas do complexo MHC e do receptor das células T modificam o sistema imunitário, a variação genética ao nível dos factores de modulação, como citosinas e respectivos receptores podem influenciar a intensidade da resposta.

Existem factores genéticos relacionados com um defeito genético, quando a proteína terapêutica é utilizada para a substituição de uma proteína endógena, por exemplo factor VIII, substituição enzimática, em que o doente tem deficit, o antígeno

fisiológico pode representar um neo-antígeno e o sistema imunitário irá interpretar a proteína terapêutica como non-self (18).

Os factores genéticos podem modular a resposta imune e predispor os doentes portadores de certos alelos do MHC para o desenvolvimento de ADA (82). Os polimorfismos nos genes de citosinas também podem influenciar o nível de imunogenicidade, como demonstrado pela associação entre o genótipo IL10 e a formação de ADA contra Adalimumab e o factor VIII (83) (84).

Sabe-se ainda que os polimorfismos na região promotora do gene para a IL-10, uma citosina com um papel chave na formação de anticorpos, estão associados à formação de anticorpos que inibem o factor VIII na hemofilia (85) e com o desenvolvimento de anticorpos contra o receptor nicotínico da acetilcolina na miastenia gravis (86). De destacar ainda que há autores que mostram resultados que indicam que os polimorfismos de IL10 estão associados ao aumento da formação de anticorpos contra Adalimumab em doentes com AR. Estudos adicionais que utilizam grupos maiores de doentes são necessários para confirmar o estudo (87).

Vários estudos genéticos, particularmente em doentes reumatológicos, identificaram diferentes factores genéticos associados à resposta reduzida ao IFX. Estudos indicam o polimorfismo como factor de risco para a imunogenicidade em doentes com AR tratados com TNFi (88), porém os preditores de imunogenicidade do IFX ainda não foram todos identificados até o momento. Esta lacuna de conhecimento tem impedido uma adaptação racional da terapia individualizada, ou seja, prescrever terapêutica combinada imunomoduladora, com o IFX, aos doentes com alto risco de imunogenicidade com IFX (89).

Relativamente ao factor idade, os dados sobre imunogenicidade de um grupo etário não podem necessariamente ser projectados para outras faixas etárias, uma vez que a resposta imunitária às proteínas terapêuticas pode ser afectada pela idade do doente. No grupo etário das crianças, diferentes níveis de maturação do sistema imunitário são observados, dependendo da idade, esperam-se discrepantes respostas imunes a um produto biológico (18).

Se o produto for indicado para crianças, geralmente expecta-se que os estudos clínicos sejam realizados nessa faixa etária. Nesse caso, os dados de imunogenicidade também devem ser agrupados nesses estudos. Já no caso da faixa etária mais tardia, geriátrica, deve ser dada atenção a uma resposta imune potencialmente alterada, incluindo a auto-imunidade (18).

No que concerne aos **factores relacionados com a doença**, a patologia subjacente de um doente pode ser um factor importante no contexto do desenvolvimento de uma resposta imunitária não desejada. Os doentes com sistema imunitário activo, por exemplo, aqueles que sofrem de infecções crónicas, alergias e doenças auto-imunes podem ser mais propensos a respostas imunitárias às proteínas terapêuticas. Porém noutras patologias, por exemplo desnutrição, doença oncológica avançada, SIDA, falência orgânica, uma resposta imune será menos provável de ocorrer, devido a um sistema imunitário menos ativo e danificado. Para alguns produtos, foi relatado que o desenvolvimento de uma resposta aos anticorpos pode ser diferente para diferentes indicações terapêuticas, ou diferentes estadios da doença. Em princípio, a imunogenicidade deve ser abordada em todas as indicações clínicas, a menos que seja justificado (18).

Relativamente ao **tratamento concomitante**, este pode diminuir ou aumentar o risco de uma resposta imune a uma proteína terapêutica. Tipicamente, a reacção imune contra uma proteína terapêutica é reduzida quando **agentes imunossupressores** são usados concomitantemente. No entanto, uma resposta imune contra um produto terapêutico é resultado de muitos factores e, portanto, as conclusões sobre o impacto potencial da medicação imunomoduladora concomitante não é directa, esse será um tema explorado mais à frente associado aos mAb. É importante considerar também os tratamentos anteriores que podem influenciar a reacção imune ao mAb, estes podem ter um impacto a longo prazo no sistema imunitário. Se os ensaios clínicos de um produto com uma nova substância activa forem realizados em combinação com imunossupressores, este deve ser acompanhado de dados clínicos adequados sobre o perfil de imunogenicidade na ausência de agentes imuno-supressores e deve ser feita uma advertência sobre o uso do medicamento em monoterapia.(18).

Os factores associados ao tratamento incluem a via de administração, SC vs. IM vs IV, (90). Os produtos administrados por via IV devem ser menos imunogénicos do que os medicamentos administrados por via SC ou IM (17). A administração inalatória e intradérmica também pode aumentar a resposta imune à proteína terapêutica. A administração SC geralmente localiza e prolonga a exposição da proteína a uma pequena área próxima onde as células B e T estão presentes (91).

A duração da terapia, se é de curto prazo ou longo prazo e a frequência de administração, intermitente ou contínuo (92), são factores que podem afectar a probabilidade de uma resposta imune. O tratamento a curto prazo geralmente é menos provável de estar associado a uma resposta imune nociva do que o tratamento a longo prazo e os produtos fornecidos continuamente são geralmente menos imunogénicos do que aqueles administrados de forma intermitente (18) (17). O tratamento intermitente ou reexposição após um longo intervalo de tempo sem tratamento pode estar associado a uma resposta imune melhorada. A formação de ADA contra a terapêutica proteica pode ser transitória ou pode ser sustentada (18).

Relativamente aos factores relacionados com a posologia, estes podem aumentar a resposta imune a uma proteína terapêutica, de destacar a dosagem, o horário de administração e a via de administração.

Falando acerca dos **anticorpos pré-existent**s, a exposição anterior a proteínas semelhantes ou relacionadas, pode levar à pré-sensibilização que pode modificar a resposta à nova proteína terapêutica. Além disso, a sensibilização para excipientes na formulação, bem como para impurezas/contaminantes do processo de fabricação, também pode levar à geração de imunogenicidade pré-existente para o produto (93). A reactividade pré-existente em relação às proteínas terapêuticas, anticorpos de reacção cruzada, factores reumatóides, anticorpos contra porções de hidratos de carbono não humanos, etc., na linha de base pode influenciar a produção de ADA. Os anticorpos pré-existent contra uma variedade de terapêuticas de proteínas são frequentemente encontrados, especialmente no contexto de doenças auto-imunes. Os anticorpos pré-existent também podem ser encontrados em doentes que não receberam tratamento. Embora o impacto dos anticorpos pré-existent em segurança e/ou eficácia dos produtos biológicos seja mal compreendido, as consequências podem ser graves para os doentes que recebem "produtos de substituição" como factores de coagulação do sangue, se os anticorpos anteriores reagiram de forma cruzada com o produto de proteína recém-

introduzido. Portanto, a potencial reação cruzada com anticorpos pré-existentes deve ser considerada (18).

Por outro lado, os factores relacionados com o medicamento também podem influenciar a resposta imunitária, como por exemplo a processo de fabrico, a formulação e as características de estabilidade. **Os factores relacionados com o produto** que influenciam a imunogenicidade das proteínas terapêuticas derivadas da biotecnologia incluem: a origem, a construção de expressão e a natureza da substância activa, homologia estrutural, modificações pós-tradução, modificações importantes da proteína terapêutica como a peguilação, produtos relacionados como os produtos de degradação, impurezas, agregados e impurezas relacionadas com os processos, proteínas da célula hospedeira, lipídios ou DNA, contaminantes bacterianos, excipientes e embalagens do produto, recipientes e rolhas (18) (94).

Os factores associados às propriedades de medicamentos incluem o grau em que um biofármaco é humanizado, padrões de glicosilação e remoção ou ocultação através de design de epítomos do MHC, que surgem durante o processo de fabricação, como a presença de impurezas, agregados e contaminantes (75).

As modificações pós-traducionais (PTMs) referem-se a modificações enzimáticas que ocorrem durante a tradução e que resultam em produtos proteicos finais. Os PTMs aumentam a diversidade funcional do proteoma pela adição covalente de grupos funcionais, clivagem proteolítica de subunidades reguladoras ou degradação seletiva de proteínas inteiras. Essas modificações incluem glicosilação, acetilação, acilação, ADP-ribosilação, amidação, γ -carboxilação, β -hidroxilação, fosforilação, processamento proteolítico e sulfatação. Todas as células vivas usam as PTMs para regular a actividade celular, estas tem um grande impacto na evolução. Sabe-se ainda que as várias modificações pós-traducionais podem originar imunogenicidade (93).

Uma formulação é escolhida de modo a aumentar a estabilidade do produto, isto é, para melhor manter a conformação nativa das proteínas terapêuticas. Uma formulação bem sucedida e robusta depende do conhecimento profundo da natureza física e química da substância activa, dos excipientes e interacção entre ambos. A formulação e a fonte de excipientes podem influenciar a imunogenicidade das proteínas terapêuticas. Isto deve ser levado em consideração ao introduzir variações na formulação. Além disso, as interacções entre a substância proteica, os excipientes da formulação escolhida e as embalagens primárias, bem como as condições de uso clínico como a diluição de soluções de infusão e dispositivos de infusão de diferentes materiais, podem afectar a qualidade do produto e gerar efeitos negativos como a aderência às paredes, desnaturação e agregação. Tanto a desnaturação como a agregação da proteína terapêutica podem potencialmente desencadear uma resposta imunitária (18).

A agregação proteica, principalmente por via SC, é um factor crítico de desenvolvimento de imunogenicidade. Deste modo, as alterações da produção biotecnológica podem provocar o desenvolvimento de ADA, que numa primeira fase, até seis meses após a administração, podem ser de baixa afinidade, sendo posteriormente de elevada afinidade, entre os seis e os nove meses (27) (26). Estes ADAs podem reduzir a concentração do mAb no soro, neutralizar a funcionalidade dos mAb e desenvolver efeitos adversos pela formação e precipitação dos imunocomplexos.

A agregação e a formação de aductos de proteínas podem revelar novos epítomos ou levar à formação de epítomos multivalentes, que podem estimular o sistema imunitário. A agregação pode aumentar a resposta imune específica da proteína e levar à formação de ADA. A agregação tem sido associada a um risco imunogenicidade e, conseqüentemente, é antecipado como uma preocupação dos investigadores que desenvolvem novos fármacos (25).

A remoção de agregados, observáveis ou não, tem sido associada a imunogenicidade fortemente reduzida em estudos pré-clínicos *in vivo*. Os factores que podem contribuir para a formação de agregados ou aductos, incluem a formulação, processos de purificação, procedimentos de inativação viral (baixo pH), material de embalagem e condições de armazenamento de produtos intermediários e acabados. A utilização de proteínas como excipiente, como a albumina, pode levar à formação de agregados mais imunogénicos. É importante monitorar o conteúdo agregado e aducto de um produto ao longo de sua vida útil. Os agregados de peso molecular mais elevado são mais propensos a provocar respostas imunes do que os agregados de mais baixo peso molecular e os epítomos multiméricos que são frequentemente exibidos por agregados de proteínas (por exemplo, matrizes semelhantes a vírus) podem envolver mecanismos independentes de células T a activar as células B diretamente. A reticulação extensiva dos receptores de células B por estruturas de ordem superior pode activar células B para proliferar e produzir anticorpos não apenas para a forma agregada, mas também para a forma monomérica da proteína (18).

Existem várias impurezas na substância medicamentos a das proteínas terapêuticas, que potencialmente podem servir como adjuvantes. As proteínas das células hospedeiras a partir do substrato celular co-purificado com a substância activa podem induzir respostas imunes contra si mesmas, bem como para a substância activa. Proteínas bacterianas, contaminantes do processo de fabricação, lipídios ou DNA derivados de células hospedeiras também podem funcionar como adjuvantes que desencadeiam respostas imunes contra a proteína terapêutica (18)

Glicosilação

As causas da imunogenicidade são multifactoriais, sendo as diferenças de glicosilação de um produto um dos motivos principais que provocam insolubilidade e alterações conformacionais das proteínas. Esta alteração da estrutura proteica, em combinação com factores relacionados com o doente, a patologia, o tipo de administração, armazenamento e logística de preparação, pode desencadear um processo imunogénico indesejável (60).

A imunogenicidade pode ser influenciada por uma modificação pós-transducional comum nas proteínas de mamíferos, que é a glicosilação e existem agora evidências consideráveis de que hidratos de carbono podem modular o reconhecimento de células T. A glicosilação das proteínas permite aumentar a sua estabilidade, através da diminuição da degradação proteolítica, oxidação, ligações cruzadas, precipitação, inactivação cinética, agregação, desnaturação por alterações de pH, química ou térmica. Este facto é crucial, uma vez que a instabilidade proteica pode originar uma resposta imunitária exacerbada (67).

A influência dos glicanos sobre o processamento dos antígenos e o reconhecimento pelas células T são relevantes, não apenas para a geração de respostas imunes efetivas a antígenos externos e antígenos associados a

neoplasias, mas também à indução de tolerância a auto-antígenos. Muitos auto-antígenos são glicosilados e o efeito dos glicanos nos auto-antígenos nas vias de tolerância das células T são altamente pertinentes nos eventos que levam à perda de tolerância e ao desenvolvimento de doenças (68).

A glicosilação pode influenciar as propriedades físico-químicas e biológicas de uma proteína. A presença e estrutura de porções de hidratos de carbono podem ter um impacto directo ou indirecto sobre a imunogenicidade das proteínas terapêuticas; O glicano pode induzir uma resposta imune, destacam-se os glicanos de origem não humana. As proteínas de fusão podem conter neo-epítomos devido à introdução de sequências peptídicas estranhas, em ligações / junções de fusão.

Os anticorpos gerados especificamente contra a parte de polietileno-glicol das proteínas peguiladas foram identificados. No entanto, a peguilação e a glicosilação também podem diminuir a imunogenicidade protegendo os epítomos imunogénicos, mantendo a conformação nativa da proteína (18).

Consequências da imunogenicidade

Relativamente às possíveis **consequências clínicas da imunogenicidade**, a imunogenicidade de uma proteína terapêutica pode ter efeitos profundos na eficácia e segurança do produto. A perda da eficácia e alteração no perfil de segurança não estão necessariamente correlacionados, podendo ocorrer questões de segurança sem que haja perda do efeito terapêutico (17).

Os factores que determinam se os anticorpos para uma proteína terapêutica terão significado clínico incluem o epítomo reconhecido pelo anticorpo, a afinidade e a classe do anticorpo, a quantidade de anticorpos gerados, bem como as propriedades farmacológicas do medicamento biotecnológico. Além disso, a capacidade dos complexos imunes para activar o complemento pode ter um impacto no resultado clínico (18).

Existem também consequências na segurança, em geral, a maioria dos efeitos adversos das proteínas terapêuticas estão relacionados com os seus efeitos farmacológicos, a principal excepção é o seu potencial de imunogenicidade. Os efeitos adversos baseados na imunidade podem ser agudos e prolongados no tempo. Os efeitos adversos baseados em imunidade menos severos incluem reacções no local da infusão, as reacções de infusão não alérgicas, que não envolvem IgE, são tipicamente observadas durante as primeiras infusões e podem ser atenuadas por pré-medicação apropriada (18).

Podemos destacar ainda as reacções hiper-agudas/agudas. As reacções relacionadas com a infusão aguda, incluindo reacções anafiláticas/anafilóides (tipo I), podem desenvolver-se em segundos ou durante algumas horas após a infusão. Todas as reacções relacionadas com a infusão envolvem o sistema imunitário. No entanto, algumas reacções anafiláticas são de natureza alérgica e geralmente são mediadas por IgE, enquanto outras, anafilóides, não são verdadeiras reacções alérgicas e não são mediadas por IgE. Embora as reacções relacionadas com infusão possam ser alérgicas ou não alérgicas, as manifestações clínicas são as mesmas. As reacções agudas podem causar hipotensão grave, broncoespasmo, edema laríngeo ou faríngeo, sibilância e/ou urticária. O termo anafilaxia deve ser restringido a tais situações e representa uma contra-indicação rigorosa para uma maior exposição ao medicamento. Geralmente, os doentes que desenvolvem anticorpos são mais propensos a sofrer reacções relacionadas com a infusão. Uma

avaliação minuciosa do potencial dos produtos para induzir reacções relacionadas com infusão aguda, bem como a identificação de todos os casos que atendam aos critérios clínicos de diagnóstico para anafilaxia, independentemente da fisiopatologia presumida, é importante (18).

A grande maioria das reacções agudas graves resultantes da infusão de IFX são muito provavelmente reacções anafiláticas não verdadeiras. As reacções graves agudas resultantes de infusão do IFX parecem não ser verdadeiras reacções anafiláticas mediadas por IgE mas sim associadas ao desenvolvimento de IgG de anticorpos anti-IFX. O risco de reacção é relativamente alto durante a terapia standard ou reinicialização, especialmente na segunda infusão numa nova série, mas os anticorpos anti-IFX estarem negativos antes da reinicialização não exclui as reacções. (96).

Além das reacções agudas, as hipersensibilidades de tipo atrasado, mediadas por células T e as reacções mediadas pelo complexo do complemento devem também ser consideradas. O risco de tais reacções pode ser maior com um intervalo crescente sem exposição a fármacos. **As reacções de hipersensibilidade atrasadas** devem ser claramente delineadas a partir de reacções relacionadas com a infusão. Os candidatos devem assegurar a colheita sistemática de sequelas clínicas não agudas após a administração da proteína terapêutica. Os sinais clínicos podem incluir mialgia, artralgia com febre, erupção cutânea e prurido, entre outros (18).

As consequências de uma reacção imunitária variam de um aparecimento transitório de anticorpos sem significado clínico até condições graves que colocam a vida do doente em risco (18), podendo ver terapêuticas de última linha como os mAb sem efeito terapêutico no doente.

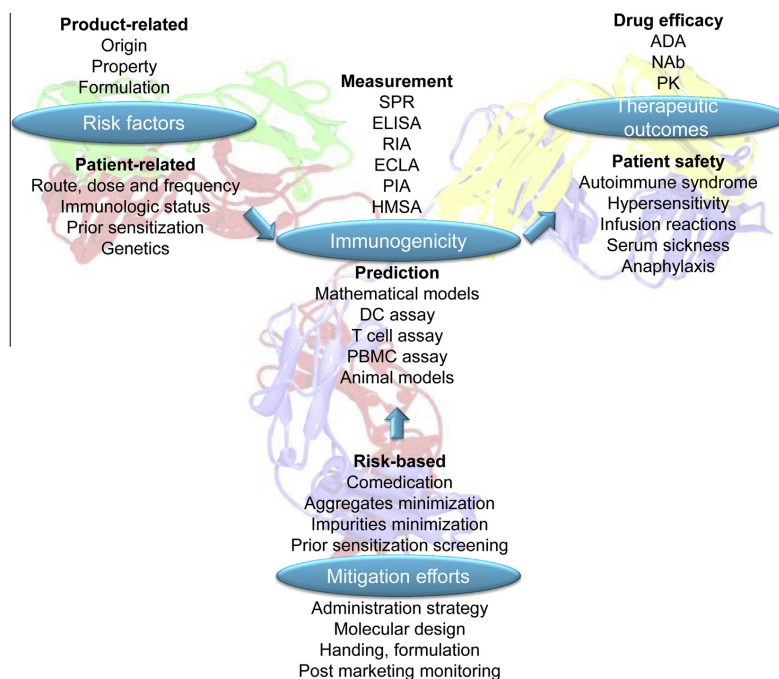


Ilustração 3 Rede complexa sobre a imunogenicidade. (68)

Estudos de detecção de ADAs

Os estudos de imunogenicidade (Anexo VIII) precisam ser cuidadosamente e prospectivamente projetados de modo a garantir a selecção, avaliação e caracterização dos ensaios, deste modo deve ser incluído a amostragem, volumes de amostra adequados, amostras para identificação de anticorpos pré-existentes assim como processamento/armazenamento e selecção de métodos estatísticos para análise de dados. Deve ser adoptada uma estratégia apropriada para medição de anticorpos, que inclua métodos validados para a imunogenicidade, com sensibilidade, capazes de detectar todos os anticorpos induzidos contra o fármaco em todos os doentes, falsos positivos não são aceitáveis (18).

Interferentes

As amostras a analisar, geralmente o plasma ou o soro, podem conter substâncias que interferem com os ensaios, que podem dar resultados falso negativos ou positivos e ainda ter uma incorrecta avaliação do conteúdo do anticorpo. Podemos destacar os componentes do complemento, receptores Fc, proteínas de ligação à manose e factores reumatóides (18). A detecção de ADA nos ensaios pode ainda ser confundida por interferência com os fármacos. Os ADAs podem estar presentes, mas ligados ao excesso dos biofármacos e o ADA neste complexo ADA-biofármaco geralmente não pode ser detectado por ensaios, resultando em resultados falso-negativos (97). Este pode ser um problema particular para produtos biofarmacêuticos com uma semi-vida longa (98). Para superar esta potencial limitação, estão a ser desenvolvidos novos ensaios para detectar ADAs livres e ligados. Estes incluem radioimunoensaios de dispersão de ácido (ARIAs), tais como ensaios de ligação ao antigénio anti-idiótipo de pH-shift (PIA) (99) (100) (101), ensaios de eluição de captura por afinidade (102) (103), ensaios homogéneos de mudança de mobilidade (104), e radioimunoensaios de mudança de temperatura (TRIA) (105).

Métodos de detecção de Anticorpos

Actualmente e na generalidade, existem várias metodologias disponíveis para medir os níveis séricos de IFX e anticorpos anti-IFX em laboratórios clínicos. Estes são ensaios principalmente vinculativos e incluem métodos de ELISA de fase sólida (106) e ensaio de mudança de mobilidade homogénea em fase líquida, baseado em HPLC (HMSA) (107). Para medir os anticorpos circulantes contra TNF α , a maioria dos ensaios baseia-se em tecnologia ELISA, usando anticorpos específicos para captura e detecção, mas também são utilizados ELISA de tipo competitivo e outras técnicas similares (108) (109). Infelizmente, surgem problemas comuns, como ligações não específicas e interferência por factores reumatóides reduzindo a utilidade da técnica de ELISA. Tenta-se superar essas interferências através do desenvolvimento de RIA em fase fluida, usada em anticorpos contra IFX, etanercept e Adalimumab. Essas técnicas provavelmente reflectem melhor a situação *in vivo*, pois não são influenciadas por artefactos induzidos por adsorção em fase sólida de proteínas (110). Como o IFX, Adalimumab e golimumab são construções humanas, tipo IgG1-kappa, que não reagem com anticorpos anti-lambda de cadeia leve, os RIAs são capazes de monitorizar anticorpos contra essas construções de anticorpos, usando a ligação de fármacos radiomarcados a uma matriz de afinidade

anti-lambda da cadeia leve. Esses ensaios revelam os medicamentos analisados em complexos com anticorpos de cadeia leve lambda de todos os isótipos, incluindo IgM e IgE (20).

A RIA em fase fluida para anticorpos contra IFX e provavelmente outras construções de anticorpos anti-TNF α é mais sensível do que o ELISA, até várias centenas de vezes. O RIA em fase fluida detecta anticorpos funcionalmente monovalentes (20). Sabe-se que a ELISA de duplo antígeno padrão, não detecta anticorpos funcionalmente monovalentes, por exemplo, IgG4, que podem, no entanto, neutralizar a ligação do TNF α , aumentar a depuração do fármaco e/ou impedir que o fármaco atinja os tecidos afetados nos receptores. Sabe-se que a IgG4 constitui uma quantidade considerável de anticorpos anti-IFX encontrados em doentes com AR tratados por 3-6 meses (110), logo de importância a serem detectados num ensaio.

Os RIA de fase fluida geralmente utilizam ligandos com conexões altamente conservadas. Essas técnicas são portanto, menos sensíveis aos artefactos causados pela formação de neo-epítipo ou pela perda de epítipos que se sabe que ocorrem quando as proteínas são fixadas em matrizes sólidas (111) (112) (113). Deve-se ter em consideração a limitação que o RIA em fase fluida não favorece a detecção de anticorpos de baixa avidéz (20). O RIA tem sido usado para monitorizar doentes tratados com IFX e Adalimumab, que sofrem de várias doenças inflamatórias crónicas imunomediadas, incluindo doença de Crohn e AR (110).

Recentemente, surgiu um ensaio de gene repórter, que permite medir a atividade sérica de IFX e a detecção de anticorpos funcionais e neutralizantes para o mesmo fármaco, usando um teste baseado em células (114). Este método aplica-se em laboratório clínico, para a medição da atividade funcional e neutralização da resposta de anticorpos ao IFX.

A metodologia RGA (Reporter gene Assay) (Anexo IX) é uma plataforma robusta para medir níveis séricos biologicamente ativos de antagonistas de TNF α e detecção de respostas neutralizantes de anticorpos em doentes com doença auto-imune tratados com fármacos TNFi. Além do IFX, esta plataforma padronizada permite a medição de qualquer antagonista de TNF- α simplesmente alterando as normas do fármaco e os calibradores. O teste RGA mostra alta precisão, é adequado para testes de alto rendimento, o que o torna adequado para o laboratório clínico. Neste ponto, este ensaio é indicado principalmente para a gestão de doentes que desenvolvem falha no tratamento (115).

As técnicas *in vitro* também podem ser utilizadas para avaliar o potencial imunológico das proteínas terapêuticas, estas podem ser usadas para prever o risco de imunogenicidade na configuração pré-clínica. Pode-se avaliar a expressão de

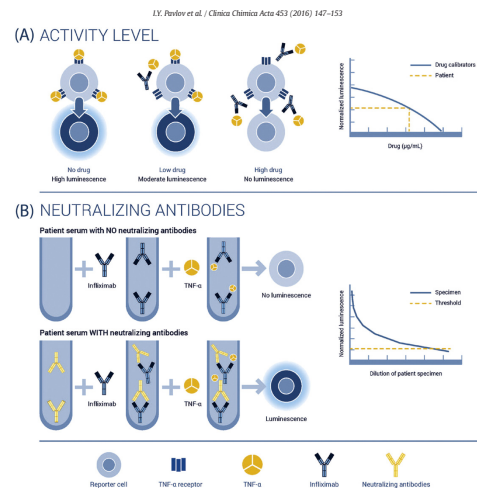


Fig. 1. Principles of the reporter-gene assay. Reporter cells carry a TNF- α -inducible, NF- κ B-regulated, firefly luciferase reporter-gene construct. When TNF- α is added to the reporter cells, the reporter gene turns on and generates firefly luciferase. (A) To measure levels of infliximab activity, serum from a patient taking infliximab is mixed with TNF- α and added to the reporter cells. Infliximab blocks the activity of TNF- α . The amount of infliximab present inversely correlates to the amount of luminescence. The amount of infliximab in serum can be calculated by comparing the level of TNF- α with calibrators of known infliximab concentrations. (B) In the presence of neutralizing infliximab antibodies, the reporter gene is turned on despite the presence of exogenous drug in the assay. Antibody titer is obtained by identifying the serum dilution point at which blocking of infliximab activity is no longer observed.

Ilustração 4 RGA (115)

moléculas de superfície como por exemplo a expressão de MHC (classe I e II), moléculas co-estimuladoras e enhancers de receptores de citosinas. A citometria de fluxo é uma técnica *in vitro* que pode ser usada para determinar diferenças na expressão das moléculas da superfície celular, indicativo da maturação das células APC que podem iniciar a resposta das células T (120). Os ensaios de proliferação de células T também são ferramentas úteis para estudar a activação e proliferação de células T na presença de antígenos (121). As células mononucleadas do sangue periférico humano, quando estimuladas pelos mAbs, induzem uma resposta adaptativa nas células T caracterizada pela proliferação de células T CD4 e libertação de citosinas como interleucina (IL-) 1 β , IL-6 e TNF α , essas citosinas podem ser utilizadas como biomarcadores potenciais para imunogenicidade agregada (121).

Deve-se notar que estas técnicas *in vitro* podem indicar a probabilidade de uma resposta imune para um biofármaco, mas não se podem prever as suas consequências clínicas.

Até agora, a previsão da imunogenicidade em seres humanos provou ser difícil. As técnicas *in silico* foram desenvolvidas para a predição de antigenicidade pela identificação de potenciais epítomos de células T (122). Os métodos *in silico* identificam com sucesso os epítomos restritos do MHC classe II dentro dos biofarmacêuticos (123). Porém a principal limitação é o alto nível de resultados falso-positivos (124).

As ferramentas *in silico* podem ajudar a prever os epítomos das células T e B e os hot-spots de degradação química presentes na sequência primária, permitindo classificar e seleccionar os candidatos com risco de imunogenicidade reduzido antes de entrar na clínica (25). O conhecimento de regiões propensas a agregação também pode ajudar na concepção e seleção de candidatos biofarmacêuticos e reduzir as preocupações de agregação (125).

As tecnologias emergentes como modelos *in vitro* e *in silico* devem ser ferramentas a ter em consideração numa primeira estimativa de risco clínico de imunogenicidade. Os ensaios *in vitro* baseados nas células de imunidade inata e adaptativa podem ser uma ajuda no que concerne as respostas medidas por células (18), porém o seu valor preditivo é questionável (126).

A gestão da imunogenicidade numa fase pré-clínica assenta na necessidade de detecção e caracterização dos anticorpos, em estudos de dose repetida usando modelos animais. Assim, nos estudos *in vivo*, a imunogenicidade é uma questão importante de preocupação para os anticorpos monoclonais utilizados em doenças humanas e, por padrão, é determinada principalmente em primatas não humanos, uma vez que as moléculas alvo são consideradas mais parecidas em relação aos humanos (116).

As respostas imunitárias são específicas de cada espécie, logo a indução não é totalmente preditiva da formação de anticorpos em seres humanos (117). Os modelos animais são limitados pela falta de diversidade genética, que é um fator primário para a resposta imune frequente observada em seres humanos (118), preferem-se assim animais com maior homologia humana, como os primatas acima referidos. No entanto, estes não são amplamente utilizados devido a restrições éticas. Os modelos animais convencionais não transgênicos podem ser úteis para as proteínas altamente conservadas, mas a falta de tolerância imune às proteínas humanas limita seu uso para testes de imunogenicidade. Esses modelos animais

podem ser úteis para comparar a imunogenicidade de dois produtos similares, isto é, a imunogenicidade de um produto original e o seu biossimilar. Os estudos em animais são, em geral, considerados como tendo um baixo valor preditivo para a imunogenicidade de biofarmacêuticos em seres humanos (127) (128), (118). Também a FDA e a EMA aconselham que os dados das avaliações de imunogenicidade em animais não são necessariamente indicativos de respostas imunes em seres humanos, mas podem complementar a informação obtida a partir de estudos de toxicologia pré-clínica (66) (Anexo X).

Os estudos de coorte sugerem que a imunogenicidade e os sintomas funcionais de sobreposição representam a maioria dos casos de perda de resposta, porém a contribuição relativa de cada causa é difícil de determinar na prática (129). Os clínicos podem não perceber que os anti-anticorpos são a causa de efeitos colaterais ou perda de eficácia terapêutica se os doentes não forem monitorizados com frequência para o desenvolvimento de ADAs.

Imunogenicidade dos mAbs

É facilmente compreensível que a resposta tipo anti-anticorpo possa ser desencadeada em doentes que recebem administrações IV/SC repetidas de construções de anticorpos contendo sequências de aminoácidos provenientes de outras espécies, como no caso de fármacos quiméricos do tipo anti-TNF α . No entanto, mesmo os chamados anticorpos totalmente humanizados podem também ser imunogênicos (20). A humanização de anticorpos monoclonais tem diminuição significativa na imunogenicidade, especialmente na imunogenicidade intensa, onde se incluem reações alérgicas que culminaram em choque anafilático, porém algumas moléculas humanizadas e até mesmo moléculas derivadas de anticorpo com sequências totalmente humanizadas possuem risco imunogênico. A causa da imunogenicidade com estas moléculas totalmente humanas está associada a sequências únicas, não humanas, no conjunto de CDRs desses anticorpos (73) e a modificação de certos aminoácidos nessas regiões pode reduzir o risco de imunogenicidade. Por exemplo, apesar de ser humanizado, alemtuzumab induziu anticorpos de ligação e anticorpos neutralizantes em 30% a 70% dos doentes. Foi demonstrado que o pré-tratamento com uma versão alterada do alemtuzumab, que já não se liga ao seu alvo, induziu tolerância imunológica ao próprio alemtuzumab (74).

Os anticorpos dirigidos aos marcadores de superfície celular são considerados como tendo maior risco de imunogenicidade do que aqueles contra os factores solúveis. Os motivos para isso não são completamente compreendidos, mas podem incluir a

internalização do antígeno e posterior processamento e apresentação por células alvo (73).

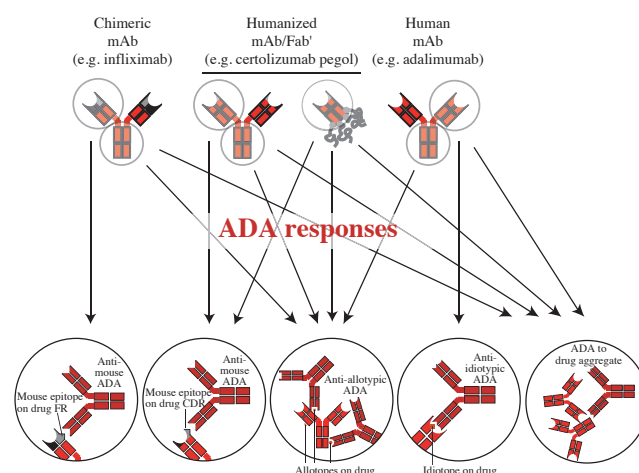


Ilustração 5 Respostas dos ADAs. (137)

Anticorpos

O **Infliximab** é um anticorpo monoclonal quimérico IgG1, com acção anti-TNF α , produzido em células de hibridoma de rato através de tecnologia de DNA recombinante. Este mAb foi aprovado pela FDA em 1998 para ser usado em doentes com doença de Crohn e colite ulcerosa com actividade clínica moderada a grave, usado em doentes com resposta inadequada à terapêutica convencional (130).

Em 1999 foi aprovado para tratamento em AR em associação com o MTX, no ano de 2000 foi expandida a sua utilização noutras doenças inflamatórias (131).

O **Adalimumab** é um anticorpo monoclonal recombinante IgG1 totalmente humano, expresso em células de ovário do hamster chinês, liga-se especificamente ao TNF- α neutralizando a função biológica do TNF e bloqueando a sua interação com os receptores TNF p55 e p75 da superfície celular. Este anticorpo também modula as respostas biológicas induzidas ou reguladas pelo TNF, que incluem alterações dos níveis das moléculas de adesão responsáveis pela migração leucocitária, como a ELAM-1, VCAM-1 e ICAM-1 (132). Este anticorpo inicialmente foi aprovado para redução de sinais em sintomas de AR, que incluía o dano estrutural das articulações (133).

TABLE 1: Immunogenicity of FDA-approved biologics.

SI number	Biologic	Type/target	Indications	Immunogenicity (% patients)		Reference
				Binding antibodies	Neutralizing antibodies	
(1)	Adalimumab	Human IgG1 antibody specific for TNF- α	Rheumatoid arthritis, psoriasis	5%–89%	5%–89%	[24–27]
(2)	Alemtuzumab	monoclonal antibody which binds to CD52 on leukocytes	B cell chronic lymphocytic leukaemia	30%–70%	30%–70%	[28]
(3)	Belimumab	Human monoclonal antibody that inhibits the biologic activity of the soluble form of the essential B cell survival factor B-lymphocyte stimulator	Systemic lupus erythematosus	4.8%	3/11	[29] European Medicines Agency Assessment Report (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Public_assessment_report/human/002015/WC500110152.pdf)
(4)	Canakinumab	Human monoclonal antibody anti-IL-1 β	Inflammatory diseases related to cryopyrin-associated periodic syndromes (familial cold autoinflammatory syndrome and Muckle-Wells syndrome)	0%	0%	[24, 30]
(5)	Cetuximab	Human/mouse chimeric monoclonal antibody that binds specifically to the extracellular domain of the human epidermal growth factor receptor	Colorectal cancer, squamous cell carcinoma of the head and neck	5%	Data not available	Drug label (http://pi.lilly.com/us/erbitux-uspi.pdf)

TABLE 1: Continued.

SI number	Biologic	Type/target	Indications	Immunogenicity (% patients)		Reference
				Binding antibodies	Neutralizing antibodies	
(6)	Denosumab	Human monoclonal antibody RANK ligand inhibitor	Treatment of postmenopausal women with osteoporosis at high risk for fracture To increase bone mass in men at high risk for fracture receiving androgen deprivation therapy for nonmetastatic prostate cancer To increase bone mass in women at high risk for fracture receiving adjuvant aromatase inhibitor therapy for breast cancer	<1%	0%	Drug label (http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2011/125320s6s6lbl.pdf)
(7)	Golimumab	Human monoclonal antibody anti-TNF- α	Rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, and ankylosing spondylitis	4%	Data not available	[31–33]
(8)	Infliximab	Chimeric monoclonal antibody TNF blocker	Crohn's disease, ulcerative colitis, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and psoriasis	Crohn's Disease: 10%, psoriatic arthritis: 15% psoriasis: 36–51%	Data not available	Drug label (http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/103772s359lbl.pdf)
(9)	Ipilimumab	Human monoclonal antibody that binds to cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)	Melanoma	1.1% of 1024 evaluable patients were positive for binding antibodies and 6.9% of 58 evaluable patients, who were treated with 0.3 mg/kg (dose cohort with the lowest trough levels) dose, tested positive for binding antibodies.	0%	Drug label (http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2013/103772s359lbl.pdf)

Ilustração 6 % Imunogenicidade nos mAbs (93)

PK dos mAbs e imunogenicidade

Os fármacos de constituição proteica, como os anticorpos, podem desenvolver uma resposta imunitária com produção de ADAs, nomeadamente anticorpos neutralizantes, este fenómeno contribui para a insuficiência terapêutica e efeitos adversos como a hipersensibilidade. Contrariamente às estratégias empíricas que incluem o escalonamento de dose, deve ser feita uma avaliação racional e económica quando existe diminuição ou ausência da resposta clínica, mensurando os níveis séricos dos fármacos e detectando ADAs presentes (134).

As construções anti-TNF ou não respondem, falha na resposta primária, ou respondem inicialmente, mas apresentam recidivas, insuficiência de resposta secundária, apesar de uma dosagem aumentada e /ou administração mais frequente do medicamento. A monitorização dos doentes para níveis circulantes de fármacos anti-TNF e ADAs é de extrema importância para que o tratamento possa ser adaptado ao doente, como medicamento individual ou medicina personalizada, com o grande objectivo que a terapia seja efectiva e económica a longo prazo e que possa ser administrada com riscos mínimos para os doentes.

Recentemente, reconheceu-se que os doentes podem desenvolver ADA transitórios, ou ADA persistentes, e que períodos sem fármacos levam ao desaparecimento gradual de ADA da circulação (140). Embora os factores que levam alguns doentes a desenvolver ADA sejam parcialmente compreendidos, os níveis séricos persistentemente baixos de fármaco foram associados ao desenvolvimento de ADA em alguns estudos (141)

No que concerne ao IFX, os doentes que desenvolveram ADA mostraram níveis significativamente baixos deste mAb com redução da resposta clínica e pouca taxa cumulativa de retenção de fármaco, em comparação com aqueles que não desenvolveram ADA. Estes dados são comparáveis com relatórios anteriores sobre o mesmo tema (110). Sabe-se que entre os doentes que mostram resposta inicial ao fármaco, a resposta desaparece ao longo do tempo em aproximadamente metade deles, a causa mais comum desta não resposta secundária é a produção de anticorpos contra o IFX, que neutralizam o efeito deste fármaco (137).

Existem dados adicionais sobre a imunogenicidade do IFX e do Adalimumab que sugerem que a maioria dos doentes tratados desenvolve ADAs nos primeiros 6 meses de tratamento (138). Ainda se observa o desenvolvimento de ADAs acompanhado por diminuição dos níveis mínimos de IFX, isto é, baixos níveis de IFX aos 1,5 meses prevêem o desenvolvimento de ADA e posterior falha terapêutica, no período de observação de 18 meses (20). Outro estudo retrospectivo onde as amostras de sangue armazenadas nas fases iniciais do tratamento com IFX foram limitadas, mostra evidência que a frequência de doentes com ADA positivos pode ser maior em fases anteriores após o início de tratamentos IFX do que o sugerido pelos dados atuais (139).

Baixos níveis séricos de IFX correlacionaram-se com uma resposta clínica fraca em doentes com doença de Crohn (164), 7 dos 8 doentes que tiveram perda secundária de resposta ao IFX, apresentaram níveis séricos abaixo de 0,5 mg / ml do fármaco, enquanto que apenas 2 dos 19 doentes que mantiveram um efeito clínico apresentaram valores abaixo desse nível.

Todos os factores, incluindo a imunogenicidade, influenciam a farmacocinética do Adalimumab. A formação ADA leva a concentrações inferiores de Adalimumab em

doentes com AR ou artrite psoriática (146) (147) e, portanto, associadas a uma resposta clínica diminuída. A formação de anticorpos anti-Adalimumab está associada com a depuração aumentada e eficácia reduzida de Adalimumab.

Nos seres humanos, a presença de anticorpos anti-IFX está associada a uma maior depuração do IFX (148). A consequência mais relevante da formação de anticorpos é o aumento da depuração de complexos imunes ou a neutralização do sítio de ligação ao antígeno, resultando em uma menor biodisponibilidade (119). Portanto, os níveis séricos de anticorpo terapêutico funcional e a sua taxa de decaimento podem ser mensurados pela formação do ADA clinicamente relevante. (116).

Acredita-se que só os anti-anticorpos com efeito neutralizante para o $TNF\alpha$, em ensaios *in vitro*, são de importância clínica, isto não é necessariamente correto, porque os ADAs não neutralizantes podem "neutralizar" os efeitos dos fármacos *in vivo*, já que podem afectar adversamente a biodisponibilidade e a farmacocinética das construções de anticorpos (119). Por exemplo, a formação do complexo imune nos locais de injeção pode prejudicar a absorção de fármacos administrados via SC ou IM, independentemente dos anti-anticorpos prevenirem ou não a ligação do TNF ao medicamento. *In vitro*, os ADAs não neutralizantes também podem diminuir a semi-vida de fármacos anti- $TNF\alpha$ pela formação de complexos imunes que são rapidamente eliminados de circulação. Finalmente, os ADAs podem impedir que os fármacos atinjam os tecidos afetados, independentemente de estes inibirem ou não a ligação ao $TNF\alpha$ (20). Os ADAs podem impedir que um medicamento atinja os tecidos afetados, quer inibam ou não a sua capacidade de ligação ao TNF (165).

Em contraste com IFX, que é administrado IV, Adalimumab é administrados por via SC, o problema de biodisponibilidade provavelmente será ainda mais problemáticos e piora com o aparecimento de ADAs que causam a formação do complexo imune local, essa probabilidade já tinha sido referenciada anteriormente (138).

Consequências clínicas da imunogenicidade dos mAbs

Os doentes que produziram anticorpos contra o IFX apresentavam uma maior probabilidade, aproximadamente 2 a 3 vezes, de desenvolverem reacções relacionadas com a perfusão do fármaco (142). Num estudo observacional 60% dos doentes desenvolveram ADAs e esses doentes apresentaram duas vezes mais probabilidade de desenvolver reacções de infusão aguda, comparativamente com os doentes que tinham receptores de anticorpos negativos (109).

Os níveis de $TNF\alpha$ e $IFN\alpha$ e as suas características próprias podem influenciar o desenvolvimento da produção de auto-anticorpos tipo **lúpus** após o tratamento com TNFi em seres humanos. Existe associação entre a imunogenicidade e a produção de auto-anticorpos tipo lúpus induzida pelo tratamento IFX na AR (139).

Os doentes com AR que receberam TNFi menos imunogénico, como o etanercept ou o golimumab, também desenvolveram produção de auto-anticorpos tipo lúpus (143) (144). A frequência relativa foi maior em doentes com AR que receberam IFX ou Adalimumab em comparação com aqueles que receberam etanercept (145). Esse facto também auxilia a possível associação entre propriedade imunogénica de um determinado TNFi e desenvolvimento de auto-anticorpos tipo lúpus.

Em doentes tratados com IFX, curiosamente, o tempo de seroconversão é semelhante para ADA e ANA no grupo onde existem ADA-positivos, esta descoberta sugere que os ADAs podem-se desenvolver junto com os ANAs em doentes

tratados com IFX com AR. Os doentes com ADAs positivos desenvolveram níveis séricos anormais de ANAs com mais frequência do que os doentes com ADAs negativo após o início do tratamento com IFX. Além disso, os Interferão do tipo I pode estar envolvido na produção de ANA e ADA em doentes com AR tratados com IFX (139).

Vinte e cinco (8%) de 315 doentes com IBD (218 com doença de Crohn e 97 com colite ulcerativa) experimentaram uma reação de infusão grave aguda ao IFX. As manifestações clínicas das reações como observadas nos arquivos dos doentes foram as seguintes: mal-estar grave agudo (100%), dispneia severa (60%), dor torácica (44%), náuseas (36 %), eritema universal (32%), taquicardia (24%), calafrios e transpiração (24%), tonturas (16%) e hipotensão (12%). O tratamento sintomático consistiu na cessação imediata da infusão de IFX e infusão IV de anti-histamínico (n = 22), hidrocortisona (n = 6) e epinefrina (n = 2). O IFX foi descontinuado permanentemente em todos os doentes, porque a avaliação geral do tratamento das avaliações foi severa. As reacções de infusão grave aguda ao IFX parecem não ser reacções anafilácticas mediadas por IgE, mas sim associadas ao desenvolvimento de anticorpos anti-IFX. O risco de reação é relativamente alto durante a terapia inicial ou de reiniciação, especialmente na segunda infusão numa nova série (96).

Dosagem dos mAbs

Nos seres humanos, 10-61% dos doentes desenvolvem anticorpos contra IFX após o tratamento IV (135) (136). A presença de anticorpos anti-IFX parece depender do nível de dose de IFX utilizado. Cinquenta e sete por cento dos indivíduos que receberam monoterapia com 1 mg de IFX / kg mostraram-se positivos para os anticorpos anti-IFX versus apenas 25% e 10% nos grupos 3 e 10mg / kg, respectivamente (116), ou seja para doses mais baixas de fármaco, surge maior quantidade de anticorpo anti-IFX.

A escalonagem da dose em doentes com doença de Crohn com IFX em doses sub-ótimas conduziu a um aumento significativo dos doentes em remissão clínica e uma redução significativa concomitante nas concentrações de PCR. Um efeito semelhante não foi observado para doentes com colite ulcerosa, provavelmente porque a maioria tinha um Partial Mayo (Anexo XI) Score de 0 e uma PCR normal. A redução da dose em doentes com doença de Crohn e colite ulcerosa com concentrações target de IFX supra-ótimas não provocou inflamações ou aumento de marcadores inflamatórios, mas resultou em economia significativa de custos (130).

De destacar um estudo pioneiro, que avalia prospectivamente o uso de doses individualizadas com base na exposição ao fármaco em doentes com IBD tratados com IFX de manutenção. Este estudo mostra que ao usar a monitorização de medicamentos terapêuticos, as concentrações target individuais dentro de uma determinada janela podem ser direcionadas. A relação causal entre a exposição ao fármaco e a eficácia do mesmo é agora confirmada prospectivamente, uma vez que a obtenção de concentrações target de IFX de 3 mg/mL resultou numa maior proporção de doentes com doença de Chron em remissão. As concentrações de 7 mg/mL permitiram redução segura da dose, resultando em economia substancial no custos dos medicamentos. Uma abordagem semelhante à dosagem dos antagonistas TNF α com base na exposição, pode utilizar-se noutras doenças inflamatórias crónicas, como a AR, espondilite anquilosante e psoríase (130).

Manter uma remissão clínica sustentada com terapias biológicas requer atenção a muitos fatores que podem levar à recidiva de sintomas. No cenário onde a inflamação ativa foi objetivamente confirmada e as infecções concomitantes foram excluídas, há uma série de decisões terapêuticas que podem ser feitas de forma pró-activa ou reactiva para melhorar a eficácia dos agentes biológicos, assim é importante realizar-se estudos aos níveis séricos de fármacos e ADA para o IFX (149).

De destacar o primeiro ensaio randomizado e controlado de um tratamento personalizado com base na biodisponibilidade e imunogenicidade do IFX no momento da falha terapêutica, de modo a identificar as causas mecanicistas mais prováveis de perda de resposta, promovendo a clínica racional, olhando ao custo-efectivo em vez do aumento da dose padrão(150).

Houve também correlações altamente significativas entre níveis elevados de ADAs e aumentos posteriores da dose, efeitos colaterais como reacções de infusão e cessação da terapia. Além disso, a actividade da doença de base pronunciada, avaliada por níveis elevados de proteína PCR pré-tratamento e de índice de actividade da doença, foi associada a baixos níveis de IFX precoce e posterior desenvolvimento de ADAs. O desenvolvimento de ADAs, anunciado por níveis baixos de IFX no soro pré-infusão, foi associado ao risco aumentado de reacções de infusão e falha no tratamento. Sabe-se que a monitorização precoce deveria ajudar a otimizar os regimes de dose individuais, diminuindo os efeitos adversos e prevenindo o uso prolongado de terapia IFX inadequadas (20).

Foi observado num estudo em primatas sobre o Adalimumab, onde 16/16 macacos desenvolveram a resposta de PAHA em doses baixas enquanto apenas 2/16 animais desenvolveram a resposta da PAHA para doses altas (91). Portanto, na prática clínica, os regimes de doses elevadas são usados como um modo de terapia para induzir tolerância (151).

Os dados preliminares recentemente apresentados num estudo controlado que compararam a administração precoce de IFX e azatioprina (AZA) em terapia top-down versus terapia convencional de Step-up mostraram cicatrização superior da mucosa na IBD, remissão mais rápida e maiores taxas de remissão em doentes no braço de tratamento top-down (166) (Anexo XII). Em doentes com IBD, estudos demonstram claramente a superioridade do top-down sobre a abordagem step-up demonstrado numa proporção significativamente maior de doentes em remissão nos doentes sujeitos a terapêutica em modo top-down, em comparação com o grupo step-up. Curiosamente, esta maior eficácia não apresentou maior proporção de efeitos colaterais nos doentes tratados no modo top-down(166).

Reacção cruzada em anticorpos

Doentes com AR expressam frequentemente anticorpos contra alótipos de IgG, muitas vezes em associação com a atividade do factor reumatóide e mais comumente contra os tipos de G1m e, portanto, potencialmente vinculativos para as construções anti-TNF α de IgG1 (152). Sabe-se ainda que a resposta inadequada ao tratamento de bloqueio do TNF na AR pode resultar da formação de anticorpos contra esses medicamentos (146).

É interessante que os ADAs introduzidos durante a terapia com IFX geralmente não conseguiram reagir com os outros dois, também construções IgG1 anti-TNF α , aprovadas atualmente, como o etanercept e o Adalimumab. Embora isso não exclua

que os anticorpos de reação cruzada possam aparecer após uma terapia de IFX mais prolongada, pode explicar por que uma mudança para outros fármacos anti-TNF α é eficaz em alguns doentes com insuficiência terapêutica ou intolerância aos fármacos (153) (154) (155).

Antes do início do tratamento, os doentes devem ser rastreados para os biomarcadores estabelecidos para verificar a potencial de imunogenicidade. Uma estratégia comumente adotada com terapêutica anti-TNF é mudar o biológico quando um doente se torna refractário a um anti-TNF particular (162).

Uso de imunossupressores na terapia com mAbs

Sabe-se que o tratamento imunossupressor concomitante previne a formação de anticorpos contra IFX, reduzindo assim a incidência de reações de infusão e aumentando a duração da resposta (66). As reações de infusão são eventos imunológicos importantes induzidos pela presença de uma concentração substancial de anticorpos contra o soro do IFX. Após uma reação de infusão, o IFX desaparece rapidamente do soro e é indetectável quatro semanas após uma infusão. Ao ocorrer uma reação de infusão, a duração da resposta às infusões subsequentes diminui. Uma vez que os anticorpos se desenvolvem logo após a infusão inicial na maioria dos doentes, pensa-se que a terapia imunossupressora deve ser instituída antes que a terapia com IFX seja iniciada, para prevenir a formação de anticorpos e melhorar a duração da resposta ao medicamento na influência da imunogenicidade na eficácia a longo prazo do IFX na Doença de Crohn (66) (109).

Os fabricantes finalmente reconheceram que os imunomoduladores como o MTX, a azatioprina e a mercaptopurina (6-MP) reduzem a produção de anticorpos contra os agentes TNF α . Esses dados sugerem que a terapia suplementar com imunomoduladores pode **prolongar a eficácia** dos produtos biológicos quando comparada à monoterapia com TNFi (156).

A utilização de agentes imunossupressores concomitantemente parece reduzir a frequência de reações relacionadas com a perfusão. Em estudos clínicos, utilizando doses únicas e múltiplas de 1 a 20 mg/kg de IFX, foram detetados anticorpos contra o IFX em 14 % dos doentes com qualquer terapia imunossupressora, e em 24 % dos doentes sem terapia imunossupressora. Em doentes com AR que receberam tratamento repetido com os regimes posológicos recomendados com MTX, 8 % dos doentes desenvolveram anticorpos contra o IFX. Em doentes com artrite psoriática que receberam 5 mg/kg, com ou sem MTX, 15 % do total desenvolveram anticorpos (os anticorpos ocorreram em 4 % dos doentes a receberem MTX e em 26 % dos doentes que não estavam a receber MTX na linha de base). Em doentes com doença de Crohn que receberam tratamento de manutenção, de uma forma geral, foram produzidos anticorpos contra o IFX em 3,3 % dos doentes tratados com imunossupressores e em 13,3 % dos doentes não tratados com imunossupressores. A incidência de anticorpos foi 2-3 vezes mais elevada em doentes que receberam tratamento episodicamente. Devido às limitações metodológicas, uma análise negativa não excluiu a presença de anticorpos contra o IFX. Alguns doentes que desenvolveram títulos elevados de anticorpos contra o IFX evidenciaram eficácia reduzida. Em doentes com psoríase tratados com IFX em regime de manutenção, na ausência de imunomoduladores concomitantes, aproximadamente 28% desenvolveram anticorpos contra o IFX (142).

Nos doentes com artrite idiopática juvenil poliarticular com idades compreendidas entre os 4 e os 17 anos, foram identificados anticorpos anti-Adalimumab em 15,8 % dos doentes, tratados com Adalimumab. Nos doentes que não receberam MTX concomitante, a incidência foi de 25,6% comparativamente a 5,9% quando Adalimumab foi utilizado como terapêutica adjuvante ao MTX. Em doentes com artrite relacionada com entesite, foram identificados anticorpos anti-Adalimumab em 10,9% dos doentes tratados com Adalimumab. Nos doentes que não receberam MTX concomitante, a incidência foi de 13,6% quando Adalimumab foi utilizado como terapêutica concomitante ao MTX. Os doentes nos estudos de AR I, II e III foram analisados em múltiplos pontos temporais para pesquisa de anticorpos anti-Adalimumab durante o período de 6 a 12 meses. Nos ensaios centrais, foram identificados anticorpos anti-Adalimumab em 5,5% dos doentes tratados com Adalimumab comparativamente a 0,5% com placebo. Nos doentes não submetidos a um tratamento concomitante com MTX, a incidência foi de 12,4%, comparativamente a 0,6% quando Adalimumab foi utilizado como terapêutica adjuvante ao MTX. Em doentes com psoríase pediátrica, foram identificados anticorpos anti-Adalimumab em 5/38 doentes tratados (13 %) com Adalimumab 0,8 mg/kg em monoterapia. Em doentes adultos com psoríase, tratados com Adalimumab em monoterapia, foram identificados anticorpos anti-Adalimumab em 77/920 doentes (8,4%). Em doentes com doença de Crohn pediátrica activa moderada a grave, a taxa de desenvolvimento de anticorpos anti-Adalimumab em doentes tratados com Adalimumab foi de 3,3%. Uma vez que as análises de imunogenicidade são específicas do produto, não é apropriado comparar as taxas de anticorpos com as de outros produtos (157).

O uso concomitante de MTX com um biológico reduz a imunogenicidade. Portanto, quando o MTX ou outras terapias imunossupressoras são administradas em combinação com agentes biológicos, o biológico possui uma eficácia mais duradoura (156).

O tratamento imunossupressor concomitante está correlacionado com um aumento da **duração da terapia**. Mais de 90% dos doentes que receberam IFX em combinação com um imunossupressor permaneceram tratados com IFX durante 1 ano, em comparação com 61% dos doentes do grupo em monoterapia. Além disso, foram observados níveis séricos aumentados de IFX, uma taxa reduzida de anticorpos anti-IFX e menos reações de infusão em doentes que receberam imunossupressores concomitantes. O uso concomitante de imunossupressores com IFX melhora os desfechos entre doentes com colite ulcerosa refratária, como demonstrado pela diminuição da imunogenicidade ao IFX e pelo aumento da duração da terapia. Foi possível também perceber que doses maiores de azatioprina se correlacionam directamente com a optimização da farmacocinética do IFX e com um aumento da duração da terapia (158).

A imunogenicidade emergiu como um determinante importante da falha do tratamento anti-TNF α na IBD. A terapêutica programada e a terapêutica concomitante com imunomoduladores mostraram estar associadas a um menor risco de imunogenicidade do (159) (160) (161).

Farmacovigilância

A informação relacionada com a imunogenicidade deve constar do Plano de Gestão do Risco (PGR), tendo em conta os eventos detectados e identificados durante o desenvolvimento do produto, assim como, os potenciais riscos e consequências de respostas imunes indesejadas nos doentes (60) (61).

Cada empresa farmacêutica deve ter um sistema de farmacovigilância implementado, o qual é utilizado pelo titular da AIM para monitorizar a segurança dos medicamentos autorizados e para detectar qualquer alteração na sua relação benefício-risco. Ao fabricante do medicamento biológico é exigido, juntamente com o pedido de autorização de comercialização, um plano de gestão de risco, de acordo com a legislação em vigor na União Europeia e de acordo com as guidelines de farmacovigilância incluindo a “CHMP Guideline on Risk Management Systems for Medicinal Products for Human Use (EMA/CHMP/96268/2005)” (17).

Este sistema de farmacovigilância é sujeito a inspeções pelas autoridades regulamentares. Cada empresa deve apresentar um PGR juntamente com o pedido de AIM. O PGR descreve, em detalhe, o sistema de gestão do risco que a empresa irá implementar assim que o medicamento em causa seja comercializado. O PGR descreve o perfil de segurança do medicamento e, ainda, como irá o fabricante monitorizar e resolver quaisquer lacunas de conhecimento, potenciais e conhecidas relativas à segurança e eficácia. O PGR também descreve as medidas que o requerente pretende implementar para evitar ou minimizar o risco potencial inerente à utilização do medicamento, incluindo a medição da sua eficácia na prática clínica (47).

A imunogenicidade deve sempre ser incluída no PGR tendo em conta os riscos identificados no desenvolvimento do medicamento, e potenciais riscos e consequências de respostas imunes indesejáveis nos doentes. A extensão dos dados da imunogenicidade, que podem ser obtidos durante o programa de desenvolvimento clínico de produtos derivados de biotecnologia, depende da frequência do acontecimento, definido quer pelo potencial imunogénico das proteínas quer pela raridade da doença.

A quantidade de dados de imunogenicidade a serem colhidos após aprovação vai estar dependente dos seguintes fatores:

- relação com a prevalência da doença, com a vulnerabilidade dos doentes,
- disponibilidade de alternativas terapêuticas, duração do tratamento, etc.;
- resultados de imunogenicidade na pré-autorização incluindo impacto na eficácia e segurança;
- experiência de imunogenicidade com proteínas semelhantes ou relacionadas com a mesma classe de proteínas, incluindo aquelas que são obtidas por processo de fabrico semelhante;
- gravidade da reacção imunológica.

A imunogenicidade pode ser estudada mais aprofundadamente pós autorização através de relatórios relacionados com acontecimentos adversos imunológicos, que inclui perda de eficácia, ou através de estudos fármaco-epidemiológicos. A necessidade de avaliação destes acontecimentos é definida prospetivamente no PGR. O Titular de AIM deve estabelecer um algoritmo normalizado de como investigar esses casos suspeitos de reacções imunológicas, incluindo como confirmar o desenvolvimento de anticorpos num determinado caso (18).

O PGR inclui vários itens, como:

- Identificação e caracterização do risco como a definição de caso, ensaios com anticorpos
- Monitorização do risco, como por exemplo o período específico para associar risco com o medicamento.
- Minimização do risco e estratégias de mitigação, que inclui o plano restrito para uso IV quando necessário, acções propostas em resposta a um determinado risco detectado, entre outros;
- Comunicação do risco através de mensagens de minimização e mitigação para doentes e clínicos, comunicação a médicos sobre como aceder a ferramentas de investigação específicas como ensaios de testes de anticorpos.
- Atividades de monitorização que assegurem efetividade de minimização do risco.

Os requerentes devem responder a dados novos de imunogenicidade adoptando medidas adequadas que poderão passar por alteração da informação do medicamento, atualizar o PGR, e outras medidas de minimização do risco como os programas educacionais.

A legislação de Farmacovigilância (Diretiva 2010/84/CE de 15 de dezembro e Regulamento 1235/2010) estabeleceu que a EMA em colaboração com os Estados Membros elaboraria, geriria e publicaria a lista de medicamentos que seriam sujeitos a uma monitorização adicional que inclui:

- novas substâncias activas;
- os medicamentos biológicos, onde se encontram incluídos os biossimilares.
- medicamentos sujeitos à obrigação de realização de estudos adicionais de segurança (PASS) ou de eficácia (PAES):
- outros medicamentos a pedido dos Estados Membros.

As substâncias constantes da lista serão objeto de apresentação de relatórios periódicos de segurança (PSUR) e PGR. Para estes medicamentos, a informação do medicamento, nomeadamente Resumo das Características do Medicamento (RCM) e Folheto Informativo (FI), incluem um triângulo invertido de cor preta que identifica a necessidade de monitorização adicional (163).

Os doentes e os profissionais de saúde devem notificar quaisquer suspeitas de efeitos secundários observados com estes medicamentos para que possam ser analisadas de forma mais eficiente (17).

Conclusão

Sabe-se que a imunogenicidade dos fármacos biológicos é uma realidade, a sua intensidade e consequências são variáveis e muitas vezes imprevisíveis. Podemos observar a diminuição da eficácia do produto, reacções de hipersensibilidade e até mesmo diminuição da tolerância imunológica, sendo esta a mais grave, uma vez que o organismo começa a não tolerar as suas próprias proteínas.

Existe uma lacuna na predição da imunogenicidade em humanos devido a vários factores, que incluem dificuldades em padronizar uniformemente os ensaios com células T do sangue humano, falta de dados clínicos extensivos correlacionados com modelos preditivos e a interacção entre imunogenicidade e tolerância. Um progresso significativo nesta área envolveria não só a disponibilidade de ensaios robustos com sensibilidade e reprodutibilidade suficientes, mas também desvendar a complexidade do ser humano levando à produção de anticorpos ainda mais específicos (47).

Continuam a existir questões sobre os mecanismos detalhados da imunogenicidade e a necessidade de uma geração de ensaios robustos para a avaliação de ADA, cada uma das quais necessita urgentemente de input intelectual mais amplo por parte da comunidade de investigadores na área de imunologia.

Os mecanismos subjacentes às diferentes respostas de imunogenicidade e tratamento devem ser determinados, sendo necessárias mais investigações para elucidar os perfis clínicos que afectam este evento imunológico.

As recomendações incluem o desenvolvimento de ensaios para detectar e confirmar adequadamente a presença de ADAs e técnicas para discernir anticorpos neutralizantes e não neutralizantes, a sistematização de dados de doentes em estudos clínicos e padronização de métodos em estudos para um determinado biofármaco.

Os programas de pesquisa, agências reguladoras e clínicos precisam de acompanhar as análises em contínua evolução da imunogenicidade (66). Antecipa-se que as análises de imunogenicidade continuarão a evoluir à medida que surgirem novas técnicas, como avaliação de biomarcadores genéticos e epigenéticos *in silico* (66).

Espera-se num futuro próximo que a imunogenicidade possa ser melhor avaliada durante o processo de desenvolvimento de fármacos e que surjam abordagens racionais para gerir as consequências clínicas da imunogenicidade. O foco da comunidade científica deve ser o desenvolvimento de testes de diagnóstico de elevada sensibilidade, que possam prever eventos adversos mediados pela imunogenicidade na pequena fracção de doentes que desenvolvem ADAs clinicamente relevantes.

Referências Bibliográficas

1. Saxon A., Wall R., Morrison, S., The Second Century of the Antibody Molecular Perspectives in Regulation, Pathophysiology, and Therapeutic Applications. *The Western Journal of Medicine*. 1992. 157(2): pp158-68.
2. Colcher D., Goel A., Pavlinkova G., Beresford G., Booth B., Batra S., Effects of genetic engineering on the pharmacokinetics of antibodies. *Q J Nucl Med*, 43. 1999. pp. 132-139.
3. Kohler G., Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.. *J Immunol*, 174. 2005. pp. 2453-2455.
4. Sgro C. Side-effects of a monoclonal antibody, muromonab CD3/orthoclone OKT3: bibliographic review. *Toxicology*, 105.1995. pp. 23-29.
5. Coleho J. Anticorpos Monoclonais. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade Ciências da Saúde. Porto. 2014.pp1-91
6. Stern M., Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005 Abril 54, pp. 11-29.
7. Catapano A., Papadopoulos N. The safety of therapeutic monoclonal antibodies: implications for cardiovascular disease and targeting the PCSK9 pathway. 2013. May;228(1):18-28. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.01.044. Epub 2013 Feb 8.
8. Bakr M. Induction therapy. *Exp. Clin. Transplant*, 2005, 3, pp. 320-328. 52
9. Casanova Estruch B., Safety profile and practical considerations of monoclonal antibody treatment. *Neurologia*, 2013. 28, pp. 169-178.
10. Newsome B., Ernstoff M., The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies in the treatment of malignancy; have the magic bullets arrived? *Br J Clin Pharmacol*, 2008 66, pp. 6-19.
11. Presta L., Lahr S., Shields R., Porter J., Gorman C., , Fendly M., et al., Humanization of an antibody directed against IgE. *J Immunol*, 1993 151, pp. 2623-2632.
12. Nelson A., Dhimolea E., Reichert J. Development trends for human monoclonal antibody therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 2010. pp. 767-774.
13. Regeneron. (2011). Disponível em <<http://www.regeneron.com/velocimmune>>. [Consultado em 07/07/2017].
14. Lonberg N., Huszar D. Human antibodies from transgenic mice. *Int Rev Immunol*, 13, 1995., pp. 65-93.
15. Jakobovits A. The long-awaited magic bullets: therapeutic human monoclonal antibodies from transgenic mice. *Expert Opin Investig Drugs*, 7, 1998 pp. 607-614.
16. Morrow T., Felcone LH., Defining the difference: what makes biologics unique. *Biotechnol Healthc.*; 20041,(4): pp 24–29.
17. Oliveira R., Aires T. Biossimilares: Velhas Questões, Novos Desafios. *GAZETA MÉDICA* No3 ·2016 VOL. 3 · JULHO/SETEMBRO 2016 pp106-111
18. EMA,. Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev. 1. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2015. pp 1-23
19. Santos R; Lima P., Nitsche A., Harth F. Melo F. Akamatsu H et al, Aplicações terapêuticas dos anticorpos monoclonais. *Ver. Bras. Alerg. Imunopatol*. 2006

vol 29 n°2 pp 77-85

20. Van de Weert M. Møller E. Immunogenicity of Biopharmaceuticals. 1ª edição. Copenhagen, Denmark. Springer. 2008
21. Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks 2010. *Nat Biotechnol.*; 2010 28(9):pp917–924.
22. Mandel M., Miheller P., Mullner K, Golovics P., Lakatos P., Have biologics changed the natural history of Crohn’s disease? *Dig Dis* 2014; 32:pp351–359.
23. Ordás I. Mould D., Feagan B. Sandborn B. Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms, *Clin. Pharmacol. Ther.* 91. 2012.pp 635–646.
24. Karmiris K., Paintaud G., Noman M., Magdelaine-Beuzelin C., Ferrante M., Degenne D., et al. Influence of trough serum levels and immunogenicity on long-term outcome of Adalimumab therapy in Crohn’s disease. *Gastroenterology* 2009;137:pp1628–1640.
25. Salazar-Fontana L., Desai D., Khan T., Pillutla R. Prior S. Ramakrishnan R., et al. Approaches to Mitigate the Unwanted Immunogenicity of Therapeutic Proteins during Drug Development. *The AAPS Journal*, Vol. 19, No. 2, 2017 pp 377–385
26. Strand V., Smith J. Introduction of a biologic agent into the clinic. In: Weinblatt ME, Louie JS, van Vollenhoven RF Targeted treatment of the rheumatic diseases. Philadelphia: Saunders; 2010. pp451-462. 27.
27. Kessler M., Goldsmith D., Schellekens H. Immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nephrol Dial Transplant.*; 21(Suppl 5)2006:pp9-12.
28. Dorner T., Strand V., Castaneda-Hernandez G., Ferraccioli G., Isaacs J., Kvien T., et al The role of biosimilars in the treatment of rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis.* 2013;pp72:322–8.
29. WHO- Guidelines on Evaluation of Similar Biotherapeutic Products (SBPs). Expert Committee on Biological Standardization. Geneva: 2009 WHO Technical series no. 977, 2013 Annex 2. pp1-34
30. Sekhon B., Saluja V. Biosimilars: an overview. *Biosimilars* 2011;1. pp1-11
31. EMA. European Medicines Agency recommends approval of first two monoclonal-antibody biosimilars. London: EMA 2013; pp1-2
32. Schon M., Boehncke W. Psoriasis. *N Engl J Med* 2005; 352: pp1899–1912.
33. Griffiths C., Barker J. Pathogenesis and clinical features of psoriasis. *Lancet* 2007; 370: pp263–271.
34. Gudjonsson J, Elder J. Psoriasis: epidemiology. *Clin Dermatol.* 25 2007:pp-535-46.
35. Torres T., Velho G., Sanches M, Selores M. Psoríase na era dos biológicos. *Acta Med Port.*; 23: 2010 pp493-8.
36. Daniel K. Podolsky, M. (1991) Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 325:1991 pp1008-1016.
37. Cobrin G., Abreu M. Defects in mucosal immunity leading to Crohn’s disease. *Immunol Rev* 2005; 206: pp 277-29
38. Targan S., Karp L. Defects in mucosal immunity leading to ulcerative colitis. *Immunol Rev* 2005; 206:pp 296-305
39. McInnes, I., Gerog S., Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis Targeted treatments for rheumatoid arthritis 1 *Lancet* 2017; 389:pp

40. Goodnow C. Transgenic mice and analysis of B-cell tolerance. *Annu Rev Immunol.* 1992;10:pp489–518.
41. Hogquist K., Baldwin T., Jameson S. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol.* 2005;5(10):pp772–82.
42. Romagnani, S. Immunological tolerance and autoimmunity *Intern Emerg Med* 2006, Vol 1 No 3 Italy (3):pp187-96.
43. Rubin, R. (2006) Central and peripheral tolerance in Autoantibodies and Autoimmunity: Molecular Mechanisms in Health and Disease. 1ª edição USA. K. Michael Pollard. Wiley-VCH.
44. Rocha A., Grandien A., Freitas A. Anergy and exhaustion are independent mechanisms of peripheral T cell tolerance. *J. Exp. Med.* 181,1995 pp 993–1003.
45. Jawa V., Cousens L., Awwad M., Wakshull E., Kropshofer H., Degroot A. T-cell dependent immunogenicity of protein therapeutics: preclinical assessment and mitigation, *Clinical Immunology*, vol. 149, 2013 pp. 534–555, 2013.
46. Barbosa M., Celis E. Immunogenicity of protein therapeutics and the interplay between tolerance and antibody responses. *Drug Discov Today.*2007;12(15–16):pp674–81.
47. COMISSÃO EUROPEIA (2013) O que precisa saber sobre medicamentos biológicos. Documento Informativo de Consenso. Enterprise and Industry 2013 pp1-46
48. De Groot A., Scott D. Immunogenicity of protein therapeutics, *Trends Immunol.* 2007 28 pp482–490.
49. Van Schouwenburg T. Rispens G., Wolbink J., Immunogenicity of anti-TNF biologic therapies for rheumatoid arthritis, *Nat. Rev. Rheumatol.* 2013 9 pp164–172.
50. Vos, Q., Lees A., Wu Z., Snapper C., Mond J., B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms, *Immunol. Rev.* 2000.176 pp154–170.
51. Shaw D., Stanley C., Partidos C., Steward M. Influence of the T-helper epitope on the titre and affinity of antibodies to B-cell epitopes after co-immunization. *Molecular immunology.* 1993; 30 (11):pp961–968. PMID: 7688851
52. Senpuku H., Iizima T., Yamaguchi Y., Nagata S., Ueno Y., Saito M, et al. Immunogenicity of peptides coupled with multiple T-cell epitopes of a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *Immunology.* 1996; 88(2):pp275–283. PMID: 8690461
53. Kumar S., Singh S., Wang X., Rup B., Gill D. Coupling of aggregation and immunogenicity in biotherapeutics: T- and B-cell immune epitopes may contain aggregation-prone regions, *Pharm. Res.* 2011 28 9pp49–961.
54. Sethu S., Govindappa K., Alhaidari M., Pirmohamed M., Park K., Sathish J., Immunogenicity to biologics: mechanisms, prediction and reduction, *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 2012 60 pp331–344.
55. Guinamard R., Okigaki M., Schlessinger J., Ravetch J., Absence of

- marginal zone B cells in Pyk-2-deficient mice defines their role in the humoral response, *Nat. Immunol.* 2000;1:pp31–36.
56. Puga I., Cols M., Barra C., He B., Cassis L., Gentile M., Comerma L., et al B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen, *Nat. Immunol.* 2012;13:pp170–180.
 57. Lacroix-Desmazes S., Navarrete A., Andre S., Bayry J., Kaveri S., Dasgupta, S. Dynamics of factor VIII interactions determine its immunologic fate in hemophilia A, *Blood* 2008;112:pp240–249.
 58. Sauerborn M, Brinks V, Jiskoot W, Shellekens H Immunological mechanism underlg the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2010; 31:pp53–59
 59. Fasanmade A., Adedokun O., Blank M., Zhou H., Davis H., Pharmacokinetic properties of infliximab in children and adults with Crohn’s disease: a retrospective analysis of data from two phase III clinical trials. *Clin Ther* 2011;33:pp946–964.
 60. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov.* ;2002;1:pp457-462.
 61. WHO Expert committee on biological standardization. Geneva, 19 to 23 October 2009. Guidelines on evaluation of similar biotherapeutic products(SBPs). [consultado em Agosto 2017] Available from: http://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010.pdfhttp://www.who.int/biologicals/areas/biological_therapeutics/BIOTHERAPEUTICS_FOR_WEB_22APRIL2010 25. US Food and Drug Administration.
 62. Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J., Martin-Dupont P. et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin, *N. Engl. J. Med.* 346 (2002) pp-469–475.
 63. Shankar G., Pendley C., Stein K. A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs. *Nat Biotechnol.* 2007;25(5):pp555–561. doi:10.1038/nbt1303.
 64. Pendley C., Schantz A., Wagner C. Immunogenicity of therapeutic monoclonal antibodies. *Curr Opin Mol Ther.* 2003;5(2):pp172–199.
 65. Abraham I., Sun D., Bagalagel A., Altyar A., Mohammed A., Tharmarajah S., et al. Biosimilars in 3D: de nition, development and differentiatio *Bioengineered.*2013;4:pp203-206.
 66. Carlos P., Castaneda G. ,Ira A. , Daniel F., Claudio C., Assessing the Immunogenicity of Biopharmaceuticals. *BioDrugs* (2016) 30:pp195–206 DOI 10.1007/s40259-016-0174-5
 67. Vaz A., Alcobia A. Ribeiro C., Pinto C, Canhão H., Cruz J. et al *MEDICAMENTOS BIOSSIMILARES . Rev Port Farmacoter |* 2013;5:pp208-215
 68. Purcell A. Van Driel I., Gleeson P. Impact of glycans on T-cell tolerance to glycosylated self-antigens *Immunology and Cell Biology* (2008) 86, pp 574–579 & 2008 Australasian Society for Immunology

69. Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: clinical implications and future prospects. *Clin Ther.* 2002;24(11):pp1720–1740
70. Shankar G., Pendley C., Stein K. A risk-based bioanalytical strategy for the assessment of antibody immune responses against biological drugs. *Nat Biotechnol.* 2007;25(5):pp555–561. doi:10.1038/nbt1303.
71. Li J., Yang C., Xia Y., Bertino A., Glaspy J., Roberts M., et al. Thrombocytopenia caused by the development of antibodies to thrombopoietin. *Blood.*;2001 98(12):pp3241–3248.
72. Casadevall N., Nataf J., Viron B., Kolta A., Kiladjian J., Martin- Dupont P., et al Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med.*;2002 346(7):pp469–475. doi:10.1056/NEJMoa011931.
73. Harding F., Stickler M., Razo J., DuBridge R. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions, *mAbs*, 2010 vol. 2, no. 3, pp. 256–265,
74. Coles, J. (2013) Alemtuzumab therapy for multiple sclerosis, *Neurother.* 2013 Jan;10(1):pp29-33. doi: 10.1007/s13311-012-0159-0.
75. Barbosa M., Kumar S., Loughrey H., Singh S. Biosimilars and biobetters as tools for understanding and mitigating the immunogenicity of biotherapeutics. *Drug Discov Today.* 2012;17(23–24):pp1282–1288. doi:10.1016/j.drudis.2012.07.003.
76. Arnott I., McNeill G., Satsangi J. An analysis of factors influencing short-term and sustained response to infliximab treatment for Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.*2003 ;17:pp1451–1457.
77. Parsi M., Achkar J., Richardson S, Katz J., Hammel J., Lashner B. et al. Predictors of response to infliximab in patients with Crohn's disease. *Gastroenterology.*2002 ;123:pp707–713.
78. Harper J., Sinanan M., Zisman T. Increased body mass index is associated with earlier time to loss of response to infliximab in patients with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2013 ;19:pp2118–2124.
79. Vermeire S., Louis E., Carbonez A., Van Assche G., Noman M., Belaiche J. et al. Demographic and clinical parameters influencing the short-term outcome of anti-tumor necrosis factor (infliximab) treatment in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol.*;200297:pp2357–2363.
80. Reinisch W., Wang Y., Oddens B., Link R., C-reactive protein, an indicator for maintained response or remission to infliximab in patients with Crohn's disease: a post-hoc analysis from ACCENT I. *Aliment Pharmacol Ther.*2012 ;35:pp568–576.
81. Ordas I, Mould D., Feagan B., Sandborn W., Anti-TNF monoclonal antibodies in inflammatory bowel disease: pharmacokinetics-based dosing paradigms. *Clin Pharmacol Ther.* 2012;91:pp635–646.
82. Hoffmann S., Cepok V., Grummel K., Lehmann-Horn, J., Hackermuller, P., Stadler, H., et al HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis, *Am. J. Hum. Genet.* 2008 83 pp219–227.
83. Astermark J., Prevention and prediction of inhibitor risk, *Haemophilia* 18 (Suppl. 4) 2012 pp 38–42.

84. Bartelds M., Wijbrandts C., Nurmohamed M, Wolbink G., Vries N, Tak P., et al. Anti- Adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms, *Arthritis Rheum.*2009 60 pp2541–2542.
85. Astermark J, Oldenburg J, Pavlova A, Berntorp E, Lefvert AK, and the MIBS Study Group. Polymorphisms in the IL10 but not in the IL1 and IL4 genes are associated with inhibitor development in patients with hemophilia A. *Blood*;2006107:pp3167–3172.
86. Huang D., Zhou Y., Xia S., Liu L., Pirskanen R., Lefvert A. Markers in the promoter region of interleukin-10 (IL-10) gene in myasthenia gravis: implications of diverse effects of IL-10 in the pathogenesis of the disease. *J Neuroimmunol*;199994:pp82–87.
87. Crusius J., Van der Horst-Bruinsma I. Anti-Adalimumab antibodies in rheumatoid arthritis patients are associated with interleukin-10 gene polymorphisms **CONCISE COMMUNICATION ARTHRITIS & RHEUMATISM** Vol. 60, No. 8, August 2009, pp 2541–2542 DOI 10.1002/art.24709 © 2009, American College of Rheumatology
88. Okuyama A., Nagasawa H., Suzuki K., Kameda H., Kondo H., Amano K., et al. Fcγ receptor IIIb polymorphism and use of glucocorticoids at baseline are associated with infusion reactions to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:pp299–304.
89. Ungar B., Haj-Natour O., Kopylov U., Yavzori M., Fudim E., Picard O., Ashkenazi Jewish Origin Protects Against Formation of Antibodies to Infliximab and Therapy Failure. *Medicine* Volume 94, Number 18, May 2015. DOI: 10.1097/MD.0000000000000673
90. Buttel I., Chamberlain P., Chowers Y., Ehmann F., Greinacher A., Jefferis R., et al. Taking immunogenicity assessment of therapeutic proteins to the next level. *Biologicals*. ;39(2):2011 100–9. doi:10.1016/j.biologicals.2011.01.006.
91. Singh, S. Impact of product-related factors on immunogenicity of biotherapeutics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100, no. 2, 2011. pp. 354–387,
92. Jahn E., Schneider C. How to systematically evaluate immunogenicity of therapeutic proteins—regulatory considerations. *N Biotechnol.* 2009;25(5):pp280–286. doi:10.1016/j.nbt. 03.012.
93. Kuriakose A., Chirmule N. , Nair P. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. Volume 2016, Article ID 1298473, 18 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1298473>
94. Verthelyi D., Wang V., Trace levels of innate immune response modulating impurities (IIRMI) synergize to break tolerance to therapeutic proteins, *PLoS ONE* 2010 volume 5 Issue 12 e15252.
95. Chung C., Mirakhor B., Chan E., Le Q., Berlin J., Morse M., Murphy B., et al. Cetuximab-induced anaphylaxis and Ig E speci for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med.*2008 ;358:pp1109-1117.
96. Steenholdt C., Svenson M., Bendtzen K., Thomsen O., Brynskov O., Ainsworth M. (2011) Infusion reactions to infliximab: aetiology, immunogenicity and risk factors in patients with inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics.*2011 ul;34(1):51-8. doi: 10.1111/

97. Wolbink G., Aarden L., Dijkmans B. Dealing with immunogenicity of biologicals: assessment and clinical relevance. *Curr Opin Rheumatol.* 2009;21(3):pp211–215.
98. Yin L., Chen X., Vicini P., Rup B., Hickling T. Therapeutic outcomes, assessments, risk factors and mitigation efforts of immunogenicity of therapeutic protein products. *Cell Immunol.* 2015;295(2):pp118–126. doi:10.1016/j.cellimm.2015.03.002.
99. Van Schouwenburg P., Bartelds G., Hart M., Aarden L., Wolbink G., Wouters D. A novel method for the detection of antibodies to Adalimumab in the presence of drug reveals “hidden” immunogenicity in rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods.* 2010;362(1–2):pp82–88. doi:10.1016/j.jim.2010.09.005.
100. Patton A., Mullenix M., Swanson S., Koren E., An acid dissociation bridging ELISA for detection of antibodies directed against therapeutic proteins in the presence of antigen. *J Immunol Methods.* 2005;304(1–2):pp189–195. doi:10.1016/j.jim.2005.06.014.
101. Sickert D., Kroeger K., Zickler C., Chokote E., Winkler B., Grenet J., et al. Improvement of drug tolerance in immunogenicity testing by acid treatment on Biacore. *J Immunol Methods.* 2008;334(1–2):pp29–36. doi:10.1016/j.jim.2008.01.010.
102. Bourdage J., Cook C., Farrington D., Chain J., Konrad R. An affinity capture elution (ACE) assay for detection of anti-drug antibody to monoclonal antibody therapeutics in the presence of high levels of drug. *J Immunol Methods.* 2007;327(1–2):pp10–17. doi:10.1016/j.jim.2007.07.004.
103. Schmidt E., Hennig K., Mengede C., Zillikens D., Kromminga A. Immunogenicity of rituximab in patients with severe pemphigus. *Clin Immunol.* 2009;132(3):pp334–41. doi:10.1016/j.clim.2009.05.007.
104. Wang S., Ohrmund L., Hauenstein S., Salbato J., Reddy R., Monk P., et al. Development and validation of a homogeneous mobility shift assay for the measurement of infliximab and antibodies-to-infliximab levels in patient serum. *J Immunol Methods.* 2012;382(1–2):pp177–188. doi:10.1016/j.jim.2012.06.002.
105. Bloem K., Van Leeuwen A., Verbeek G., Nurmohamed M., Wolbink G., Van der Kleij D., et al. Systematic comparison of drug-tolerant assays for anti-drug antibodies in a cohort of Adalimumab-treated rheumatoid arthritis patients. *J Immunol Methods.* 2015;418:pp29–38. doi:10.1016/j.jim.2015.01.007.
106. Kopylov U., Mazor Y., Yavzori M, Fudim E., Katz L., Coscas D., et al., (2012) Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA or the detection of anti-infliximab antibodies, *Inflamm. Bowel Dis.* 2012 18 pp1628–1633.
107. Zhang T., Quan C., Dong M. HPLC for Characterization and Quality control of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *LcGC North America.* Volume 32, Issue 10, 2014 pg 796–808
108. Maini R., Breedveld C., Kalden R., Smolen S., Davis D., Macfarlane J. et al. Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor a monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthrit. Rheum.* 1998 41:pp1552–1563.

109. Baert F., Noman M., Vermeire S., Van Assche G., D' Haens G., Carbonez A., et al. Influence of Immunogenicity on the Long-Term Efficacy of Infliximab in Crohn's Disease. *The New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society. *N Engl J Med*. 2003 Feb 13;348(7):pp601-608.
110. Svenson M., Geborek P., Saxne T., Bendtzen K. Monitoring patients treated with anti-TNF-alpha biopharmaceuticals – assessing serum infliximab and anti-infliximab antibodies. *Rheumatology*. 2007. 46:pp1828–1834.
111. Svenson M., Nedergaard S., Heegaard P., Whisenand, T., Arend, W., Bendtzen, K. Differential binding of human interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist to natural and recombinant soluble and cellular IL-1 type I receptors. *Eur. J. Immunol*. 1995. 25:pp2842–2850
112. Hennig C., Rink L., Fagin U., Jabs W, Kirchner H. The influence of naturally occurring heterophilic anti-immunoglobulin antibodies on direct measurement of serum proteins using sandwich ELISAs. *J. Immunol. Methods* 2000 235:pp71–80
113. Bendtzen K. Anti-IFN BAb and NAb antibodies: A minireview. *Neurology* 2003.61 (Suppl. 5):S6–S10.
114. Lallemand C., Kavrochorianou N., Steenholdt C., Bendtzen K., Ainsworth M., Meritet J., et al., Reporter gene assay for the quantification of the activity and neutralizing antibody response to TNF α antagonists, *J. Immunol. Methods*. 2011.373 pp229–239.
115. Pavlov I., Carper J., Lázár-Molnár E., Delgado J. Clinical laboratory application of a reporter-gene assay for measurement of functional activity and neutralizing antibody response to infliximab. *Clinica Chimica Acta* 453 (2016) pp147–153 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.015> 0009-8981/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.
116. Van Mierlo G., Cnubben N., Wouters D., WolbinK G., Hart M. The minipig as an alternative non-rodent model for immunogenicity testing using the TNF α blockers Adalimumab and infliximab SSN: 1547-691X (print), 1547-6901 (electronic) *J Immunotoxicol*, 2014; 11(1): pp62–71 2014 Informa Healthcare USA, Inc. DOI: 10.3109/1547691X.2013.796023
117. Shankar G., Shores E., Wagner C., Mire-Sluis A. Scientific and regulatory considerations on the immunogenicity of biologics *Trends in Biotechnology*, vol. 24, no. 6, 2006. pp. 274–280,
118. Brinks V., Jiskoot W., Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models, *Pharmaceutical Research*, vol. 28, no. 10, 2011 pp. 2379–2385,
119. Lobo E., Hansen R., Balthasar, J. Antibody pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Pharm. Sci.* 93:2004.pp2645–2668.
120. Gaitonde P., Balu-Iyer S In vitro immunogenicity risk assessment of therapeutic proteins in preclinical setting, in *Drug Design and Discovery*, vol. 716 of *Methods in Molecular Biology*, pp. 267–280, Springer, Berlin, Germany, 2011.
121. Joubert M., Hokom M., Eakin C., Zhou L., Deshpande M., Baker M., et al., Highly aggregated antibody therapeutics can enhance the in vitro innate and late-stage T-cell immune responses, *e Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, no. 30, 2012. pp. 25266–25279,

122. Tovey M., Legrand J., Lallemand C., Overcoming immunogenicity associated with the use of biopharmaceuticals, *Expert Review of Clinical Pharmacology*, vol. 4, no. 5, 2011. pp. 623–631,
123. Koren E., DeGroot A., Jawaeta V., Clinical validation of the 'in silico' prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein, *Clinical Immunology*, vol. 124, no. 1, 2007. pp. 26–32,
124. Baker M., Reynolds, H., Lumicisi B., Bryson, C. Immunogenicity of protein therapeutics: Key causes, consequences and challenges. *Self Nonself*. 2010.1:314–322.
125. Wang X., Das T., Singh S., Kumar S. Potential aggregation prone regions in biotherapeutics: a survey of commercial monoclonal antibodies, *mAbs*, vol. 1, no. 3, 2009. pp. 254–267,
126. Bhogal N. Immunotoxicity and immunogenicity of biopharmaceuticals: Design concepts and safety assessment. *Curr. Drug Saf.* 2010. 5: pp293–307.
127. Wierda D., Smith, H., Zwickl, C. Immunogenicity of biopharmaceuticals in laboratory animals. *Toxicology*. 2001. 158: pp71–74.
128. Bugelski P., Treacy G. Predictive power of pre-clinical studies in animals for the immunogenicity of recombinant therapeutic proteins in humans. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2004.6: pp10–16.
129. Steenholdt C, Brynskov J, Thomsen OO., Munck L., Fallingborg J., Christensen L., et al. (Individualised therapy is more cost-effective than dose intensification in patients with Crohn's disease who lose response to anti-TNF treatment: a randomised, controlled trial. *Gut* 2014;63: pp919–927.
130. Vande Casteele N., Ferrante M., Assche G., Ballet V., Compennolle G., Van Steen K., et al. Trough Concentrations of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* Vol. 148, No. 7 2015. un;148(7): pp1320-1329.
131. Valie E., Gross M., Bickson S. Infliximab. *Expert Opin Pharma-Coter*. 2001. 2: pp1015-1025
132. Bain B., Brazil M., Adalimumab. *Nat Ver Drug Discov*. 2003. 2: 693-94
133. Saripalli Y., Gaspari A. Focus on: biologics that affect therapeutic agents in dermatology. *J Drus Dermatol*. 2005. 4: pp233-245
134. Afif W., Loftus W., Faubion W., Kane S., Bruining D., Hanson K. et al. Clinical utility of measuring infliximab and human anti-chimeric antibody concentrations in patients with inflammatory bowel disease, *Am. J. Gastroenterol.* 105 (2010) pp1133–1139.
135. Paserchia, L., (FDA). (1999). Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm107725.pdf> consultado a 7/7/2017
136. Wolbink, G., Vis M., Lems W., Voskuyl A., De Groot E., Nurmohamed M., et al. Development of anti-infliximab antibodies and relationship to clinical response in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2006.54: pp711–715.
137. Bendtzen K., Ainsworth M., Steenholdt S. Thomsen O. Brynskov J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies, *Scand. J. Gastroenterol.* 44 (2009) pp 774–781.

138. Radstake T., Svenson M., Eijsbouts A., Van den Hoogen F., Enevold C., Van Riel P., et al. Formation of antibodies against infliximab and Adalimumab strongly correlates with functional drug levels and clinical responses in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2009; 68:pp1739–1745. doi: 10.1136/ard.2008.092833 PMID: 19019895.
139. Ishikawa Y., Fujii T., Ishikawa S., Yukawa N., Hashimoto M., Moritoshi F., et al. (2016) Immunogenicity and Lupus-Like Autoantibody Production Can Be Linked to Each Other along With Type I Interferon Production in Patients with Rheumatoid Arthritis Treated With Infliximab: A Retrospective Study of a Single Center Cohort. *PLOS ONE* | DOI:10.1371/journal.pone.0162896
140. Ben Horin S, Mazor Y, Yanai H, Ron Y., Kopylov U., Yavzori M., et al. The decline of anti-drug antibody titres after discontinuation of anti-TNFs: implications for predicting reinduction outcome in IBD. *Aliment Pharmacol Ther* 2012;35:pp714–722.
141. Vande C., Gils A., Singh S., Ohrmund L., Hauenstein S., Rurgeerts ., et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am J Gastroenterol* 2013;108:pp962–971.
142. EMA (2013) RCM Reimsima http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002576/WC500150871.pdf consultado a 3/5/2017
143. Takase K., Horton S., Ganesh A., Das S., McHugh A., Emery P., et al. What is the utility of routine ANA testing in predicting development of biological DMARD-induced lupus and vasculitis in patients with rheumatoid arthritis? Data from a single-centre cohort. *Ann Rheum Dis.* 2014; 73:pp1695–1699. doi: 10.1136/annrheumdis-2014-205318 PMID: 24854356
144. Kay J., Fleischmann R., Keystone E., Hsia E., Hsu B., Mack M., et al. Golimumab 3-year safety update: an analysis of pooled data from the long-term extensions of randomised, double-blind, placebo-controlled trials conducted in patients with rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis or ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 2015; 74:pp538–546. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204195 PMID: 24344160; PubMed Central PMCID: PMC4345908.
145. Moulis G., Sommet A., Lapeyre-Mestre M., Montastruc J., PharmacoVigilance AFdCRd. Is the risk of tumour necrosis factor inhibitor-induced lupus or lupus-like syndrome the same with monoclonal antibodies and soluble receptor? A case/non-case study in a nationwide pharmacovigilance database. *Rheumatology (Oxford).*;2014. 53:pp1864–1871. doi: 10.1093/rheumatology/keu214 PMID: 24899660.
146. Bartelds G., Wijbrandts C., Nurmohamed M., Stapel S., Lems W., Aarden L., et al. Clinical response to Adalimumab: relationship to anti-Adalimumab antibodies and serum Adalimumab concentrations in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2007;66:pp921–926.
147. Vogelzang E., Kneepkens E., Nurmohamed M. Van Kuijk A., Rispens T., Wolbink G., et al. Anti-Adalimumab antibodies and Adalimumab concentrations in psoriatic arthritis; an association with disease activity at 28 and 52 weeks of follow-up. *Ann Rheum Dis* 2014;73:pp2178–2182. .
148. LoBuglio A, Wheeler R, Trang J, Haynes A, Rogers K, Harvey EB, et al.

- Mouse/human chimeric monoclonal antibody in man: kinetics and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:pp4220–4224.
149. Moss A. Optimizing the use of biological therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology Report*, 3(1), 2015, pp63–68 doi: 10.1093/gastro/gou087
150. Bendtzen K., Ainsworth M., Steenholdt C., thomsen O., Brynskov J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies. *Scand J Gastroenterol* 2009;44:pp774–81
151. Hwang I., Park S. Computational design of protein therapeutics, *Drug Discovery Today: Technologies*, vol. 5, no. 2- 3, 2009 pp. e43–e48,
152. Grubb R., Grubb A., Kjellen L., Lycke E., Åman P. Rheumatoid arthritis– a gene transfer disease. *Exp. Clin. Immunogenet.* 1999;16:pp1–7.
153. Ang, H., Helfgott S. (2003). Do the clinical responses and complications following etanercept or infliximab therapy predict similar outcomes with the other tumor necrosis factor-alpha antagonists in patients with rheumatoid arthritis? *J. Rheumatol.* 30:pp2315–2318.
154. Hansen K., Hildebrand, J., Genovese, M., Cush, J., Patel S., Cooley D. et al The efficacy of switching from etanercept to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 31:2004.pp1098–1102.
155. Haraoui B., Keystone E., Thorne J., Pope E., Chen I., Asare, C., et al Clinical outcomes of patients with rheumatoid arthritis after switching from infliximab to etanercept. *J. Rheumatol.* 2004.31:pp2356–2359.
156. Collin M. Blattner D., Soham P., Chaudhari D., Young M., Jenny E. et al. A dermatologist guide to immunogenicity. *International Journal of Women's Dermatology* 2.2016.pp77–84
157. EMA (2008) RCM Humira. [http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR - Product Information/human/000481/WC500050870.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf) consultado a 6/5/2017
158. Hayes J., Stein A., Sakuraba A. (2014) Comparison of efficacy, pharmacokinetics, and immunogenicity between infliximab mono- versus combination therapy in ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2014 Jun;29(6):pp-1177-85.
159. Hanauer S., Wagner C., Bala M, Mayer L., Travers S., Diamond R., et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2:pp542–553.
160. Colombel J., Sandborn W., Reinisch W, Mantzaris G., Kornbluth A., Rachmilewitz D. et al. Infliximab, Azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med.* 2010;362:pp1383–1395.
161. Ben-Horin S., Waterman M., Kopylov U., Yavzori M., Picard O., Fudim E., et al. Addition of an immunomodulator to infliximab therapy eliminates antidrug antibodies in serum and restores clinical response of patients with inflammatory bowel disease. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11:pp444–447.
162. Jefferis, R., Posttranslational modifications and the immunogenicity of biotherapeutics, *Journal of Immunology Research*, vol. 2016, Article ID

- 5358272, 2016 15 pages,
163. Esparteiro, J.. Medicamentos Biossimilares, Regulamentação Europeia e Nacional e Acesso ao Mercado. Ordem dos Farmaceuticos. 2016
 164. Ainsworth M., Bendtzen K., Brynskov J. Tumor necrosis factor-alpha binding capacity and anti-infliximab antibodies measured by fluid-phase radioimmunoassays as predictors of clinical efficacy of infliximab in Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2008;/103:/pp944 -948.
 165. Oldenburg B., Hommes D., Biological therapies in inflammatory bowel disease: top-down or bottom-up? *Current Opinion in Gastroenterology*: July 2007-volume 23-Issue4 pp395-399 doi: 10.1097/MOG.0b013e32815b601b
Inflammatory bowel disease
 166. Etchevers M., Aceituno M., Sans M., Are we giving azathioprine too late? The case for early immunomodulation in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008 September 28; 14(36): pp5512-5518

Anexos

Anticorpos

Os anticorpos são moléculas em forma de Y com dois braços flexíveis. Todos os anticorpos apresentam uma estrutura formada por cadeias pesadas e leves com dois locais de ligação ao antígeno. A forma detalhada das extremidades dos braços varia de uma molécula para outra, proporcionando assim uma vasta gama de locais de ligação ao antígeno. As imunoglobulinas (Ig)

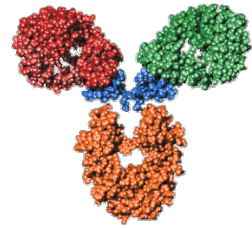


Ilustração 7 Anticorpo

são estruturalmente compostas por subunidades designadas por cadeias pesadas e cadeias leves. Cada Ig é constituída por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Existem dois tipos de cadeias leves, denominadas kappa (κ) e lambda (λ). De destacar cinco tipos de cadeias pesadas (α , δ , ϵ , γ e μ) que permitem dividir as Ig em cinco classes distintas, sendo atribuída a cada classe uma letra específica (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM respectivamente). Em suma, as Ig são constituídas por duas cadeias polipeptídicas pesadas da mesma classe (IgG, IgA, IgD, IgE ou IgM) e duas cadeias polipeptídicas leves do mesmo tipo (kappa ou lambda) (1)

As cadeias leves consistem em dois domínios de tamanho aproximadamente igual: o domínio constante que apresentam uma variação reduzida de uma Ig para outra, e o domínio variável que apresenta uma sequência de aminoácidos com um grande grau de variabilidade, (2).

As cadeias pesadas são constituídas por um domínio variável e três domínios constantes, com excepção das IgE e das IgM que apresentam quatro domínios constantes. Os diferentes domínios de uma dada molécula de Ig contêm uma estrutura globular similar ligadas entre si por pontes dissulfureto (2)

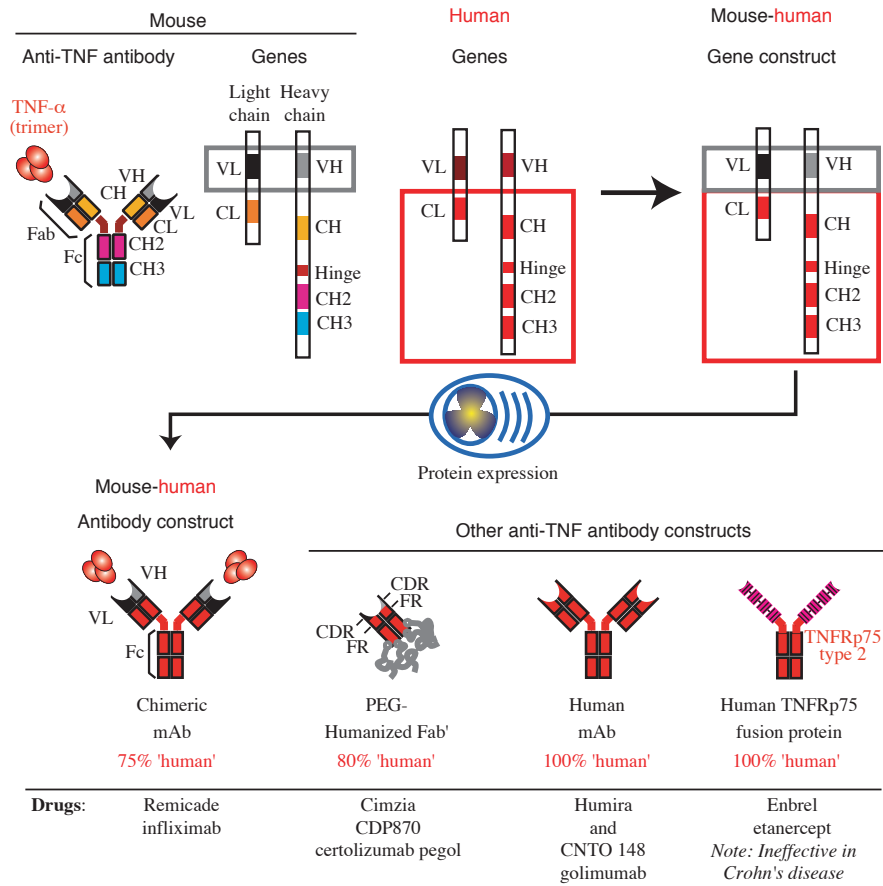
Os domínios variáveis das cadeias pesadas e leves contêm regiões com sequências de aminoácidos extremamente variáveis, denominadas regiões hipervariáveis, responsáveis pela especificidade da ligação ao antígeno. A substituição de um único aminoácido nas regiões hipervariáveis é crucial para a ligação de um antígeno particular (2). Os resíduos de cisteína formam pontes entre as cadeias individuais de uma molécula de Ig, a enzima, papeína, separa dois fragmentos idênticos, os que ligam os antígenos, fragmento Fab, e os fragmentos que não ligam aos antígenos, conhecidos como fragmento Fc. Os fragmentos Fc possuem locais de ligação para o factor C1q do complemento. A função efectora de uma determinada Ig é estabelecida pela região constante, que inclui a fixação ao complemento, a ligação aos vários tipos de células.

As Ig são proteínas e a sua sequência de aminoácidos pode ser imunogénica para diferentes indivíduos e para diferentes espécies, de modo que podem funcionar como antígenos. De facto, elas podem mesmo funcionar como antígenos do próprio indivíduo, auto-antígenos. (1)

As Ig possuem determinantes isotípos, alotípos e idiotípos. Os determinantes isotípicos são responsáveis pelas diferenças entre as diferentes classes e subclasses de Ig e entre cadeias leves e pesadas. Os determinantes alotípos

consistem em variações na região constante das Ig do mesmo isotipo, possuindo duas variações alélicas nos genes encontrados entre diferentes indivíduos. Os determinantes idiotípos são os determinantes individuais de cada molécula de Ig de acordo com a região hipervariável das Imunoglobulinas.

A capacidade dos anticorpos para se ligarem especificamente a substâncias é muito útil na investigação clínica, mas é difícil produzir grandes quantidades de anticorpos específicos em laboratório. O sistema imunitário humano pode produzir mais de dois milhões de anticorpos diferentes, cada um dos quais pode reconhecer, ligar e destruir apenas um antígeno específico. Um anticorpo monoclonal é aquele que se obtém a partir da multiplicação de uma única célula-tronco mediante técnicas que permitem isolar as moléculas de um linfócito diferenciado e que são produzidas contra um antígeno específico. Quimicamente o anticorpo são glicoproteínas sintetizadas pelos linfócitos B, que desencadeiam respostas imunológicas distintas a presença de antígeno, os anticorpos monoclonais cumprem a função de resposta imunitária, porém são obtidos em laboratório por técnicas clonais como a diluição limitante.



(3)

Anexo III

O Infliximab está indicado para:

1. Artrite reumatóide:

Remicade, em associação com o MTX, é indicado para a redução de sinais e sintomas, bem como melhoria da função física em:

- doentes adultos com doença ativa que apresentaram uma resposta inadequada a fármacos modificadores da evolução da doença reumatisal (DMARDs), incluindo o MTX
- doentes adultos com doença grave, ativa e progressiva, que não receberam previamente tratamento com MTX ou outros DMARDs. Nestas populações de doentes foi demonstrada uma redução da taxa de progressão das lesões articulares, avaliada através de raios-X.



2. Doença de Crohn em adultos Remicade está indicado para:

- tratamento da doença de Crohn ativa, moderada a grave, em doentes adultos que não apresentaram resposta mesmo após um ciclo completo e adequado de um tratamento com um corticosteroide e/ou um imunossupressor; ou que apresentam intolerância ou contraindicações a tais terapêuticas.
- tratamento da doença de Crohn ativa, com formação de fístulas, em doentes adultos que não apresentaram resposta mesmo após um ciclo completo e adequado de um tratamento convencional (incluindo antibióticos, drenagem e terapêutica imunossupressora).

Doença de Crohn pediátrica, Remicade está indicado para o tratamento da doença de Crohn ativa, grave, em crianças e adolescentes com idades compreendidas entre os 6 e os 17 anos, que não apresentaram resposta à terapêutica convencional, incluindo um corticosteróide, um imunomodulador e terapêutica de nutrição primária; ou que apresentam intolerância ou contraindicações a tais terapêuticas. Remicade foi apenas estudado em associação com terapêutica imunossupressora convencional.

3. Colite ulcerosa Remicade está indicado para o tratamento da colite ulcerosa ativa moderada a grave em doentes adultos que não responderam adequadamente à terapêutica convencional, incluindo corticosteroides e 6-mercaptopurina (6-MP) ou azatioprina (AZA), ou que apresentam intolerância ou contraindicações a estas terapêuticas.

Colite ulcerosa pediátrica Remicade está indicado para o tratamento da colite ulcerosa ativa grave, em crianças e adolescentes com idades compreendidas entre os 6 e os 17 anos, que apresentaram uma resposta inadequada à terapêutica convencional, incluindo corticosteroides e 6-MP ou AZA, ou que apresentam intolerância ou contraindicações a tais terapêuticas.

4. Espondilite anquilosante Remicade está indicado para o tratamento da espondilite anquilosante ativa grave, em doentes adultos que não responderam adequadamente a terapêuticas convencionais.
5. Artrite psoriática Remicade está indicado para o tratamento da artrite psoriática ativa e progressiva em doentes adultos quando apresentaram uma resposta inadequada a uma terapêutica prévia com DMARD. Remicade deve ser administrado em associação com o MTX ou em monoterapia, em doentes

que demonstraram intolerância ao MTX ou para os quais o MTX está contraindicado

Remicade tem demonstrado melhorar a função física em doentes com artrite psoriática e reduzir a taxa de progressão da lesão ao nível da articulação periférica de acordo com a avaliação por raio-X em doentes com subtipos simétricos poliarticulares da doença.

Psoríase Remicade é indicado para o tratamento da psoríase em placas, moderada a grave, em doentes adultos que não apresentaram resposta, ou que têm uma contraindicação, ou que são intolerantes a outras terapêuticas sistêmicas, incluindo ciclosporina, MTX ou PUVA (photochemotherapy).

(4)

Anexo IV

HUMIRA-Adalimumab

O Adalimumab está indicado para:

Artrite idiopática juvenil Artrite idiopática juvenil poliarticular

Humira em associação com MTX está indicado no tratamento da artrite idiopática juvenil poliarticular ativa, em doentes a partir dos 2 anos de idade, que tiveram uma resposta inadequada a um ou mais medicamentos antirreumáticos modificadores da doença (DMARDs). Humira pode ser administrado em monoterapia em caso de intolerância ao MTX ou quando o tratamento continuado com MTX não é apropriado. Humira não foi estudado em doentes com menos de 2 anos.

Humira está indicado no tratamento de:

- Artrite relacionada com entesite ativa em doentes com 6 anos de idade ou mais, que tiveram uma resposta inadequada ou intolerância à terapêutica convencional.
- Psoríase pediátrica em placas
- Humira está indicado no tratamento da psoríase crónica em placas, grave, em crianças e adolescentes a partir dos 4 anos de idade, que não tiveram uma resposta adequada ou quando não são candidatos a tratamento tópico e fototerapias.
- Doença de Crohn pediátrica
- Doença de Crohn ativa moderada a grave em doentes pediátricos (a partir dos 6 anos de idade), que tiveram uma resposta inadequada à terapêutica convencional, incluindo terapêutica de nutrição primária e um corticoesteróide e/ou um imunomodulador, ou que apresentam intolerância ou contraindicações a tais terapêuticas.
- Hidradenite supurativa activa, moderada a grave (hidrosadenite supurativa ou acne inversa) em adolescentes a partir dos 12 anos de idade com uma resposta inadequada à terapêutica sistémica convencional para a hidradenite supurativa.

(5)



Anexo V

Razões para perda de resposta clinica em doentes com IBD

Table 2. Reasons for loss of clinical response amongst patients receiving biologics for inflammatory bowel disease

Mechanism
Immunogenicity (anti-drug antibodies)
Enhanced drug clearance (non-immunogenic)
Alternate inflammatory pathways
Non-inflammatory complications (e.g. strictures)
Overlap functional symptoms
Concurrent infections (e.g. <i>C. difficile</i> or Cytomegalovirus)

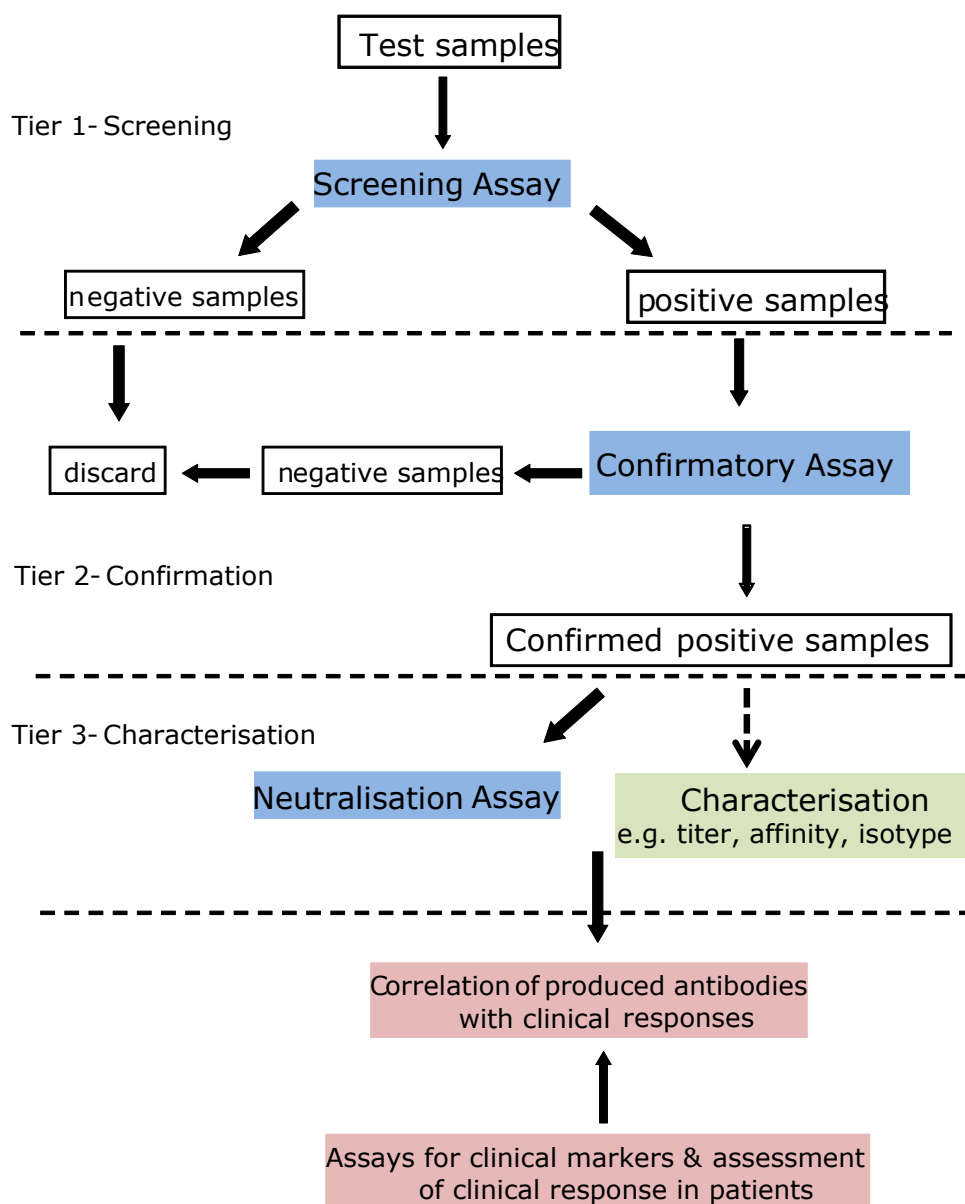
(6)

Anexo VII

Tolerância Central e Periférica

A tolerância central é induzida no timo, onde o desenvolvimento de timócitos que reconhecem complexos de péptidos *self*-MHC com alta afinidade são excluídos. Durante décadas, os imunologistas tentaram entender os papéis das células epiteliais tímicas e das células derivadas da medula óssea na seleção negativa. Estudos analisam quimeras da medula óssea ou timo de animais enxertados, à observação demonstram conclusivamente que as células derivadas da medula óssea são fortes indutoras de tolerância tímica. A maioria desses estudos analisou a tolerância central aos antígenos amplamente expressos em muitos ou em todos os tecidos (8) (9).

Annex 1: An example of a strategy for immunogenicity assessment



Anexo IX

RGA

Para medir a concentração de anticorpos neutralizantes contra o IFX, o soro é pré-incubado inicialmente com uma concentração conhecida de IFX. Se o soro não tiver anticorpos neutralizantes, o IFX adicionado ao ensaio bloqueará a atividade do TNF- α e não ativará a luminescência nas células. Se o soro contiver anticorpos neutralizantes, estes anticorpos bloquearão a atividade do IFX adicionado ao ensaio, e a luminescência induzida pelo TNF- α das células será ativada. Assim, o nível de anticorpo de neutralização do soro correlacionar-se-á com a quantidade de fluorescência produzida pela célula. O título dos anticorpos é então obtido identificando a menor diluição no soro onde o bloqueio da atividade IFX não se observa.

(11)

Anexo X

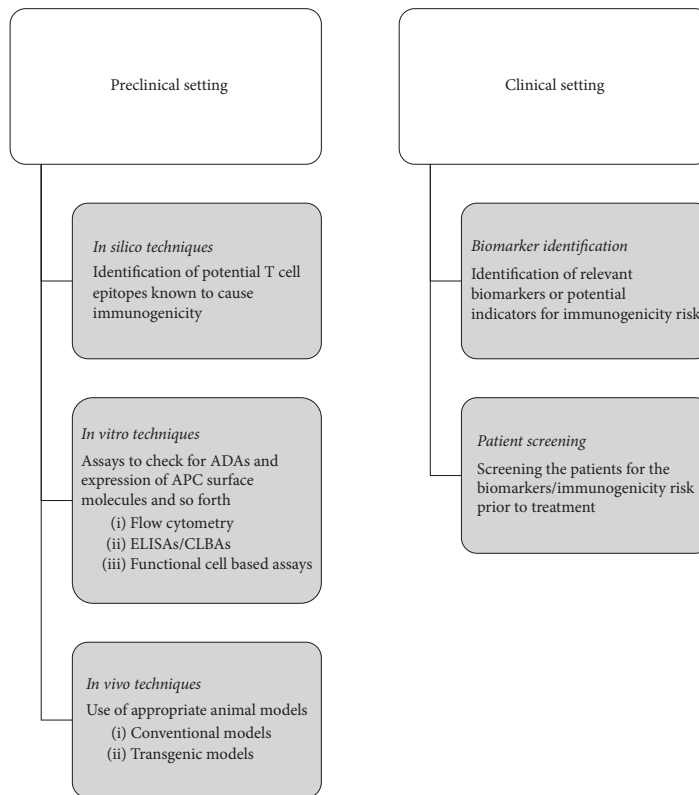
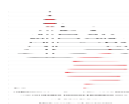


FIGURE 1: Management of immunogenicity in preclinical and clinical settings. ADAs: anti-drug antibodies; APC: antigen presenting cell; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; CLBA: competitive ligand binding assay.

(12)



**Partial Mayo Scoring Index
Assessment for Ulcerative Colitis
Activity**

Date: _____ Patient Name: _____ Date of Birth: _____ PHN/ULI: _____
--

Patient, please enter number of daily bowel motions you would have when in remission or before your diagnosis or symptoms of ulcerative colitis began. **This number will be Your Normal:**

Patients, please complete Questions number 1 and 2.

1. Stool Frequency (based on the past 3 days)

- Normal number of stools = 0
- 1-2 stools more than normal = 1
- 3-4 stools more than normal = 2
- 5 or more stools more than normal = 3

2. Rectal Bleeding (based on the past 3 days)

- No blood seen = 0
- Streaks of blood with stool less than half the time = 1
- Obvious blood with stool most of the time = 2
- Blood alone passed = 3

Physician, please complete Questions number 3.

3. Physician's Global Assessment (to be completed by Physician)

- Normal (sub scores are mostly 0) = 0
- Mild disease (sub scores are mostly 1) = 1
- Moderate disease (sub scores are mostly 1 to 2) = 2
- Severe disease (sub scores are mostly 2 to 3) = 3

The physician's Global Assessment acknowledges the Sub scores, the daily record of abdominal discomfort and functional assessment and other observations such as physical findings, and the patient's performance status

Total Partial Mayo Index Score [sum of all above items]

Remission = 0-1
 Mild Disease = 2-4
 Moderate Disease = 5-6
 Severe Disease = 7-9
 Version June 2009

Anexo XII

		ADA (trough level)	
		Low	High
Drug (trough level)	Low	1. Bioavailability and/or pharmacokinetic problem ↓ More intensive anti-TNF therapy	2. ADA resulting in bioavailability and/or pharmacokinetic problem ↓ Shift to other anti-TNF drug
	High	3. Pharmacodynamic problem (is TNF involved?) ↓ Shift to other treatment	4. Non-neutralizing ADA? Low-avidity ADA? ↓ Repeat test for neutralizing ADA

(3)

Referências Bibliográficas dos Anexos

1. Burmester G., Pezzutto A. Color Atlas of Immunology. Stuttgart New York: Thieme. 2003.58.
2. Paul W. Fundamental Immunology. 5th Edition, Lippincott Williams&Wilkins Publishers. 2003.
3. Bendtzen K., Ainsworth M., Steenholdt S. Thomsen O. Brynskov J. Individual medicine in inflammatory bowel disease: monitoring bioavailability, pharmacokinetics and immunogenicity of anti-tumour necrosis factor-alpha antibodies, Scand. J. Gastroenterol. 44 (2009)pp 774–781.
4. EMA (2013) RCM Remsima [http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR -
_Product_Information/human/002576/WC500150871.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/002576/WC500150871.pdf) consultado a 3/5/2017
5. EMA (2008) RCM Humira. [http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR -
_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000481/WC500050870.pdf) consultado a 6/5/2017
6. Moss A. Optimizing the use of biological therapy in patients with inflammatory bowel disease. Gastroenterology Report, 3(1), 2015, pp63–68 doi: 10.1093/gastro/gou087
7. McInnes, I., Schett, G. Pathogenetic insights from the treatment of rheumatoid arthritis www.thelancet.com 2017 Vol
8. Gao E., D L., Sprent J., Strong T cell tolerance in parent—F1 bone marrow chimeras prepared with supralethal irradiation. Evidence for clonal deletion and anergy. J. Exp. Med. 1990. 171:1101–1121.
9. Webb, S., Sprent J Tolerogenicity of thymic epithelium. Eur. J. Immunol. 1990;20:2525–2528.
10. EMA,. Guideline on Immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006 Rev. 1. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). 2015. pp 1-23
11. Pavlov I., Carper J., Lázár-Molnár E., Delgado J. Clinical laboratory application of a reporter-gene assay for measurement of functional activity and neutralizing antibody response to infliximab. Clinica Chimica Acta 453 (2016) pp147–153 . <http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2015.12.015> 0009-8981/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.
12. Kuriakose A., Chirmule N. , Nair P. Immunogenicity of Biotherapeutics: Causes and Association with Posttranslational Modifications. Volume 2016, Article ID 1298473, 18 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1298473>
13. <http://www.ibdclinic.ca/resources/partial-mayo-scoring-index/> acedido a 10 de Junho de 2017