

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



DAVID DROBNE

**VPLIV AZATIOPRINA IN METOTREKSATA NA FARMAKOKINETIKO IN
UČINKOVITOST INFLIKSIMABA PRI ZDRAVLJENJU CROHNOVE BOLEZNI**

Doktorsko delo

Ljubljana, Junij 2016

Univerza
v Ljubljani *Medicinska*
fakulteta



DAVID DROBNE

**VPLIV AZATIOPRINA IN METOTREKSATA NA FARMAKOKINETIKO IN
UČINKOVITOST INFLIKSIMABA PRI ZDRAVLJENJU CROHNOVE BOLEZNI**

Imenovanje mentorja na seji senata dne: 28. 10. 2014

Komisija za oceno in zagovor imenovana na seji senata dne: 25.1.2016

Datum zagovora: 23.6.2016

Mentor: Prof. dr. Ivan Ferkolj, dr.med.

Predsednik komisije: Prof. dr. Rok Orel, dr.med.

Član: Prof.dr. Alojz Ihan, dr.med.

Član: Prof. dr. Iztok Grabnar, mag.farm.

ZAHVALA

Najlepša hvala mentorju in prijatelju prof. Ivan Ferkolju za pomoč, spodbujanje in usmerjanje pri pripravi doktorske disertacije.

Lepo se zahvaljujem prof. Gert Van Assche, prof. Severine Vermeire, prof. Marc Ferrante in prof. Paul Rutgeertsu, da so me sprejeli v svojo raziskovalno skupino in vodili skozi projekt.

KAZALO

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV	3
SEZNAM TABEL.....	4
SEZNAM SLIK.....	5
IZVLEČEK.....	6
ABSTRACT.....	8
UVOD	10
Splošni uvod	10
Crohnova bolezen.....	10
Klinična slika:	10
Epidemiologija	12
Družbeno-ekonomski vidik bolezni	12
Etiologija in patogeneza bolezni.....	13
Zdravljenje Crohnove bolezni.....	15
Kortikosteroidi.....	16
Tiopurini (azatioprin, 6-merkaptopurin)	16
Metotreksat.....	17
Zaviralci TNF-alfa	17
Specialni uvod	20
Sekundarna odpoved zaviralcev TNF-alfa	20
Farmakokinetični mehanizmi zaviralcev TNF-alfa	20
Metabolizem in eliminacija zaviralcev TNF-alfa	21
Vpliv značilnosti bolnika in aktivnosti bolezni	24
Imunogenost zaviralcev TNF-alfa	25
Kombinirana terapija kot način zmanjševanja imunogenosti zaviralcev TNF-alfa in dileme v zvezi s tem	26
Neznano na področju in argumenti za našo raziskavo:.....	27
NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE.....	28
Namen dela	28
Hipoteze	28
METODE.....	29

Zasnova raziskave in preiskovanci.....	29
Preiskovanci:.....	29
Sočasno zdravljenje z imunomodulatorji:	29
Določanje serumskih koncentracij infliksimaba in protiteles proti infliksimabu	32
Definicije kliničnih izidov	33
Analiza rezultatov in statistične metode	34
Etični vidiki.....	35
REZULTATI	36
Bolniki	36
Hipoteza 1:	37
Hipoteza 2:	39
Hipoteza 3.....	40
RAZPRAVA	44
VIRI	50

SEZNAM UPORABLJENIH OKRAJŠAV

Seznam uporabljenih okrajšav (po abecednem vrstnem redu):

CRP: C-reaktivni protein

ELISA: Encimska imunoadsorpcijska preiskava, ang. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IFX: infliksimab

IMM: imunomodulator

Zaviralci TNF-alfa: zaviralci tumor nekrotizirajočega faktroja alfa

SEZNAM TABEL

Tabela 1: Demografski podatki bolnikov

Tabela 2. Serumske koncentracije infliksimaba ob in po ukinitvi imunomodulatorja

Tabela 3. Coxova regresija kliničnega izhoda bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja – model 1.

Tabela 4. Coxova regresija kliničnega izhoda bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja – model 2.

SEZNAM SLIK

Slika 1. Funkcijska zgradba zaviralcev TNF-alfa

Slika 2. Zgradba različnih zaviralcev TNF-alfa glede na stopnjo humanizacije

Slika 3. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek celic retikuloendotelijskega sistema

Slika 4. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek vezave na membransko vezane antigene

Slika 5. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek vezave na neonatalni Fc receptor

Slika 6. Potek sočasnega zdravljenja bolnikov z imunomodulatorjem

Slika 7. Vpliv imunomodulatorja na serumske koncentracije infliksimaba skozi čas

Slika 8. Vpliv serumskih koncentracij infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja na potrebo po dvigu odmerka infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja

Slika 9. Vpliv serumske koncentracije infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja na dokončno odpoved infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja

IZVLEČEK

UVOD:

Neodzivnost Crohnove bolezni na zdravljenje z imunomodulatorji (azatioprin, metotreksat) je indikacija za uvedbo zaviralca TNF-alfa, kot je tudi infliksimab. Ko bolniki dosežejo remisijo bolezni s kombiniranim zdravljenjem z infliksimabom in imunomodulatorjem, se imunomodulator ukine in nadaljuje z infliksimabom v monoterapiji, vendar pa ob tem pri nekaterih bolnikih pride do ponovnega zagona bolezni. To je verjetno posledica kompleksnih farmakokinetičnih interakcij med obema zdraviloma, ki pa doslej niso zadostno raziskane.

NAMEN:

Naš namen je bil ugotoviti, kakšen je vpliv sočasnega zdravljenja z imunomodulatorjem in ukinitve imunomodulatorja na farmakokinetiko in imunogenost infliksimaba, ter ugotoviti, ali je serumska koncentracija infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja napovedni dejavnik za sekundarno odpoved infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja pri bolnikih, ki so dosegli klinično remisijo s kombiniranim zdravljenjem.

METODE:

Vključili smo 223 prospektivno spremljanih bolnikov s Crohnovo boleznijo v univerzitetni bolnišnici v Leuvnu, v Belgiji. 158 bolnikov je prejelo kombinirano zdravljenje z infliksimabom in imunomodulatorjem, 65 pa zaradi neprenašanja imunomodulatorja monoterapijo z infliksimabom. Pri 117/158 bolnikov smo po vsaj 6-mesečnem kombiniranem zdravljenju ukinitvi imunomodulator in nadaljevali z infliksimabom v monoterapiji. Aktivnost bolezni smo ocenili pred vsako aplikacijo infliksimaba ves čas zdravljenja. Koncentracijo infliksimaba in protiteles proti infliksimabu smo izmerili ob več vnaprej določenih časih z metodo encimske imunoabsorpcije (ELISA); skupno smo izmerili 1053 vzorcev, povprečno 5 vzorcev za vsakega bolnika. Vpliv imunomodulatorja smo ugotavljali s primerjavo koncentracij infliksimaba in protiteles proti infliksimabu v

različnih meritvah med zdravljenjem. Spreminjanje koncentracij skozi čas smo analizirali z linearnimi mešanimi modeli, klinični izhod bolnikov pa z analizo preživetja po Coxu.

REZULTATI:

Bolniki, ki so sočasno poleg infliksimaba prejemali še imunomodulator, so imeli višje koncentracije infliksimaba (v povprečju 1,44-krat; 95% interval zaupanja: 1,07–1,92; $p=0,02$) in manj pogosto prisotna protitelesa proti infliksimabu (14/158, 9%) kot bolniki, ki so bili zdravljeni z infliksimabom v monoterapiji (15/65, 23%) ($p=0,01$). Ukinitvev imunomodulatorja pri podskupini bolnikov, ki so dosegli klinično remisijo, ni imela negativnega učinka na farmakokinetiko infliksimaba, saj se koncentracija infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja ni znižala (mediana pred ukinitvijo: 3,2 $\mu\text{g/ml}$; interkvartilni razpon: 1,6–5,8 $\mu\text{g/ml}$, mediana po ukinitvi 3,7 $\mu\text{g/ml}$; interkvartilni razpon: 1,3–6,3 $\mu\text{g/ml}$, $p=0,70$). Protitelesa proti infliksimabu so se po ukinitvi imunomodulatorja pojavila zelo redko (3/74, 4%). Koncentracija infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja je bila najmočnejši napovedni dejavnik za dolgoročni klinični izhod bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja, saj so imeli bolniki s koncentracijo infliksimaba $\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$ manjše tveganje za zagon bolezni (HR 0,36; 95% interval zaupanja: 0,14 do 0,91, $p = 0,03$), za kirurško zdravljenje (HR 0,10; 95% interval zaupanja: 0,01 do 0,76, $p = 0,03$) in popolno odpoved infliksimaba (HR 0,16; 95% interval zaupanja: 0,03 do 0,74, $p = 0,02$).

ZAKLJUČKI:

Kombinirano zdravljenje z imunomodulatorjem in infliksimabom ima pozitiven učinek na farmakokinetiko infliksimaba pri bolnikih s Crohnovo boleznijo med uvajanjem zdravljenja, vendar pa se ta učinek po dosegu remisije bolezni zmanjša. Podskupina bolnikov z visokimi koncentracijami infliksimaba ($\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$) lahko ukine imunomodulator in nadaljuje z infliksimabom v monoterapiji brez povečanega tveganja za odpoved zdravljenja.¹

ABSTRACT

INTRODUCTION:

Resistance to immunomodulators (azathioprine, methotrexate) in Crohn's disease is an indication for initiation of TNF-alpha inhibitors, such as infliximab. It is a common clinical practice to withdraw immunomodulator and continue infliximab as monotherapy once remission is achieved under combination therapy. However, some patients experience disease flare after withdrawal of immunomodulator. This can probably be explained with complex pharmacokinetic interactions between the two drugs that have not yet been sufficiently studied.

AIM:

Our aim was to explore the impact of immunomodulator co-treatment and withdrawal on pharmacokinetics and immunogenicity of infliximab and to study predictive value of infliximab trough levels at the time of immunomodulator withdrawal for secondary infliximab failure after immunomodulator withdrawal in patients who reached clinical remission under combination therapy.

METHODS:

We studied 223 prospectively followed Crohn's disease patients from University Hospital Leuven, Belgium. 158 patients received combination therapy of infliximab and immunomodulator, 65 patients received infliximab monotherapy due to resistance or side-effects of immunomodulator. 117/158 patients stopped immunomodulator after at least 6 months of combination therapy and continued infliximab as monotherapy. Disease activity was assessed before every infliximab infusion during follow-up. Infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies were measured at pre-specified time points with an ELISA assay (1053 samples, a median of 5 samples per patients). The impact of immunomodulator was studied by comparing infliximab trough levels and anti-infliximab

antibodies at different time points during treatment. Linear mixed models were used to analyse infliximab trough levels evolution over time while Cox regression and survival tools were used to study the outcome of patients after immunomodulator withdrawal.

RESULTS:

Immunomodulator co-treatment resulted in higher infliximab trough levels (adjusted mean increase, 1.44-fold; 95% confidence interval: 1,07–1,92; $p=0,02$) and less anti-infliximab antibody formation (14/158, 9%) compared to patients who received infliximab monotherapy (15/65, 23%) ($p=0,01$). Withdrawal of immunomodulator did not have a negative pharmacokinetic impact in a subgroup of patients who reached clinical remission under combination therapy as infliximab trough levels remained stable after withdrawal (before withdrawal: 3,2 $\mu\text{g/mL}$; 95% confidence interval: 1,6–5,8 $\mu\text{g/mL}$ and after withdrawal: 3,7 $\mu\text{g/mL}$; 95% confidence interval: 1,3–6,3 $\mu\text{g/mL}$; $p=0,70$). De novo formation of anti-infliximab antibodies was rare after immunomodulator withdrawal (3/74, 4%). The infliximab trough level was the strongest predictor for long-term clinical outcome after immunomodulator withdrawal as trough level $> 5,0 \mu\text{g/mL}$ resulted in decreased risk for disease flare (HR 0,36; 95% confidence interval: 0,14 to 0,91, $p = 0,03$), IBD surgery (HR 0,10; 95% confidence interval: 0,01 to 0,76, $p = 0,03$) and complete infliximab failure (HR 0,16; 95% confidence interval: 0,03 to 0,74, $p = 0,02$).

CONCLUSIONS:

Combining immunomodulator with infliximab in Crohn's disease has a positive pharmacokinetic impact during initiation of treatment, however once remission is reached this effect is diminished. A subgroup of patients with high infliximab trough levels ($\geq 5,0 \mu\text{g/mL}$) can stop immunomodulator and continue infliximab as monotherapy without increased risk for loss of response to infliximab.¹

UVOD

Splošni uvod

Crohnova bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen ima dva poglavitna fenotipa, Crohnovo bolezen in ulcerozni kolitis. Crohnova bolezen je kronična vnetna črevesna bolezen, ki lahko prizadene celotni prebavni trakt od ust do anusa, kaže pa se tudi s številnimi zunajčrevesnimi znaki, saj lahko prizadene še številne druge organe, kot so koža, jetra, sklepi, oči, redko pa tudi pljuča in srce^{2,3}.

Klinična slika:

Klinični znaki Crohnove bolezni so bolečine v trebuhu, driske, krvave driske, hujšanje, povišana telesna temperatura, utrujenost.

Simptomi Crohnove bolezni se pogosto pojavljajo postopoma, skozi nekaj let, klinična slika pa je močno odvisna od lokacije bolezni in intenzivnosti vnetja.⁴ Bolečina v trebuhu je posledica vnetja, abscesa ali zožitev prebavne cevi. Pri nekaterih bolnikih se bolezen lahko začne zelo burno, vendar pa je bolj pogosto, da se simptomi bolezni pojavljajo postopoma, skozi nekaj let; posledično je v preteklosti lahko poteklo tudi več let do postavitve diagnoze.⁵ Bolezen prizadene v približno eni tretjini tanko črevo, v eni tretjini debelo črevo, v eni tretjini pa tanko in debelo črevo.⁶ V nedavni genetski študiji na izjemno velikem številu bolnikov s kronično vnetno črevesno so ugotovili, da je lokacija bolezni glavni napovednik kliničnega poteka in zapletov skozi čas. Z analizo genetskih polimorfizmov so ugotovili, da sta Crohnova bolezen tankega in debelega črevesa v genetskem smislu vsaj tako različni med seboj kot Crohnova bolezen debelega črevesa in ulcerozni kolitis.⁷

Kadar se bolezen začne kot terminalni ileitis, večinoma traja nekaj let, preden se bolezen pokaže z očitnimi klinični znaki zapore črevesa, kot so količne bolečine, bruhanje in tipna rezistenca v ileocekalnem področju. Pred pojavom teh znakov imajo bolniki več let znake sistemskega vnetja, kot so hujšanje, nekoliko povišani vnetni parametri in slabokrvnost, ter znake lokalnega vnetja, ki se kaže z občutljivostjo ali zmerno bolečino v ileocekalnem področju ter drisko, lahko s krvjo na blatu.

Kadar se bolezen začne kot vnetje debelega črevesa, je največkrat prizadet desni kolon, lahko pa bolezen zajame celotni kolon, tudi danko. Glavni simptom bolezni debelega črevesa je driska, ki je včasih lahko tudi krvava. Nekateri bolniki navajajo le bolj pogosto odvajanje bolj tekočega blata, pri nekaterih pa se bolezen lahko pojavi s fulminantnim kolitisom. Intenzivnost driske je odvisna od obsega bolezni na debelem črevesu in od intenzivnosti vnetja črevesne stene. Urgentni pozivi na blato so pri Crohnovi bolezni manj pogosti kot pri ulceroznem kolitisu, saj je danka redkeje prizadeta.

Ločimo tri osnovne fenotipe bolezni: vnetni, stenozični in penetrantni fenotip. Najbolj agresiven potek bolezni kaže penetrantni fenotip, kjer se vnetje širi čez črevesno steno v okolico v obliki fistul in abscesov. Perianalna Crohnova bolezen je podtip penetrantnega fenotipa, ki spada med najhujše fenotipe bolezni. Prizadene od 25 % do 80 % bolnikov^{8,9}.

Perianalna Crohnova bolezen se kaže s poudarjenimi kožnimi gubami, ki so lahko macerirane in močno boleče. V analnem kanalu se lahko pojavijo fisure, ulkusi in zožitve. V perianalnem področju se lahko pojavijo fistule in abscesi. Perianalna bolezen se torej kaže z bolečinami v perianalnem področju, z bolečim odvajanjem blata, z lažnimi pozivi na blato, s fistulami, skozi katere se izloča gnoj ali blato, ter z ognojki, ki lahko nezdravljeni povzročijo destrukcijo tkiv v mali medenici, inkontinenco ali sistemske septične zaplete.

^{8,10}

O Crohnovi bolezni zgornjih prebavil govorimo kadar je prizadeto črevo proksimalno od terminalnega ileuma¹¹; pojavi se pri od 5 % do 25 % bolnikov.^{12,13} Prizadetost želodca in dvanajstnika se kaže z ulkusi, v ustih pa najdemo afte. Požiralnik je redko prizadet. Simptomi Crohnove bolezni zgornjih prebavil so bolečina z zgornjem delu trebuha, slabost, zgodnja sitost, bruhanje, boleče afte v ustih, težko in boleče požiranje.

Epidemiologija

Ocenjuje se, da je v ZDA nekje med 1 do 1,3 milijona bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo, v Evropi okoli 2,2 milijona bolnikov, po vsem svetu pa okoli 5 milijonov¹⁴. Bolezen je pogostejša v razvitih državah kot v državah v razvoju, pogostejša na severu in zahodu kot na jugu in vzhodu Evrope, ter pogostejša v mestih kot na podeželju. Incidenca Crohnove bolezni v svetu je med 3,1 to 14,6 na 100 000 ljudi letno, prevalenca med 26 in 201 na 100 000.^{15–17}

V slovenski epidemiološki raziskavi je bilo ugotovljeno, da beležimo velik porast v incidenci kronične vnetne črevesne bolezni, in sicer je incidenca kronične vnetne črevesne bolezni med otroci v Sloveniji narastla s 3,04 med letoma 1994 in 1999 na 5,14 med letoma 2000 in 2005.¹⁸ Vzporedno se je v Sloveniji spremenil tudi fenotip Crohnove bolezni, in sicer v bolj agresivne oblike, to je več penetrantne in stenožantne bolezni.¹⁹ V nedavni epidemiološki študiji v Sloveniji, v kateri so bili v anketo zajeti zdravniki družinske medicine, je bil ugotovljen dodaten velik porast v incidenci kronične vnetne črevesne bolezni v zadnjem desetletju med odraslo populacijo, saj je bilo ugotovljeno, da je incidenca Crohnove bolezni 7,4 na 100 000, ulceroznega kolitisa pa 8,9 na 100 000.²⁰ Do drastičnega porasta incidence bolezni je prišlo tudi v pediatrični populaciji, saj je incidenca bolezni med otroci v nekaj letih narasla iz 5,7 na 8,9. V tem času se je tudi spremenil fenotip bolezni, saj se je podvojil delež otrok s stenožantno/penetrantnim fenotipom.¹⁹

Družbeno-ekonomski vidik bolezni

Kronična vnetna črevesna bolezen ima izjemen družbeno-ekonomski učinek za celotno družbo, saj bolniki večinoma zbolijo mladi, velikokrat še v času šolanja, še pred nastopom prve službe. Mnogi se tako srečujejo z velikimi problemi pri iskanju prve zaposlitve zaradi strahu delodajalcev, da taka oseba ne mogla dobro opravljati predvidenega dela. Bolezen poteka z zagoni in remisijami, zato so bolniki, še zlasti tisti, ki so neustrezno zdravljeni, pogosto odsotni z delovnega mesta. 10 % bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo je nezaposlenih dlje časa, bolniški stalež koristijo v povprečju 3–6 tednov letno, tveganje za trajno delovno nesposobnost je dvakrat večje kot pri zdravih. V poročilu Evropskega

združenja za kronično vnetno črevesno bolezen (ECCO-EpiCon) je bilo ocenjeno, da so neposredni stroški bolezni v Evropi nekje med 4,6 in 5,6 milijard evrov letno.²¹ V Nemčiji je večji del stroškov Crohnove bolezni posledica invalidske upokojitve ali odsotnosti z dela zaradi aktivne bolezni (64% stroškov), manjši del pa so neposredni zdravstveni stroški (34% stroškov); povprečni mesečni strošek za bolnika s Crohnovo boleznijo je bil tako 1425 evrov.²² Začasna in trajna delovna nezmožnost je posledica zapletov Crohnove bolezni (simptomatske strikture, fistule, inkontinenca, sindrom kratkega črevesa, trombembolični dogodki, kaheksija, depresija). Zelo draga zdravila, kot so na primer biološka zdravila iz skupine zaviralcev TNF-alfa, lahko zmanjšajo te stroške, če so ta zdravila uvedena pravočasno, tj. zgodaj v poteku bolezni, ko še ni ireverzibilnih posledic bolezni. Brezposelni bolniki, ki so po uvedbi infliksimaba dosegli klinično remisijo, so imeli dvakrat večjo možnost (36% bolnikov), da so našli zaposlitev v enem letu po uvedbi zdravljenja, kot tisti, ki niso dosegli klinične remisije (16% bolnikov).²³ Podoben je bil učinek adalimumaba; tako je bilo ocenjeno, da je zaradi izboljšane produktivnosti bolnikov petmesečni prihranek nekje med 2000 in 3000 evrov.²⁴

Etiologija in patogeneza bolezni

Etiopatogeneza kronične vnetne črevesne bolezni ni popolnoma jasna kljub številnim prizadevanjem raziskovalnih skupin v zadnjih desetletjih, da bi to ugotovile. Najbolj sprejeta je hipoteza, da se bolezen razvije pri genetsko občutljivih osebah, kjer dejavniki iz okolja sprožijo prekomeren imunski odziv na antigene iz lumna črevesa.

Genetika ima pomembno vlogo pri patogenezi bolezni, saj je tveganje za razvoj bolezni pri sorodnikih bolnika povečano. Tveganje za razvoj bolezni je 15-krat višje pri potomcih v prvem kolenu kot pri splošni populaciji in vsak peti bolnik s Crohnovo boleznijo ima vsaj enega obolelega sorodnika. Obstaja tendenca, da so posamezne družine nagnjene h Crohnovi bolezni, druge pa k ulceroznemu kolitisu, vendar pa se pojavljajo tudi družine, kjer se obe bolezni prepletata. Slednje razlagajo z številnimi genetskimi podobnostmi med obema boleznima.^{25,26} Genetski dejavniki so bolj pomembni za Crohnovo bolezen kot za ulcerozni kolitis; genetska konkordanca za Crohnovo bolezen je do 67%, za ulcerozni

kolitis pa med 13% in 20%.²⁷ Danes je znanih 163 genskih lokusov za kronično vnetno črevesno bolezen, od tega je 110 skupnih obema fenotipoma bolezni, 30 je specifičnih za Crohnovo bolezen, 23 pa je specifičnih za ulcerozni kolitis.²⁸ Najbolj znan genski lokus za Crohnovo bolezen je NOD2/CARD15, homozigotni nosilci alelov tveganja pa imajo 17-krat večjo možnost, da razvijejo bolezen.²⁹

Kljub številnim genetskim dejavnikom tveganja pa se samo z genetiko ne da razložiti drastičnega porasta v incidenci bolezni v zadnjih desetletjih in dejstva, da se možnost za pojav bolezni izrazito poveča pri bolnikih, ki se preselijo z območij z nizko incidenco bolezni na območja z visoko incidenco bolezni. Skladna s tem je higienska hipoteza, ki pravi, da naj bi premajhna izpostavljenost raznolikim antigenom iz okolja v otroštvu v bolj industrializiranih družbah negativno vplivala na razvoj sluzničnega imunskega sistema, s tem pa se poveča možnost razvoja avtoimunskih bolezni, tudi kronične vnetne črevesne bolezni.³⁰

Vse več je dokazov, da ima osrednjo vlogo pri razvoju kronične vnetne črevesne bolezni interakcija med črevesno mikrobioto in imunskimi celicami v črevesni steni. Pri kronični vnetni črevesni bolezni pride do porušenia uravnoteženih imunskih dogajanj, ki so značilna za zdravo črevo, kjer gre za imunsko toleranco na številne luminalne antigene več kot 500 različnih bakterijskih vrst, ki jih najdemo pri človeku.³¹ Pri kronični vnetni črevesni bolezni pride do motenj v barierni funkciji črevesne sluznice, defekti v barieri omogočijo tesnejši stik luminalnih bakterij z imunskimi celicami v sluznici in njihovo aktivacijo. Antigeni normalno prisotnih bakterij tako pri genetsko občutljivih osebah sprožijo pretiran imunski odgovor, saj mieloidne dendritične celice dozoriijo in prenehajo migrirati, spremenijo se iz imunske tolerančnih v aktivirane in stimulirajo diferenciacijo naivnih T celic v efektorske T celice (Th1, Th2, Th17) in NK T limfocite. Citokini, ki jih izločajo aktivirane T celice spodbujajo makrofage, da izločajo velike količine TNF-alfa, IL-1 in IL-6. Poleg aktivacije specifičnega imunskega sistema pa pride pri kronični vnetni črevesni bolezni tudi do disregulacije naravne imunosti, tako NK limfociti z direktnim citotoksičnim učinkom prispevajo k destruktiji tkiv in izločajo provnetne citokine. Zaradi provnetnih citokinov iz sluzničnih žil v sluznico migrirajo številni levkociti, ki izločajo še več provnetnih citokinov, s tem je sklenjen začarani krog. Destrukcijo tkiv povzročijo snovi, ki

jih izločajo imunske celice: NO, kisikovi radikali, proteaze, prostaglandini, endopeptidaze.

32,33

Zdravljenje Crohnove bolezni

Cilj zdravljenja Crohnove bolezni je klinična, biokemična in endoskopska remisija, kar s skupno besedo imenujemo globoka remisija.^{34,35} Izkazalo se je, da zdravljenje, ki je usmerjeno le na klinično remisijo, tj. zdravljenje zgolj simptomov bolezni, ne spremeni dolgoročne prognoze bolnikov, saj se destrukcija tkiv nadaljuje, to pa privede do zapletov: striktur, abscesov, izgube funkcije črevesa.^{4,36,37} Sledijo kirurški posegi, ki pa rešijo le zaplete; bolezen pa se po operaciji nadaljuje in ponovno vodi v destrukcijo tkiv. Tako si pri nezdravljenem ali neoptimalno zdravljenem bolniku kirurški zapleti sledijo vsakih nekaj let.³⁸ Operacije so povezane s perioperativno morbiditeto in mortaliteto, pogosti kirurški zapleti in zapleti ob operacijah lahko vodijo v popolno odpoved prebavil zaradi sindroma kratkega črevesa ali spremenjene anatomije ob notranjih in zunanjih fistulah. Zdravljenje Crohnove bolezni je v prvi vrsti medikamentozno z imunosupresivi, kirurško zdravljenje pa je na mestu ob zapletih bolezni in kadar z imunosupresivno terapijo ne moremo obvladati aktivnega vnetja.⁵

Zdravljenje Crohnove bolezni je sestavljeno iz dveh faz: indukcija remisije in vzdrževanje remisije.

Glavna zdravila, ki jih uporabljamo za indukcijo remisije in vzdrževanje remisije pri Crohnovi bolezni so lokalni in sistemski kortikosteroidi, tiopurini (azatioprin, 6-merkaptopurin), metotreksat, zaviralci tumor nekrotizirajočega faktroja alfa (zaviralci TNF-alfa) (infliksimab, adalimumab), pri otrocih pa za indukcijo remisije uporabljamo še popolno enteralno prehrano.⁵ V letu 2015 je bilo v Evropi registrirano novo zdravilo (vedolizumab, monoklonsko protitelo proti $\alpha 4\beta 7$ integrinu) za indukcijo in vzdrževanje remisije, vendar v Sloveniji še ni na voljo.^{39–41}

Kortikosteroidi

Sistemski kortikosteroidi v odmerku 0,5 do 1 mg/kg telesne teže so izjemno učinkoviti za indukcijo klinične remisije, saj po 3 tednih več kot 90 % bolnikov doseže klinično remisijo.⁴² Nadaljevanje terapije dlje kot 4 tedne ne poviša deleža bolnikov v klinični remisiji, zato tudi evropske smernice priporočajo, da se v primeru neuspeha sistemskih kortikosteroidov v 2 tednih namesto sistemskih steroidov uporabi zaviralce TNF-alfa.⁵ Nadaljevanje sistemskih steroidov na dolgi rok je kontraindicirano, saj se pojavijo hudi stranski učinki, kot so katarakta, osteopenija, hipertenzija, strije, glukozna intoleranca, edemi, lunasti obraz (50% po štirih mesecih), akne (pri 30% bolnikov po treh mesecih zdravljenja) in številni drugi.⁴³ Dodatna težava sistemskih steroidov je, da po ukinitvi pride pri več kot 70 % bolnikov do ponovnega kliničnega zagona bolezni⁴², zato je po indukciji remisije treba pri veliki večini bolnikov uvesti vzdrževalno zdravljenje s tiopurini, metotreksatom in/ali zaviralci TNF-alfa. Poleg tega se je izkazalo, da kljub uspešni indukciji klinične remisije pride do zaceljene sluznice črevesa (in s tem sodobnega cilja zdravljenja, tj. globoke remisije) le pri majhnem deležu bolnikov (največ 30 %)^{44,45}, zato dolgoročno zdravljenje s sistemskimi kortikosteroidi ne spremeni dolgoročnega izhoda bolnikov (ne zmanjša deleža zapletov bolezni, hospitalizacij, operacij). Topikalni kortikosteroidi (budesonid) se lahko uporabljajo pri Crohnovi bolezni, omejeni na ileocekalno področje. Imajo manj stranskih učinkov, uporaba na dolgi rok pa ni smiselna, saj ne zmanjša deleža bolnikov s ponovnim kliničnim zagonom bolezni in ne spremeni dolgoročnega izhoda bolnikov.⁵

Tiopurini (azatioprin, 6-merkaptopurin)

Tiopurini se v organizmu po kompleksni poti presnovijo v aktivne metabolite 6-tiogvaninske nukleotide, ki delujejo imunosupresivno in se zato uporabljajo za številne avtoimunske, mieloproliferativne bolezni in kot imunosupresivno zdravljenje po presaditvi organov za preprečevanje zavrnitve organa. 6-tiogvaninski metaboliti se vgradijo v DNA in s tem motijo replikacijo predvsem hitro delečih celic⁴⁶, kot so tudi imunske celice, vpletene v patogenezo Crohnove bolezni. Drugi mehanizem delovanja je zaviranje Rac1, ki vodi v apoptozo T limfocitov.⁴⁷

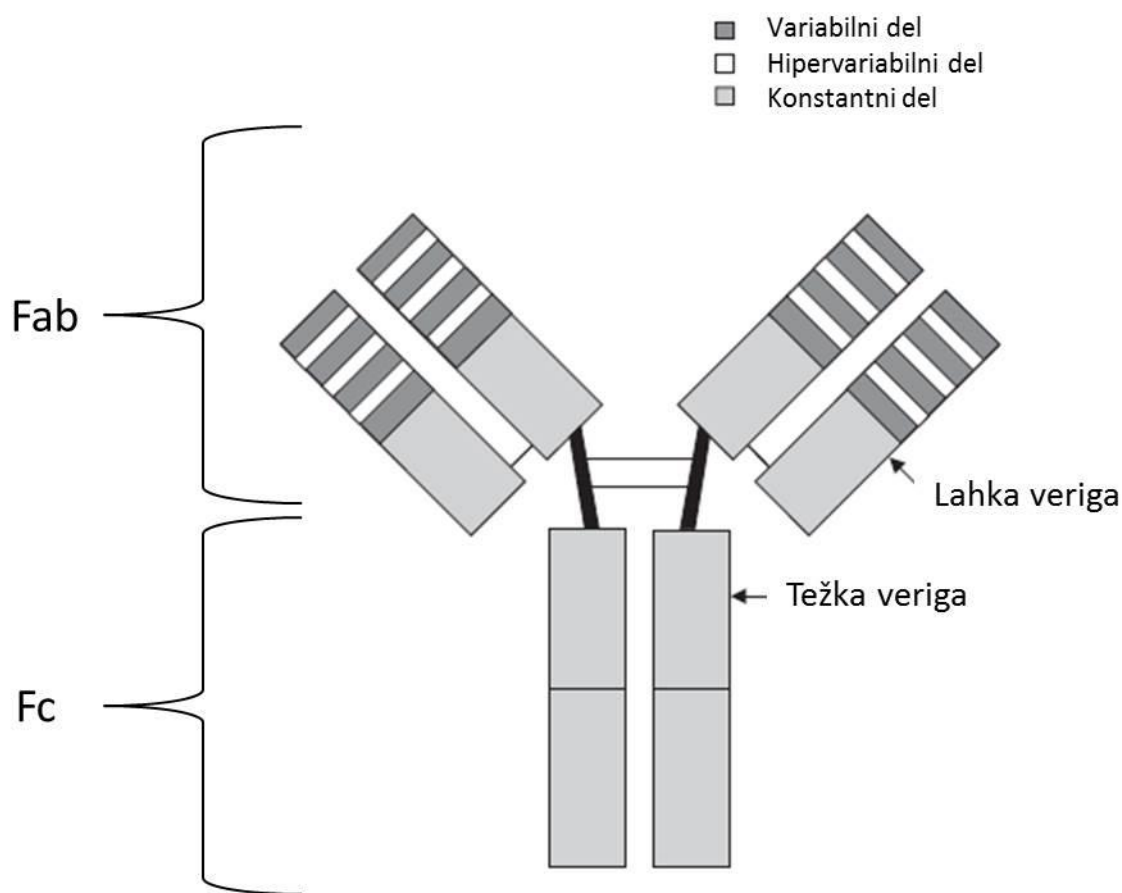
Tiopurini so učinkovita zdravila za zdravljenje Crohnove bolezni. Polni terapevtski učinek se pojavi 3–4 mesece po uvedbi zdravila, zato tiopurini niso primerni za indukcijo remisije, so pa dokazano učinkoviti za vzdrževanje remisije. Zdravljenje s tiopurini poveča možnost dolgotrajne klinične remisije za okoli 2–3-krat glede na placebo, število bolnikov, ki jih je treba zdraviti, da ima korist en bolnik, pa je 5.⁴⁸ Sodobni terapevtski cilj, tj. zaceljena sluznica črevesa, se doseže v monoterapiji z aztioprinom le pri majhnem deležu bolnikov; v študiji SONIC je bilo to 16,5 %.⁴⁹

Metotreksat

Metotreksat zavira dihidrofolatno reduktazo in se s tem vpleta v sintezo purinskih in pirimidinskih prekurzorjev za DNA in RNA. S tem zavira aktivacijo in proliferacijo T limfocitov, protivnetni učinek pa gre tudi na račun zaviranja ekspresije nekaterih adhezijskim molekul in moduliranja sekrecije citokinov monocitov in makrofagov.^{50,51} Zdravilo je uspešno za indukcijo in vzdrževanje remisije Crohnove bolezni. Po indukciji z metotreksatom 25 mg intramuskularno je po treh mesecih lahko sistemske kortikosteroide ukinilo 39 % bolnikov v aktivni roki študije, v placebo skupini pa 19 %.⁵² Podobni so rezultati vzdrževalnega zdravljenja s 15 mg metotreksata intramuskularno, kjer je bilo po enem letu opazovanja brez zagona 65 %, v placebo skupini pa 39 % bolnikov.⁵³ Kljub kliničnemu odgovoru na metotreksat se sluznica črevesa zaceli, in s tem doseže globoka remisija bolezni, le pri manjšem deležu bolnikov (v francoski raziskavi 11 % bolnikov).⁵⁴

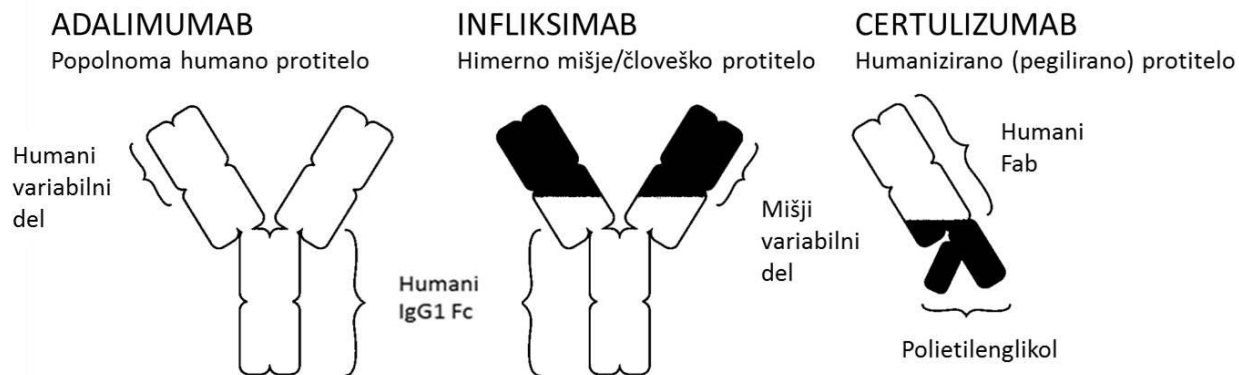
Zaviralci TNF-alfa

Zaviralci TNF-alfa so trenutno najbolj učinkovita zdravila za zdravljenje Crohnove bolezni. Zaviralci TNF-alfa se vežejo s fragmentom Fab na topni TNF-alfa in membransko vezani TNF-alfa, ki je izražen na številnih imunskih celicah. Sestavljeni so iz dveh identičnih lahkih in težkih verig. Vsaka veriga ima konstantni in variabilni del. Ciljni antigen se veže na variabilni del lahkih in težkih verig v področju Fab. Konstantni del Fc je vpleten v številne imunske funkcije, kot je na primer aktivacija komplementa prek vezave na receptor Fc na efektorskih celicah, kot so NK celice ali makrofagi (Slika 1).



Slika 1. Funkcijska zgradba zaviralcev TNF-alfa (povzeto po⁵⁵)

Z vezavo topnega TNF-alfa direktno zavirajo provnetno delovanje TNF-alfa na številne imunske celice, z vezavo na membransko vezani TNF-alfa pa povzročajo apoptozo imunskih celic, spodbujajo s komplementom in protitelesi posredovano citotoksičnost ter zavirajo izločanje citokinov po mehanizmu reverzne signalizacije.⁵⁶ Za zdravljenje Crohnove bolezni sta v Evropi registrirana dva zaviralca TNF-alfa, infliksimab in adalimumab, v ZDA in Švici pa še certolizumab. Infliksimab je himerno monoklonsko protitelo, $\frac{3}{4}$ je humano, $\frac{1}{4}$ je mišji del. Adalimumab je popolnoma humano protitelo. Certolizumab je humanizirno monoklonsko protitelo, saj je nehumani del protitelesa pegiliran in tako skrit (Slika 2).⁵⁷



Slika 2. Zgradba različnih zaviralcev TNF-alfa glede na stopnjo humanizacije (povzeto po⁵⁷⁾)

Zaradi visoke cene teh zdravil in stranskih učinkov (10.000–15.000 EUR letno) se zaviralec TNF-alfa v Sloveniji in večini držav po svetu lahko uvede v zdravljenje samo po dokazani neučinkovitosti/neprenašanju tiopurinov ali metotreksata ali kadar bolnik klinično ne odgovori na ustrezne odmerke sistemskih kortikosteroidov.⁵ Na zaviralec TNF-alfa odgovori od 50% do 90% bolnikov (odvisno od definicije odgovora v registracijskih študijah), rezultati so primerljivi za infliksimab^{58–62} in adalimumab^{63–67}. Bolniki, ki ne odgovorijo na indukcijsko zdravljenje s TNF-alfa (govorimo o t.i. primarni rezistenci), imajo slabo prognozo, saj je večinoma potreben bolj ali manj obsežen kirurški poseg. Še večji problem kot primarna rezistenca je sekundarna odpoved zaviralcev TNF-alfa. Gre za izgubo učinka zdravila po tem, ko so bolniki sprva odgovorili na indukcijsko zdravljenje. To v končni fazi privede do potrebe po dvigu odmerka pri vsakem drugem bolniku, vsak četrty bolnik pa dokončno izgubi odgovor na zdravljenje in je potrebno zdravilo ukiniti, saj ni več učinkovito.^{61,68}

Specialni uvod

Sekundarna odpoved zaviralcev TNF-alfa

O sekundarni odpovedi zaviralcev TNF-alfa govorimo takrat, ko pride do popuščanja učinka zdravila po tem, ko je bolnik odgovoril na indukcijsko zdravljenje. Večina avtorjev loči med delno in popolno odpovedjo. *Delna odpoved* je opredeljena kot ponovni objektivno dokazani zagon bolezni (npr. s povišanimi vnetnimi označevalci, kot so C-reaktivni protein (CRP), kalprotektin ali pa endoskopsko potrjene ulceracije na sluznici črevesa), ki odreagira na dvig odmerka zaviralca TNF-alfa. *Popolna odpoved* je opredeljena kot popolna izguba učinka kljub dvigu odmerka zaviralca TNF-alfa, zato se pri popolni odpovedi zdravilo ukine in preide na drug način zdravljenja (prehod na drug zaviralec TNF-alfa, operacije, študijska zdravila). Sekundarna odpoved se pojavi pri približno 10 % bolnikov letno, po podatkih iz raziskav tretje faze pa tudi do 50 %⁶⁹. V nasprotju s primarno rezistenco, za katero menijo, da je posledica farmakodinamskih razlik med bolniki (teorija o tem, da je pri nekaterih bolnikih mehanizem TNF-alfa manj pomemben v patogenezi bolezni in so zato zaviralci TNF-alfa neučinkoviti), je sekundarna odpoved posledica spremenjene farmakokinetike zaviralcev TNF-alfa. Koncentracije zaviralcev TNF-alfa sistemsko in v tarčnih tkivih so posledično prenizke, zato pride do reaktivacije bolezni.

Farmakokinetiski mehanizmi zaviralcev TNF-alfa

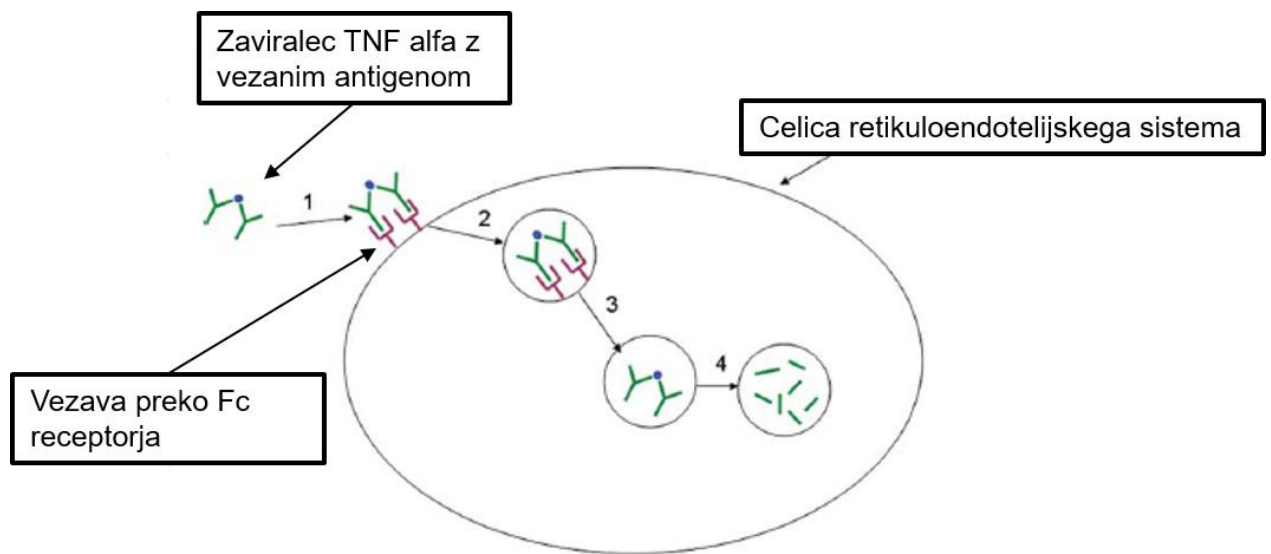
Monoklonska protitelesa so velike molekule, ki se aplicirajo parenteralno, peroralna aplikacija ni mogoča zaradi velikosti, hidrofilnosti in razgradnje v želodcu.⁵⁵ Farmakokinetika monoklonskih protiteles je izrazito drugačna od ostalih molekul, saj obstajajo velike individualne razlike med bolniki. Čeprav obstaja dobra korelacija med odmerkom zdravila in najvišjo serumsko koncentracijo po aplikaciji, je najnižja koncentracija zdravila med vzdrževanim zdravljenjem (ang. trough concentration) med bolniki zelo različna⁷⁰, značilno pa je tudi, da je očistek zaviralcev TNF-alfa različen pri

različnih avtoimunskih bolezni za isti zaviralec TNF-alfa. Primer je infliksimab, kjer je očistek zdravila skoraj za 50 % višji pri odraslih bolnikih z ulceroznim kolitisom (0,38 L/dan) in Crohnovo boleznijo (0,38 L/dan) kot pri bolnikih z ankizilirajočim spondilitisom (0,27 L/dan) ali revmatoidnim artritisom (0,26 L/dan).⁷¹⁻⁷⁴

Metabolizem in eliminacija zaviralcev TNF-alfa

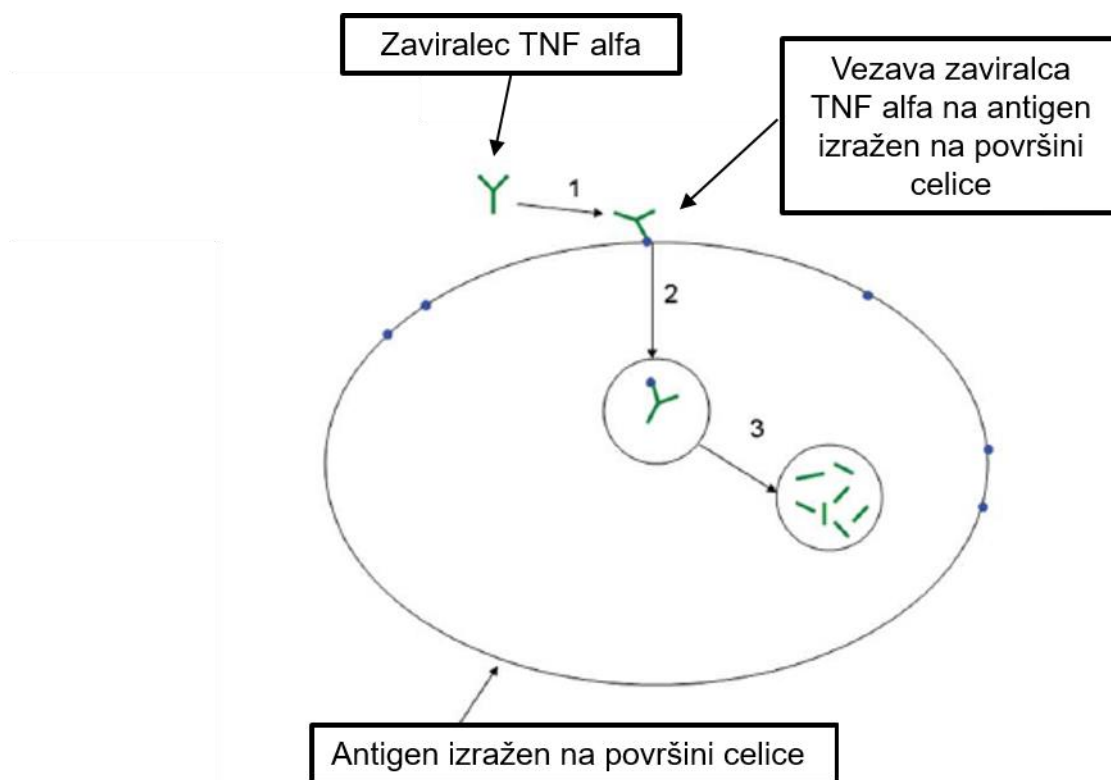
Trije poglavitni mehanizmi, ki vplivajo na očistek zaviralcev TNF-alfa so razgradnja v celicah retikuloendotelijskega sistema (a), razgradnja v tarčnih celicah po vezavi na tarčni antigen (b) in privzem v celico preko neonatalnega Fc receptorja (c).^{55,70}

- a. Celice retikuloendotelijskega sistema (makrofagi in monociti) vežejo del Fc z antigenom povezanih IgG (kamor spada tudi infliksimab in adalimumab) in nato te komplekse razgradijo v lizosomih. Genetski polimorfizmi v Fc gama receptorju lahko vplivajo na učinkovitost te poti in s tem na očistek⁷⁵
(Slika 3)



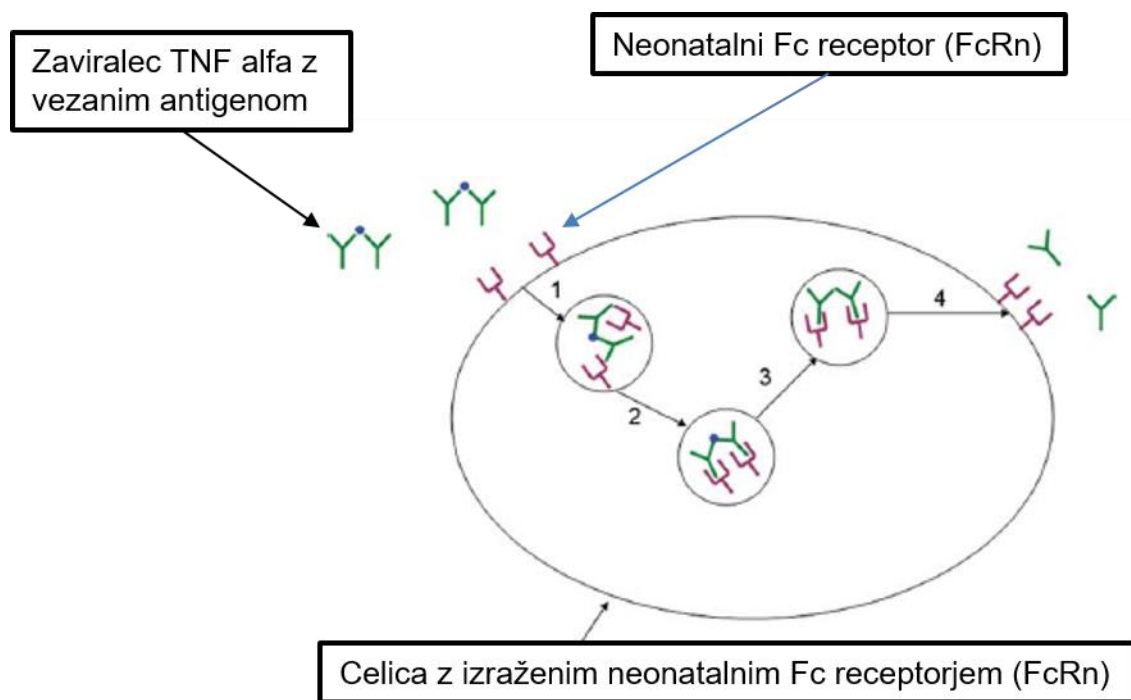
Slika 3. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek celic retikuloendotelijskega sistema (povzeto po⁷⁰)

- b. Zaviralci TNF-alfa se vežejo na ciljni antigen TNF-alfa, ki obstaja v topni in membransko vezani obliki, nato pride do internalizacije in razgradnje v lizosomih. S tem mehanizmom se razlaga vpliv vnetnega bremena na klinični odgovor na zaviralce TNF-alfa (ang. antigen sink), saj je bilo večkrat pokazano, da bolniki, ki imajo v serumu in črevesu velike količine TNF-alfa, slabše odgovorijo na standardne odmerke zaviralcev TNF-alfa (npr. bolniki z ulceroznim kolitisom in visokim CRP). Skladna s tem so tudi opažanja, da imajo bolniki z velikim vnetnim bremenom večkrat nizke koncentracije zaviralcev TNF-alfa ali pa koncentracije pod mejo določljivosti tik pred naslednjo aplikacijo.^{76,77} Značilno za to pot je, da se zasiči, če prejme bolnik dovolj visoke odmerke zdravila. (Slika 4)



Slika 4. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek vezave na membransko vezane antigene (povzeto po⁷⁰)

- c. Neonatalni Fc receptor je izražen na celicah retikuloendotelijskega sistema in v žilnem endoteliju. Ta receptor veže komplekse imunoglobulinov (in s tem tudi zaviralce TNF-alfa) z antigenom (TNF-alfa), pride do endocitoze, kjer se nato razgradi antigen, imunoglobulin (in s tem tudi zaviralec TNF-alfa) pa se vrne v obtok. Ta pot torej predstavlja reševalni mehanizem za zaviralce TNF-alfa. Pri tej poti je pomembna povezava s serumskim albuminom, ki se tudi reciklira po tej poti; pokazano je bilo, da je očistek infliksimaba večji pri bolnikih z nizkimi serumskimi albumini.^{70,78} (Slika 5)



Slika 5. Metabolizem zaviralcev TNF-alfa prek vezave na neonatalni Fc receptor (povzeto po⁷⁰⁾)

Vpliv značilnosti bolnika in aktivnosti bolezni

Na farmakokinetiko zaviralcev TNF-alfa vplivajo tudi značilnosti bolnika, kot so telesna teža, koncentracija albuminov, aktivnost bolezni.

Očistek infliksimaba se spreminja glede na bolnikovo telesno težo, tako imajo lažji bolniki ob odmerku, ki ga predvidevajo navodila za uporabo zdravila (5 mg/kg telesne teže), tudi do 35 % nižje koncentracije zdravila, kar lahko vodi v nizke koncentracije infliksimaba ali koncentracije pod mejo določljivosti med zdravljenjem in s tem do slabega učinka zdravila. Glede na navodila proizvajalca se infliksimab odmerja linearno glede na telesno maso, vendar se očistek glede na telesno maso spreminja nelinearno – posledično lažji bolniki pogosto prejemajo prenizek odmerek zdravila (npr. otroci), saj je na primer očistek za bolnika, ki ima 40 kg za 50 % višji kot pri bolniku, ki ima 80 kg, oba pa prejemata po 5 mg infliksimaba na kg telesne mase. Glede na farmakokinetične modele torej sledi, da potrebujejo bolniki z nižjo telesno maso višji odmerek infliksimaba na kilogram telesne mase kot težji bolniki.⁷⁹

Po drugi strani pa so pokazali, da debeli bolniki z revmatoidnim artritisom (indeks telesne teže nad 30) slabše odgovorijo za infliksimab. To so pripisali provnetnemu delovanju maščobnega tkiva, ki proizvaja TNF-alfa, IL-6 in druge provnetne citokine, ter s tem prispeva k vnetnemu bremenu.⁸⁰

Pri bolnikih z nizkimi koncentracijami albuminov so večkrat opazovali koncentracije infliksimaba pod mejo določljivosti že takoj po indukciji. Tako ima nizka koncentracija albuminov negativen učinek na farmakokinetiko infliksimaba, ta učinek pa je vsaj v določeni meri neodvisen od aktivnosti bolezni, kjer tudi sicer pogosto opazujemo nizke koncentracije albuminov. Na osnovi farmakokinetičnih modelov je Dotan s sodelavci pokazala, da je pri bolnikih z nizkimi serumskimi albumini s krajšanjem intervala med odmerki možno doseči višje najnižje koncentracije infliksimaba kot z ekvivalentnim višanjem odmerka (na primer: odmerjanje infliksimaba 5mg/kg telesne teže vsake 4 tedne je bolj učinkovito kot odmerjanje 10mg/kg telesne teže vsakih 8 tednov, čeprav se v enakem časovnem obdobju za takega bolnika porabi ista količina infliksimaba).⁷⁹

Aktivnost bolezni vpliva na odziv bolnikov na zaviralce TNF-alfa. Bolniki z bolj aktivno boleznijo slabše odgovorijo na enak odmerek zdravila. Primer je hud zagon ulceroznega

kolitisa; bolniki s povišanim CRP, ki kaže na hudo vnetno aktivnost, 14-krat slabše odgovorijo na zdravljenje z infliksimabom.⁸¹ To razlagajo s povišanim vnetnim bremenom in s tem večjo porabo infliksimaba. Posledično imajo bolniki, ki slabše odgovorijo na terapijo, večkrat koncentracije pod mejo določljivosti že kmalu po indukciji (55% bolnikov, ki so potrebovali kirurško odstranitev črevesa je imelo koncentracije pod mejo določljivosti).⁷⁶ Značilno za kronično vnetno črevesno bolezen je izguba zaviralcev TNF-alfa v blatu, saj se zdravilo izloča skozi poškodovano sluznico črevesa. Povečana izguba infliksimaba v blatu je bila poveza s slabim odgovorom na zdravljenje, tako so imeli bolniki, ki niso odgovorili na indukcijo z infliksimabom koncentracijo v blatu 5.01 ug/ml, tisti, ki pa so odgovorili, pa le 0.54 ug/ml.⁸²

Imunogenost zaviralcev TNF-alfa

Od vseh farmakokinetičnih dejavnikov je najbolj pomembna imunogenost zaviralcev TNF-alfa, saj je bilo pokazano, da lahko pojav protiteles proti zaviralcem TNF-alfa povzroči izgubo učinka teh zdravil. Monoklonska protitelesa, kamor spadajo tudi zaviralci TNF-alfa, so velike molekule in pri določenem deležu bolnikov sprožijo nastanek protiteles proti zdravilu. Pri zdravljenju kronične vnetne črevesne bolezni z infliksimabom se protitelesa pojavijo pri 16 %–73 % bolnikov, če so bolniki zdravljeni epizodično (to pomeni, da samo ob pojavu simptomov bolezni prejmejo infuzijo infliksimaba)^{83–86}, ob vzdrževalnem načinu zdravljenja (bolniki prejemajo infliksimab tudi po tem, ko so že dosegli remisijo bolezni, kot trajno vzdrževalno zdravljenje) pa pri 6 %–17 % bolnikov.^{83,87,88} Pojav protiteles proti zaviralcem TNF-alfa bistveno poveča očistek zdravila, v eni od raziskav je bilo ocenjeno, da pojav protiteles proti infliksimabu poveča očistek v povprečju za 259 %.⁷⁹ Pojav protiteles je povezan z zmanjšanjem učinka ali popolno izgubo učinka in z infuzijskimi reakcijami. Infuzijske reakcije so lahko zelo hude in so lahko vzrok za ukinitve zdravljenja.^{89,90} Protitelesa proti zaviralcem TNF-alfa so lahko specifična za različne epitope molekule. Lahko se vežejo na aktivno mesto domene Fab zaviralca TNF-alfa, taka protitelesa direktno nevtralizirajo učinek zdravila (antiidiotipska protitelesa) ali pa se vežejo na druge dele fragmenta Fab, ki niso direktno vpleteni v vezavo TNF-alfa (antialotipska protitelesa). Antialotipska protitelesa ne vodijo direktno v nevtralizacijo, imajo pa lahko pomemben vpliv na očistek zaviralca TNF-alfa, saj je očistek zaviralca

TNF-alfa mnogo večji, če je nanj vezano protitelo. Tako obe vrsti protiteles, antiidiotipska kot tudi antialotipska, vplivata na učinkovitost in varnost zaviralcev TNF-alfa. Obe vrsti protiteles tvorita v organizmu z zaviralcem TNF-alfa komplekse, posledično se spremeni očistek, pride do znižanja koncentracije zaviralcev TNF-alfa in s tem do izgube učinka. Korelacija med nizkimi koncentracijami zaviralcev TNF-alfa in koncentracijami pod mejo določljivosti ter izgubo kliničnega učinka je bila večkrat pokazana.^{84,88,90–92}

Kombinirana terapija kot način zmanjševanja imunogenosti zaviralcev TNF-alfa in dileme v zvezi s tem

Kombiniranje zaviralca TNF-alfa infliksimaba z imunomodulatorjem (azatioprin ali metotreksat) se je izkazalo za učinkovit način manjšanja imunogenosti infliksimaba v časih, ko smo to zdravilo uporabljali po t.i. »epizodičnem načinu«^{93,94}, saj so pri bolnikih, ki so prejeli poleg epizodičnih infuzij infliksimaba še imunomodulator, ugotavljali manj odpovedi infliksimaba in manj infuzijskih reakcij.⁸⁴ Leta 2002 so v študiji ACCENT1⁵⁸ pokazali, da je zdravljenje z infliksimabom mnogo bolj učinkovito, če se uporablja t.i. »vzdrževalni način«, kjer se infliksimab aplicira tudi v času remisije bolezni vsakih 8 tednov. Tak način zdravljenja je povezan z mnogo manjšo imunogenostjo infliksimaba, zato se zdi manj pomembno, da bolniki, zdravljeni z »vzdrževalnim načinom«, sočasno ves čas prejemajo tudi imunomodulator^{58,95}, vendar pa danes ni jasno kakšna je dobrobit nadaljevanja sočasnega zdravljenja z imunomodulatorjem (še zlasti ne v kvantitativnem smislu). To je še posebej vprašljivo pri bolnikih, ki sploh niso imeli kliničnega odgovora na monoterapijo z imunomodulatorjem. Dileme v zvezi s sočasnim zdravljenjem z imunomodulatorjem so še večje zaradi dejstva, da je kombinirana terapija z imunomodulatorjem in infliksimabom povezana z večjim tveganjem za nevarne okužbe⁹⁶ in malignome^{97,98}, tudi za vedno smrtni hepatosplenični T limfom, ki se pojavi nepredvidljivo pri mladih moških.

Zaradi zgoraj naštetih argumentov je stroka razdeljena in se kombinirana terapija v svetu uporablja na zelo različne načine. V Evropi, ne pa tudi v ZDA, je relativno uveljavljen vmesni način, to je 6-mesečno kombinirano zdravljenje, kar pomeni, da se bolnika 6 mesecev zdravi s kombinacijo infliksimaba in imunomodulatorja, nato pa se pri bolnikih,

ki ob tem zdravljenju dosežejo remisijo, ukine imunomodulator in nadaljuje z infliksimabom v monoterapiji.

Glavni argument za 6-mesečno kombinirano zdravljenje je zaviranje imunogenosti infliksimaba in s tem ugoden farmakokinetični učinek imunomodulatorja na infliksimab, vendar pa so si študije glede tega nasprotujoče in so maloštevilne.^{49,90,92,99}

- nekateri so mnenja, da trajanje kombiniranega zdravljenja ne bi smelo biti omejeno samo na 6 mesecev in da bi moralo tako zdravljenje trajati ves čas zdravljenja bolezni, tudi več let;^{49,99}
- drugi menijo, da je 6-mesečna kombinirana terapija zadostna;⁹²
- nekateri podatki pa celo kažejo, da kombinirana terapija ni bolj učinkovita kot monoterapija z infliksimabom in da zato bolniki kombinirane terapije sploh ne potrebujejo.⁶¹

Neznano na področju in argumenti za našo raziskavo:

Danes ni znano, kakšen je kvantitativni doprinos sočasnega zdravljenja z imunomodulatorjem k manjšanju imunogenosti infliksimaba ob vzdrževalnem načinu zdravljenja. Do nedavnega tega ni bilo mogoče izmeriti, zdaj pa imamo tehnologijo, s katero lahko zmerimo koncentracije infliksimaba in protiteles proti infliksimabu in tako dobimo vpogled v doprinos sočasnega zdravljenja z imunomodulatorjem. Tako je bil eden od namenov naše raziskave dobiti vpogled v to, kako velik je učinek imunomodulatorja v kvantitativnem smislu.

Ob prehodu s kombinirane terapije z infliksimabom in imunomodulatorjem na monoterapijo z infliksimabom bi pričakovali, da bo prišlo do negativnih vplivov na farmakokinetiko/imunogenost infliksimaba, pa tudi klinična opažanja so, da ob ukinitvi imunomodulatorja pri določenem deležu bolnikov pride do ponovnega zagona bolezni. Kakšen je učinek ukinitve imunomodulatorja danes ni jasno, zato je bil naš namen kvantificirati morebitni učinek ukinitve imunomodulatorja in najti način, kako bi identificirali bolnike, pri katerih pride po ukinitvi imunomodulatorja do ponovnega zagona bolezni.

NAMEN RAZISKAVE IN HIPOTEZE

Namen dela

Namen našega dela je bil ugotoviti, ali sočasno zdravljenje z imunomodulatorjema azatioprinom/metotreksatom vpliva na farmakokinetiko in imunogenost infliksimaba pri bolnikih s Crohnovo boleznijo; ugotoviti, ali ukinitev imunomodulatorja pri bolnikih, ki so v klinični remisiji ob kombiniranem zdravljenju z infliksimabom in imunomodulatorjem, vpliva na farmakokinetiko in imunogenost infliksimaba ter ugotoviti, ali je koncentracija infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja napovedni dejavnik za sekundarno odpoved infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja.

Hipoteze

1. Bolniki s Crohnovo boleznijo, ki so zdravljeni s kombinacijo infliksimab + azatioprin/metotreksat, imajo višje koncentracije infliksimaba in manj pogosto razvijejo protitelesa proti infliksimabu kot bolniki, ki prejemajo infliksimab v monoterapiji.
2. Ukinitev azatioprina/metotreksata pri bolnikih, ki so v klinični remisiji ob kombinirani terapiji z infliksimabom + azatioprinom/metotreksatom, privede do znižanja koncentracij infliksimaba in pojava protiteles proti infliksimabu.
3. Koncentracija infliksimaba pred ukinitvijo azatioprina/metotreksata pri bolnikih, ki so v klinični remisiji ob kombinirani terapiji z infliksimabom in azatioprinom/metotreksatom, je napovedni dejavnik za klinično remisijo/zagon Crohnove bolezni po ukinitvi azatioprina/metotreksata.

METODE

Zasnova raziskave in preiskovanci

Preiskovanci:

V kohortno študijo smo vključili 223 bolnikov s Crohnovo boleznijo, ki so prejeli vzdrževalno zdravljenje z infliksimabom v Univerzitetni bolnišnici Gasthuisberg v Leuvnu v Belgiji. Bolnike smo prospektivno sledili skozi celotno obdobje zdravljenja v okviru nacionalnega projekta VLECC (Vlaamse Erfelijkheid studie Crohn en Colitis Ulcerosa). V okviru tega projekta smo prospektivno zbirali klinične podatke v obliki elektronskega kartona bolnikov. Zbirali smo demografske podatke (spol, starost ob postavitvi diagnoze, trajanje bolezni, kajenje) ter podatke o fenotipu bolezni (po Montrealski klasifikaciji¹⁰⁰) ter o aktivnosti bolezni skozi čas. Aktivnost bolezni smo ocenili pred vsako aplikacijo infliksimaba, tako klinično (ocena izkušenega gastroenterologa) kot tudi s pomočjo biokemičnih označevalcev (C-reaktivni protein, trombocitoza, kalprotektin) in občasno tudi endoskopsko.

Sočasno zdravljenje z imunomodulatorji:

Ustaljena klinična praksa v Univerzitetni bolnišnici Gasthuisberg v Leuvnu v Belgiji je, da bolniki, v kolikor je le mogoče, začnejo zdravljenje z infliksimabom v kombinaciji z imunomodulatorjem. Kombinirano zdravljenje z imunomodulatorjem prejema vsaj 6 mesecev oziroma toliko časa, da dosežejo remisijo bolezni, nato pa preidejo na vzdrževalno monoterapijo z infliksimabom. Bolniki, ki imunomodulatorja ne prenašajo, začnejo zdravljenje z infliksimabom v monoterapiji, brez sočasnega kombiniranega zdravljenja.

Infliksimab se odmerja glede na telesno maso in sicer bolnik prejme 5 mg infliksimaba na kg telesne mase v obliki intravenske infuzije. Prvi infuziji sledi druga indukcijska infuzija po 2 tednih in nato tretja indukcijska infuzija 4 tedne za tem. Po treh indukcijskih infuzijah prejema bolniki vzdrževalno zdravljenje z infliksimabom vsakih 8 tednov v enakem

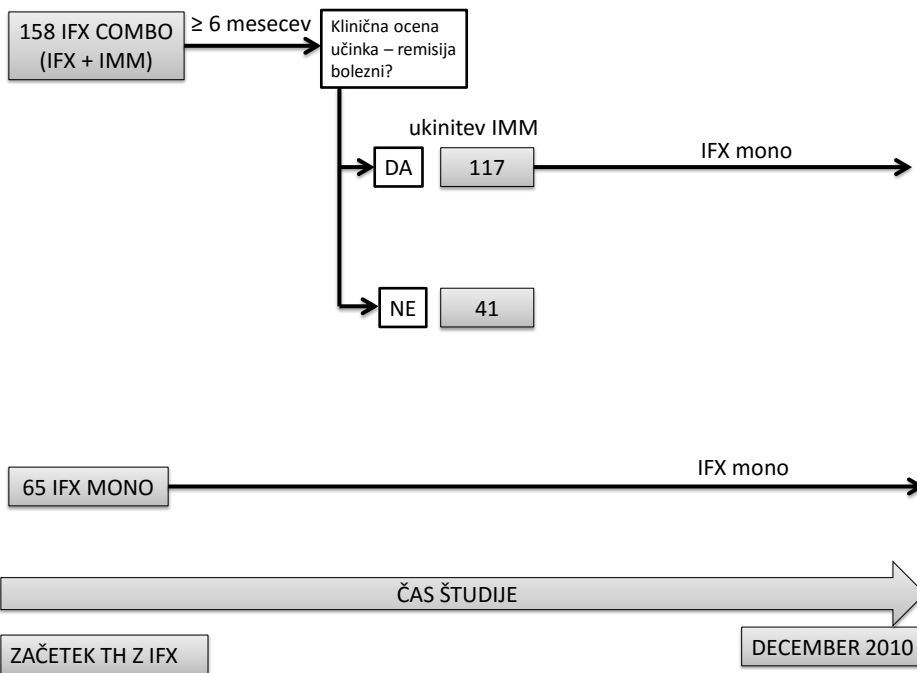
odmerku 5 mg na kg telesne mase. V nekaterih primerih pa so bolniki zdravljenje z infliksimabom začeli brez treh indukcijskih odmerkov, kjer je prvi infuziji infliksimaba sledila druga infuzija čez 8 tednov.

Kot imunomodulator bolniki prejemajo bodisi tiopurine (azatioprin 2 – 2,5 mg kg telesne mase ali purinetol 1 – 1,5 mg kg telesne mase) ali metotreksat (15 mg tedensko subkutano).

S pomočjo elektronskega kartona bolnikov smo pridobili podatke o sočasnem zdravljenju z imunomodulatorjem. Na ta način smo 223 bolnikov razdelili v dve podskupini bolnikov, in sicer na:

- 1) bolnike, ki so prejemali infliksimab skupaj z imunomodulatorjem vsaj 6 mesecev in nato v primeru klinične remisije ukinili imunomodulator in nadaljevali z infliksimabom v monoterapiji (117 bolnikov) (skupina IFX COMBO) ter
- 2) bolnike, ki zaradi neprenašanja imunomodulatorja le tega niso prejemali in so tako prejemali infliksimab v monoterapiji od samega začetka (65 bolnikov) (skupina IFX MONO).

Zdravljenje IFX COMBO podskupine 117 bolnikov, ki je prejemale kombinirano zdravljenje, smo dodatno razdelili v dve obdobji. Prvo je obdobje, ko so prejemali infliksimab in imunomodulator sočasno (COMBO Z IMM), drugo pa obdobje po ukinitvi imunomodulatorja (COMBO BREZ IMM), ko so prejemali infliksimab v monoterapiji. Povprečni čas sočasnega prejemanja imunomodulatorja v skupini IFX COMBO je bil 13 mesecev (interkvartilni razpon 8 do 23 mesecev) (Slika 6).



*IMM, imunomodulator; IFX, infliksimab

Slika 6. Potek sočasnega zdravljenja bolnikov z imunomodulatorjem

Določanje serumskih koncentracij infliksimaba in protiteles proti infliksimabu

V okviru projekta VLECC smo prospektivno zbirali serumske vzorce in jih hranili v biobanki na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vzorci so bili odvzeti bolnikom na dan infuzije infliksimaba, tik pred naslednjo aplikacijo zdravila. Za namen naše raziskave smo določili serumske koncentracije infliksimaba in protiteles proti infliksimabu retrospektivno, to je po zaključenem opazovanem obdobju, zato rezultati meritev niso imeli vpliva na klinične odločitve. Za vsakega bolnika smo pridobili vsaj 1 serumski vzorec, vendar – kadar je bilo le mogoče – serijske vzorce skozi celotno opazovano obdobje: po en vzorec za vsako leto zdravljenja ter vzorec tik pred ukinitvijo imunomodulatorja v skupini IFX COMBO ter za vse bolnike zadnji razpoložljivi vzorec. V povprečju smo tako za vsakega bolnika imeli na voljo 5 serumskih vzorcev, skupno 1053 vzorcev.

Za določanje koncentracije infliksimaba smo uporabili validirano ELISA metodo razvito v laboratoriju za terapevtska in diagnostična protitelesa na Univerzi v Leuvnu v Belgiji. Pri tej metodi so ELISA plošče prekrite z rekombinantnim TNF-alfa, na katere se veže infliksimab iz seruma bolnikov. Sekundarno protitelo je monoklonsko zajčje protitelo označeno s hrenovo peroksidazo. Spodnja meja določljivosti je $0,30\text{ }\mu\text{g/ml}$.¹⁰¹

Protitelesa proti infliksimabu so bila izmerjena z dvojno antigensko ELISA metodo, ki je bila tudi razvita in validirana v istem laboratoriju. Pri tej metodi so ELISA plošče prekrite z infliksimabom, na katerega se nato ujamejo protitelesa proti infliksimabu iz bolnikovega seruma. Protitelesa proti infliksimabu so nato kvantificirana s pomočjo infliksimaba označenega s konjsko peroksidazo. Spodnja meja določljivosti je postavljena kot ekvivalent $1,0\text{ }\mu\text{g/ml}$. Spodnja meja je določena kot srednja koncentracija kontrolnih serumov + 3 standardne deviacije. Zaradi interference z infliksimabom smo protitelesa proti infliksimabu določili le, kadar je bila koncentracija infliksimaba pod mejo določljivosti, tj. pod $0,30\text{ }\mu\text{g/ml}$.¹⁰¹

Definicije kliničnih izidov

Klinična remisija

Bolnike, vključene v študijo, je pred vsako aplikacijo infliksimaba pregledal izkušen gastroenterolog in na osnovi kliničnih najdb in laboratorijskih preiskav ocenil aktivnost bolezni. Kadar ni bilo kliničnih znakov, ki bi nakazovali aktivno bolezen (bolečine v trebuhu, driska, krvavo blato, urgentni pozivi na blato, vročina) in so bili ob tem tudi nizki vnetni kazalci, je bilo ocenjeno, da je bolnik v *klinični remisiji* – bolnik je v tem primeru nadaljeval z enakim vzdrževalnim režimom odmerjanja infliksimaba.

Delna odpoved infliksimaba

Kadar je bilo ob obisku bolnika zaznati znake aktivne bolezni (klinično, laboratorijsko in v primeru dvomov tudi endoskopsko oziroma radiološko), smo bolniku povišali odmerek infliksimaba, bodisi tako, da smo povišali odmerek infliksimaba (npr. iz 5mg/kg telesne teže vsakih 8 tednov na 10 mg/kg telesne teže vsakih 8 tednov) ali pa skrajšali interval aplikacij (npr. iz 5mg/kg telesne teže vsakih 8 tednov na 5mg/kg telesne teže vsake 4 tedne). Če je temu sledilo klinično izboljšanje, smo to definirali kot *delna odpoved infliksimaba*.

Popolna odpoved infliksimaba

Kadar povišanje odmerka infliksimaba ni bilo učinkovito in je bolezen kljub temu ostala aktivna, smo zdravilo infliksimab ukinili in prešli na drugo zdravilo (npr. adalimumab, študijsko zdravilo itd.). To je bilo opredeljeno kot *popolna odpoved infliksimaba*.

Analiza rezultatov in statistične metode

Za zvezne sprejemljivke smo izračunali mediano in interkvartilni razpon, razlike med skupinami pa testirali z Mann-Whitneyjevim U testom. Razlike med kategoričnimi spremenljivkami smo glede na velikost vzorca testirali bodisi s testom Hi-kvadrat bodisi s Fischerjevim testom.

Klinični izid bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja smo analizirali s pomočjo analize preživetja (metoda Kaplan-Meier, test Log-Rank ter Coxova regresija). Neodvisne spremenljivke (prediktorji) so bile starost pacientov, trajanje bolezni, trajanje kombiniranega zdravljenja, spol pacientov, predhodno epizodično zdravljenje z infliksimabom ter CRP in koncentracija infliksimaba. Odvisne spremenljivke (kriteriji) so bili čas do povišanja odmerka infliksimaba, čas do operacije zaradi odpovedi zdravljenja, čas do dokončne odpovedi infliksimaba ter čas do prekinitve zdravljenja z infliksimabom zaradi stranskih učinkov¹⁰².

Evolucijo koncentracij infliksimaba skozi opazovani čas študije smo analizirali z linearnimi mešanimi modeli logaritmov koncentracij infliksimaba, ki so upoštevali učinek časa, sočasno in predhodno zdravljenje z imunomodulatorjem, dvigovanje odmerkov infliksimaba, predhodno epizodično zdravljenje z infliksimabom, starost in spol pacienta ter trajanje bolezni.

ROC krivuljo smo uporabili za identifikacijo napovednih koncentracij infliksimaba za izhod bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja.

Za statistično značilno smo rezultat šteli, kadar je bila p vrednost $< 0,05$.

Za statistično analizo smo uporabili programski paket SPSS 17.0 (IBM Inc.) in programsko okolje R (Bell Laboratories, Lucent Technologies).^{103,104}

Etični vidiki

Dovoljenje etične komisije je bilo pridobljeno v okviru študije VLECC (Leuven, Belgija, 29. marec 2012, številka vloge: B322201213950). Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko je na seji 13. maja 2014 ocenila, da je raziskava etično sprejemljiva in s tem podala soglasje (št. 45/5/14).

REZULTATI

Bolniki

Demografski podatki bolnikov so prikazani v Tabeli 1.

Tabela 1: Demografski podatki bolnikov

Študijska skupina (število bolnikov)		INFLIKSIMAB MONO (N=65)	INFLIKSIMAB COMBO (N=158)	p
Starost v letih (mediana, interkvartilni razpon)		39 (31-49)	35 (24-43)	0,01
Moški spol		29 (45%)	75 (47%)	0,70
Lokacija bolezni *	L1	8 (12%)	29 (18%)	0,03
	L2	8 (12%)	42 (27%)	
	L3	43 (66%)	80 (51%)	
	L4	6 (9%)	7 (4%)	
Trajanje bolezni ob začetku zdravljenja z infliksimabom v letih (mediana/ interkvartilni razpon)		14 / (4-21)	8 / (3-15)	0,01
Indukcijska terapija		15 (23%)	39 (25%)	0,80
Indukcijska terapija in vzdrževalno zdravljenje od začetka		14 (22%)	32 (20%)	0,83
Predhodno epizodično zdravljenje z infliksimabom		23 (35%)	71 (45%)	0,19
Kajenje**		20/60** (33%)	42/155** (27%)	0,37

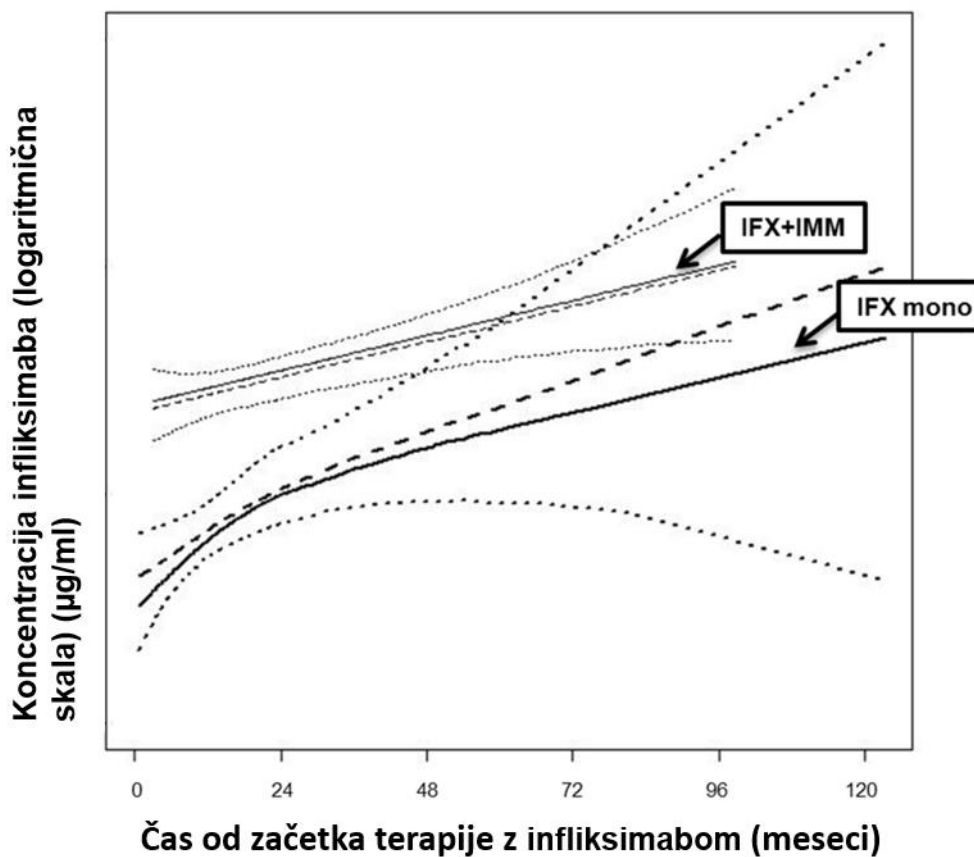
* Montrealska klasifikacija¹⁰⁰: L1- ileum, L2 – kolon, L3 – ileum in kolon, L4- zgornja prebavila

** število bolnikov se ne ujema s celotnim številom kohorte, ker za nekatere bolnike ni bilo na voljo podatkov o kajenju

Hipoteza 1:

Bolniki, ki so bili zdravljeni s kombinacijo infliksimab + imunomodulator, so imeli v povprečju 1,44-krat (95% interval zaupanja, 1.07–1.92; $p=0,02$) višje koncentracije infliksimaba kot bolniki, ki so bili zdravljeni z infliksimabom v monoterapiji (Slika 7).

Bolniki, ki so bili zdravljeni s kombinacijo infliksimab + imunomodulator, so manj pogosto razvili protitelesa proti infliksimabu (14/158, 9%) kot bolniki, ki so bili zdravljeni z infliksimabom v monoterapiji (15/65, 23%) ($p=0,01$).



Slika 7. Vpliv imunomodulatorja na serumske koncentracije infliksimaba skozi čas

Slika 7 prikazuje evolucijo koncentracij infliksimaba skozi čas glede na začetno strategijo zdravljenja. *Polna krivulja IFX+IMM* prikazuje povprečno koncentracijo IFX pri bolnikih, ki so zdravljenje začeli s kombinirano strategijo, *polna krivulja IFX mono* pa prikazuje povprečno koncentracijo infliksimaba pri bolnikih, ki so infliksimab prejeli ves čas kot monoterapijo. *Črtkani krivulji* prikazujeta povprečje, izračunano z metodo ponovnega vzorčenja (ang. bootstrap), *pikčaste krivulje* pa kažejo 95-odstotni interval zaupanja po 1000 ponovitvah z metodo ponovljenega vzorčenja. Razširitev intervalov zaupanja skozi čas je posledica manjšega števila vzorcev, ki so na voljo po daljšem opazovanju. Krivulja IFX+IMM se konča po 99 mesecih, saj po tej časovni točki ni bilo več vzorcev za analizo.

Hipoteza 2:

Ukinitev imunomodulatorja pri bolnikih, ki so bili v klinični remisiji ob kombinirani terapiji z infliksimabom in imunomodulatorjem, ni privedla do znižanja koncentracij infliksimaba, saj je bila mediana koncentracij pred ukinitvijo 3,2 µg/ml (interkvartilni razpon: 1,6–5,8 µg/ml), po ukinitvi pa 3,7 µg/ml (interkvartilni razpon: 1,3–6,3 µg/ml)(p=0,70). Deleži bolnikov z različnimi razponi koncentracij infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja in po njej so prikazani v Tabeli 2. Po ukinitvi imunomodulatorja so 3/74 (4%) bolnikov razvili protitelesa proti infliksimabu.

Tabela 2. Serumske koncentracije infliksimaba ob in po ukinitvi imunomodulatorja

Koncentracija infliksimaba	Ob ukinitvi imunomodulatorja (N=52)	Po ukinitvi imunomodulatorja * (N=52)
Mediana v µg/ml (interkvartilni razpon)	3,2 (1,6 – 5,8)	3,7 (1,3 – 6,3)**
Pod spodnjo mejo določljivosti (<0,30 µg/ml)	3,8 %	17,3 %
0,30 do < 1,0 µg/ml	9,6 %	1,9 %
1,0 µg/ml do < 3,0 µg/ml	34,6 %	23,1 %
3,0 µg/ml do < 5,0 µg/ml	17,3 %	26,9 %
≥ 5,0 µg/ml	34,6 %	30,8 %

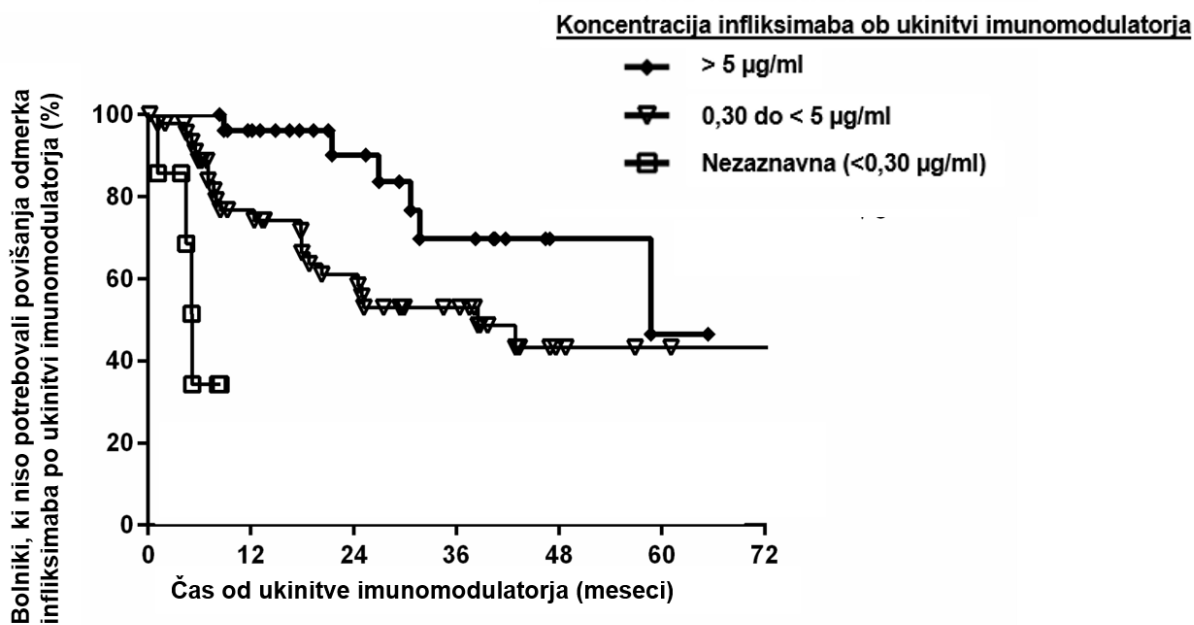
Vključeni so samo bolniki s parnimi neoptimizirani vzorci. Mediana do druge parne meritve po ukinitvi imunomodulatorja je bila 20 mesecev (interkvartilni razpon: 9 do 31 mesecev).

* Zadnji neoptimizirani vzorec, ki je bil na voljo.

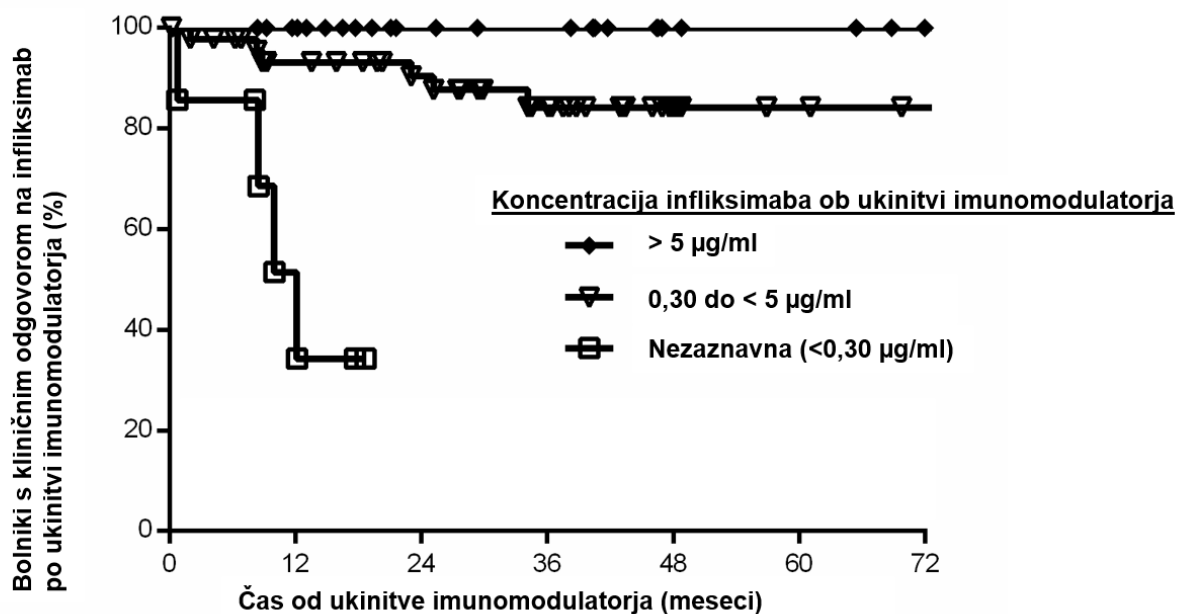
** P = 0,70 (Mann-Whitney U test)

Hipoteza 3.

Koncentracija infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja je bil napovedni dejavnik za klinično remisijo/zagon Crohnove bolezni po ukinitvi imunomodulatorja. Koncentracija infliksimaba je bila povezana z zmanjšanim tveganjem za potrebo po dvigu odmerka infliksimaba zaradi zagona bolezni (HR 0,36; 95% interval zaupanja: 0,14 to 0,91, $p=0,03$) (Slika 8), potrebo po kirurškem zdravljenju (HR 0,10; 95% interval zaupanja: 0,01 to 0,76, $p=0,03$) in popolno odpoved infliksimaba zaradi dokončne izgube učinka (HR 0,16; 95% interval zaupanja: 0,03 to 0,74, $p=0,02$) (Slika 9). Koncentracija infliksimaba $>5 \mu\text{g/ml}$ je imel 100-odstotno napovedno vrednost za neodpoved infliksimaba, po drugi strani pa je 8/9 bolnikov s koncentracijami infliksimaba pod mejo določljivosti imelo zagon bolezni v nekaj mesecih po ukinitvi imunomodulatorja. Krivulja ROC je identificirala spodnjo mejo določljivosti infliksimaba kot najboljšo diskriminacijsko vrednost.



Slika 8. Vpliv serumske koncentracije infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja na potrebo po dvigu odmerka infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja



Slika 9. Vpliv serumske koncentracije infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja na dokončno odpoved infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja

Rezultati multivariatne analize so prikazani v Tabeli 3 in Tabeli 4. Zaradi močne korelacije med CRP in koncentracijo infliksimaba smo analizirali izhode bolnikov s Coxovo regresijo z dvema različnima modeloma. Prvi je vključeval CRP in ne koncentracije infliksimaba (Tabela 3), drugi je vključeval koncentracijo infliksimaba in ne CRP (Tabela 4).

Tabela 3. Coxova regresija kliničnega izhoda bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja – model 1.

Odvisna sprejemljivka	Neodvisna sprejemljivka	HR [95% interval zaupanja]	p vrednost
Potreba po dvigu odmerka infliksimaba	Predhodna neučinkovitost imunomodulatorja	2,55 [1,00 do 6,50]	0,05
	CRP $\geq$ 5	2,65 [1,08 do 6,50]	0,03
Operacija	CRP $\geq$ 5	11,43 [1,38 do 94,67]	0,02
	Starost bolnika	0,93 [0,85 do 1,01]	0,09
Potreba po dvigu odmerka infliksimaba ali operacija	CRP $\geq$ 5	3,27 [1,36 do 7,89]	0,01
	Predhodna neučinkovitost imunomodulatorja	2,07 [0,87 do 4,89]	0,1
Ukinitiv infliksimaba zaradi izgube učinka ali stranskih učinkov	CRP $\geq$ 5	6,35 [2,15 do 18,73]	<0,01
	Dvig odmerka infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja	5,69 [1,96 do 16,52]	<0,01
Ukinitiv infliksimaba zaradi izgube učinka	CRP $\geq$ 5	7,99 [2,19 do 29,25]	<0,01
	Dvig odmerka infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja	4,59 [1,21 do 17,46]	0,03
	Predhodna neučinkovitost imunomodulatorja	3,95 [0,48 do 35,52]	0,20
Ukinitiv infliksimaba zaradi stranskih učinkov	Trajanje bolezni	0,85 [0,69 do 1,05]	0,13
	Moški spol	0,21 [0,02 do 1,88]	0,16

Tabela 4. Coxova regresija kliničnega izhoda bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja – model 2.

Odvisna sprejemljivka	Neodvisna sprejemljivka	HR [95% interval zaupanja]	p vrednost
Potreba po dvigu odmerka infliksimaba	Log koncentracije infliksimaba	0,36 [0,14 do 0,91]	0,03
Operacija	Log koncentracije infliksimaba	0,10 [0,01 do 0,76]	0,03
	Starost bolnika	0,93 [0,86 do 1,01]	0,09
Potreba po dvigu odmerka infliksimaba ali operacija	Log koncentracije infliksimaba	0,23 [0,09 do 0,58]	<0,01
Ukinitev infliksimaba zaradi izgube učinka ali stranskih učinkov	Log koncentracije infliksimaba	0,21 [0,06 do 0,72]	0,01
	Dvig odmerka infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja	3,72 [1,03 do 13,45]	0,04
Ukinitev infliksimaba zaradi izgube učinka	Log koncentracije infliksimaba	0,16 [0,03 do 0,74]	0,02
	Dvig odmerka infliksimaba pred ukinitvijo imunomodulatorja	6,66 [1,28 do 34,72]	0,02
	Predhodna neučinkovitost imunomodulatorja	4,62 [0,50 do 43,02]	0,18
Ukinitev infliksimaba zaradi stranskih učinkov	Trajanje bolezni	0,87 [0,72 do 1,07]	0,19

RAZPRAVA

Rezultati naše raziskave so pokazali, da ima kombinirano zdravljenje z imunomodulatorji pozitiven učinek na farmakokinetiko infliksimaba, saj so imeli bolniki, ki so prejeli kombinirano terapijo višje koncentracije infliksimaba in so manj pogosto razvili koncentracije infliksimaba pod mejo določljivosti kot bolniki, ki so prejeli monoterapijo z infliksimabom. Po drugi strani pa smo tudi ugotovili, da lahko bolniki po določenem času (mediana 13 mesecev) ukinejo imunomodulator in nadaljujejo z infliksimabom v monoterapiji in to ne povzroči padca koncentracij infliksimaba pri izbrani podskupini bolnikov v klinični remisiji (približno 75 % prospektivno spremljane kohorte). S Coxovo regresijo dolgoročnega kliničnega izhoda bolnikov po ukinitvi imunomodulatorja smo identificirali koncentracijo infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja kot najmočnejši napovedni dejavnik za dolgotrajno klinično remisijo; izkazalo se je, da imajo najboljšo prognozo po ukinitvi imunomodulatorja prav bolniki z visokimi koncentracijami infliksimaba ($\geq 5,0 \mu\text{g/ml}$), saj pri nobenem od teh bolnikov ni prišlo do dokončne odpovedi infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja, kljub dolgemu opazovanemu času (mediana 29 mesecev).

Rezultati naše raziskave podpirajo zgodnje kombinirano zdravljenje, kar je dandanes klinična praksa, povsem nova ugotovitev v naši raziskavi pa je, da postane pozitiven vpliv imunomodulatorja na farmakokinetiko infliksimaba po določenem času zanemarljiv. Posledično ukinitvev imunomodulatorja pri bolnikih, ki so dosegli klinično remisijo in imajo visoke koncentracije infliksimaba, nima negativnega učinka na farmakokinetiko infliksimaba, saj se koncentracija infliksimaba ni znižala po prehodu s kombiniranega zdravljenja na monoterapijo z infliksimabom, pa tudi dolgoročni klinični izhod bolnikov z visokimi koncentracijami je bil odličen, saj v tej podskupini bolnikov nismo opazili odpovedi infliksimaba.

Naši rezultati so v skladu z izsledki študije SONIC⁴⁹, kjer so imeli bolniki, ki so prejeli kombinirano terapijo z infliksimabom in azatioprinom, boljši klinični izhod (remisija bolezni brez uporabe kortikosteroidov po 26 tednih pri 57 % bolnikov) kot bolniki, ki so prejeli monoterapijo z infliksimabom (remisija bolezni brez uporabe kortikosteroidov po 26 tednih pri 44% bolnikov), vendar pa obstaja pomembna razlika v izbiri bolnikov, saj je SONIC

vključevala izključno bolnike, naivne na obe zdravili, to je na infliksimab in na azatioprin. Nasprotno pa je bila v naši raziskavi velika večina bolnikov že predhodno izpostavljena imunomodulatorju azatioprinu; pravzaprav je bilo prav neprenašanje ali neučinkovitost azatioprina predpogoj za začetek zdravljenja z infliksimabom, saj je zdravilo infliksimab zelo drago, zdravljenje enega bolnika stane 10.000–15.000 EUR letno. Žal v naši raziskavi zaradi omejenega števila bolnikov, ki so bili pred uvedbo infliksimaba naivni tudi na azatioprin, nismo imeli statistične moči, da bi lahko analizirali morebitne razlike v morda različnem doprinosu azatioprina k farmakokinetiki infliksimaba med naivnimi in ne-naivnimi bolniki na azatioprin. Rezultate naše raziskave se tako lahko uporablja predvsem pri bolnikih, ki so bili predhodno neuspešno zdravljeni z azatioprinom; glede na to, da je dandanes v Sloveniji (in tudi večini drugih držav po svetu) predhodna neuspešnost imunomodulatorjev predpogoj za začetek zdravljenja z biološkimi zdravili, se rezultati naše raziskave lahko uporabijo pri veliki večini bolnikov.

Vpliv sočasnega zdravljenja z azatioprinom na koncentracije infliksimaba je največji ravno med uvajanjem zdravljenja z infliksimabom, kar se odraža tudi v naši raziskavi z vplivom na koncentracije infliksimaba (Slika 7); razvidno je, da razlika med koncentracijami infliksimaba med obema strategijama zdravljenja (to je med kombiniranim zdravljenjem in monoterapijo) nastane med indukcijo (razlika med izhodiščema krivulj na Sliki 7), nato pa se razlika ne povečuje več in ostane enaka (enak razmik obeh krivulj skozi opazovani čas na Sliki 7). To opravičuje začetno kombinirano zdravljenje kot v študiji SONIC in registracijskih študijah^{49,58,105}, nato pa prehod na monoterapijo z infliksimabom pri bolnikih, ki so ob kombiniranem zdravljenju dosegli klinično remisijo (v primeru naše raziskave je to približno $\frac{3}{4}$ bolnikov). Do nedavnega je bila tako na osnovi kliničnih opazovanj postavljena arbitrarna meja 6 mesecev⁵ kot optimalno trajanje kombinirane terapije, vendar pa smo v klinični praksi opazili, da pri določenih bolnikih po ukinitvi imunomodulatorja, tj. ob prehodu s kombinirane terapije na monoterapijo z infliksimabom, pride do kliničnega zagona bolezni. Klinična opazovanja so bila, da je za uspešnost prehoda s kombinirane na monoterapijo najbolj pomembno, da je bolezen pod popolnim nadzorom, tj., da je dosežena t.i. globoka remisija³⁴. A kljub popolni remisiji bolezni smo občasno vendarle beležili zagon bolezni po ukinitvi imunomodulatorja – naša raziskava je pokazala, da do zagona bolezni pride pri bolnikih, ki so imeli v času ukinitve

imunomodulatorja nizke koncentracije infliksimaba ali koncentracije infliksimaba pod mejo določljivosti. Z našo raziskavo smo tako dobili nov biološki označevalec, to je koncentracija infliksimaba, na podlagi katerega je mogoče oceniti tveganje za zagon bolezni po ukinitvi imunomodulatorja. Naša raziskava tako v algoritme zdravljenja Crohnove bolezni postavlja nov način odločanja o ukinitvi imunomodulatorja, ki bo nadomestil star arbitraren način, ko smo imunomodulator ukinitli po 6 mesecih kombiniranega zdravljenja in nismo poznali vrednosti koncentracije infliksimaba pri določenem bolniku. Iz naše analize sledi, da za dolgoročni klinični uspeh po ukinitvi imunomodulatorja ni toliko pomemben čas kombinirane terapije pač pa koncentracija infliksimaba ob ukinitvi imunomodulatorja.

Pri uvajanju novih bioloških označevalcev v klinično prakso se vedno pojavi vprašanje stroškovne učinkovitosti. Cena določanja koncentracije biološkega zdravila po metodi ELISA je nizka (od 30 do 60 EUR)¹⁰⁶ v primerjavi s ceno odmerka zdravila in drugimi stroški neoptimalno zdravljene bolezni. Cena zdravljenja z infliksimabom bi se lahko drastično povečala po ukinitvi imunomodulatorja, če bi ob tem prišlo do padca koncentracij infliksimaba in bi bilo posledično potrebno bolnikom povišati odmerke infliksimaba, vendar v naši raziskavi ni prišlo do padca koncentracij infliksimaba, saj se mediana koncentracij ni spremenila kljub dolgemu opazovanju po ukinitvi imunomodulatorja (povprečno 20 mesecev, interkvartilni razpon: 9 do 31 mesecev). Čeprav je mediana koncentracij pred ukinitvijo imunomodulatorja in po njej ostala enaka, smo ugotovili, da se je po ukinitvi delež bolnikov s koncentracijami pod mejo določljivosti povišal s 3,8% na 17,3%, vendar na račun bolnikov, ki so imeli že pred ukinitvijo imunomodulatorja zelo nizke ($< 1,0 \mu\text{g/ml}$) koncentracije infliksimaba in bi glede na izsledke študije TAXIT¹⁰⁷ tudi sicer potrebovali dvig odmerka infliksimaba. Delež bolnikov s srednjimi (med $1 \mu\text{g/ml}$ in $5 \mu\text{g/ml}$) in visokimi ($> 5,0 \mu\text{g/ml}$) koncentracijami infliksimaba je ostal enak po ukinitvi imunomodulatorja.

V več raziskavah so ugotovili, da vnetni kazalec CRP napoveduje klinični zagon bolezni¹⁰⁸, podobno se je izkazalo tudi v naši raziskavi, saj so bile že minimalno povišane vrednosti CRP močan negativni napovednik. Med koncentracijo infliksimaba in CRP obstaja močna korelacija, kar je skladno z drugimi raziskavami in tudi izvira iz samega mehanizma delovanja infliksimaba, saj imajo bolniki z višjimi koncentracijami bolj

kontrolirano bolezen, torej manj vnetja, nižji CRP.^{107,109} V naši raziskavi se je koncentracija biološkega zdravila izkazala kot močnejši napovednik dolgotrajne klinične remisije kot CRP, saj se je izkazalo, da imajo nekateri bolniki normalne biološke označevalce vnetja in ob tem nizke koncentracije infliksimaba ali celo koncentracije pod mejo določljivosti. Pri teh bolnikih je verjetno imunomodulator (in ne infliksimab) zdravilo, ki je odgovorno za dobro kontrolo bolezni. Pri teh bolnikih bi torej lahko razmislili o obratni strategiji, torej o ukinitvi infliksimaba in nadaljevanju z imunomodulatorjem kot monoterapijo. V skladu s tem so zaključki nedavne retrospektivne analize izraelske skupine¹¹⁰, kjer so bolniki s koncentracijami infliksimaba pod mejo določljivosti lahko za več let uspešno ukinili infliksimab in ob tem ni prišlo do zagona bolezni. Podobno so ugotavljali tudi v študiji STORI¹¹¹, vendar pa je bila tam povezava z nizkimi koncentracijami infliksimaba manj očitna, najverjetneje zaradi tehnične omejitve metode za določanje koncentracije infliksimaba, saj je bila spodnja meja določljivosti 2 µg/ml (v naši raziskavi je bila spodnja meja določljivosti 0,3 µg/ml).

Naše ugotovitve so izrednega pomena za klinično prakso, saj smo ugotovili način, kako izbrati bolnike, ki lahko varno preidejo s kombinirane terapije na monoterapijo z infliksimabom; na ta način lahko ohranimo dober klinični odgovor in se izognemo posledicam dolgotrajne kombinirane terapije, kot so malignomi, vključno s hepatospleničnim T limfomom^{97,98}, ki je vedno smrten, in resnim okužbam⁹⁶, ki so bolj pogoste pri kombinirani terapiji kot pri monoterapiji.

Pomembna ugotovitev naše študije je tudi, da so bili bolniki, ki so imeli klinični zagon Crohnove bolezni po ukinitvi imunomodulatorja tisti, ki so imeli koncentracije infliksimaba pod mejo določljivosti v času ukinitve imunomodulatorja. Upoštevajoč ugotovitve naše raziskave se zdi smiselno, da se pri teh bolnikih poviša odmerek infliksimaba do te mere, da poraste koncentracija infliksimaba nad 5 µg/ml in se nato ukine imunomodulator. Seveda pa je možno, da to pri vseh bolnikih ni mogoče; za razjasnitev tega bi bila potrebna dodatna raziskava. Pomembno je tudi upoštevati, da so podatki o varnosti infliksimaba predvsem iz časov, ko so bolniki prejeli nižje odmerke infliksimaba, torej so bili izpostavljeni nižjim koncentracijam zdravila, zato bo pomembno, da se podatke o varnosti spremlja še naprej, saj bi višji odmerki infliksimaba, četudi v monoterapiji, lahko povzročali

dodatne stranske učinke. V dveh nedavnih raziskavah sicer niso bili ugotovljeni resni stranski učinki ob višjih odmerkih infliksimaba.^{112,113}

Pomembna omejitev naše raziskave je bila nezmožnost dvojno antigenske ELISA metode, da bi zaznali protitelesa proti infliksimabu ob prisotnosti infliksimaba zaradi interference s prostim infliksimabom in infliksimabom, vezanim v imunske komplekse s protitelesi proti infliksimabu.¹⁰¹ Posledično smo lahko zaznali protitelesa proti infliksimabu le, kadar so imeli bolniki koncentracije infliksimaba pod mejo določljivosti. Po drugi strani pa se zdi, da so klinično pomembna protitelesa proti infliksimabu tista, ki povzročijo padec koncentracije infliksimaba do spodnje meje določljivosti in vodijo v klinično odpoved infliksimaba – ta protitelesa smo v naši raziskavi lahko kvantificirali. Po ukinitvi imunomodulatorja so se de novo protitelesa proti infliksimabu v kombinaciji s koncentracijami infliksimaba pod mejo določljivosti pojavila zelo redko, le pri 3 bolnikih. Zanimivo bi bilo, če bi lahko pri teh bolnikih določili prisotnost protiteles proti infliksimabu pred ukinitvijo imunomodulatorja z metodo, ki to tehnično dopušča (HMSA¹¹⁴ ali lambda-ELISA^{115,116}), saj je možno, da so bila ta protitelesa v serumu teh treh bolnikov prisotna že pred ukinitvijo imunomodulatorja v nizkem titru, ki še ni znižal koncentracij infliksimaba do te mere, da bi se to klinično izrazilo. To bi bilo lahko klinično uporabno, saj se pojavljajo v literaturi podatki, da lahko pri nekaterih bolnikih tudi po pojavu protiteles proti infliksimabu s ponovno uvedbo imunomodulatorja ta protitelesa izginejo in se ponovno dosežejo terapevtske koncentracije infliksimaba in klinični odgovor.¹¹⁷

Na podlagi naše raziskave lahko zaključimo, da ima kombinirano zdravljenje z infliksimabom in imunomodulatorjem poziven učinek na farmakokinetiko infliksimaba, vendar pa ukinitvev imunomodulatorja po vsaj 6 mesecih kombiniranega zdravljenja nima negativnega učinka na farmakokinetiko infliksimaba; dolgoročni klinični izhod bolnikov s koncentracijo infliksimaba $\geq 5,0$ $\mu\text{g/ml}$ je odličen, bolniki s koncentracijami infliksimaba pod mejo določljivosti pa imajo v visokem odstotku zagon bolezni, če ukinejo imunomodulator. Bolniki s koncentracijami infliksimaba nad mejo določljivosti, vendar nižjimi od 5,0 $\mu\text{g/ml}$, imajo 20 % tveganje za odpoved infliksimaba po ukinitvi imunomodulatorja.

Najdbe naše študije so pomembne za klinično prakso, saj smo našli nov način, kako izbrati bolnike, ki lahko brez tveganja za izgubo kliničnega odgovora preidejo s kombiniranega zdravljenja z infliksimabom in imunomodulatorjem na monoterapijo z infliksimabom in se s tem izognejo tveganjem dolgoročne kombinirane terapije, kot so resne okužbe in malignomi.^{96–98} Izsledki naše raziskave podpirajo uvedbo določanja koncentracij infliksimaba v klinično prakso in na ta način prispevajo k uvedbi personalizirane medicine v zdravljenje kronične vnetne črevesne bolezni z zaviralci TNF-alfa.

VIRI

1. Drobne D, Bossuyt P, Breynaert C, Cattaert T, Vande Casteele N, Compennolle G, et al. Withdrawal of immunomodulators after co-treatment does not reduce trough level of infliximab in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2015 Mar;13(3):514–521.e4.
2. Bandzar S, Gupta S, Platt MO. Crohn's disease: a review of treatment options and current research. *Cell. Immunol.* 2013 Dec;286(1–2):45–52.
3. Abraham C, Cho JH. Inflammatory bowel disease. *N. Engl. J. Med.* 2009 Nov 19;361(21):2066–78.
4. Khanna R, Bressler B, Levesque BG, Zou G, Stitt LW, Greenberg GR, et al. Early combined immunosuppression for the management of Crohn's disease (REACT): a cluster randomised controlled trial. *The Lancet.* 2015 Nov;386(10006):1825–34.
5. Dignass A, Van Assche G, Lindsay JO, Lémann M, Söderholm J, Colombel JF, et al. The second European evidence-based Consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease: Current management. *J. Crohns Colitis.* 2010 Feb;4(1):28–62.
6. Jakobsen C, Bartek J, Wewer V, Vind I, Munkholm P, Groen R, et al. Differences in phenotype and disease course in adult and paediatric inflammatory bowel disease--a population-based study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011 Nov;34(10):1217–24.
7. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn's disease and ulcerative colitis phenotypes: a genetic association study. *Lancet Lond. Engl.* 2015 Oct 18;
8. de Zoeten EF, Pasternak BA, Mattei P, Kramer RE, Kader HA. Diagnosis and Treatment of Perianal Crohn Disease: NASPGHAN Clinical Report and Consensus Statement. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2013 Sep;57(3):401–12.
9. Dignass A, Lindsay JO, Sturm A, Windsor A, Colombel J-F, Allez M, et al. Second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis part 2: current management. *J. Crohns Colitis.* 2012 Dec;6(10):991–1030.
10. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. Perianal Crohn's disease: classification and clinical evaluation. *Dig. Liver Dis. Off. J. Ital. Soc. Gastroenterol. Ital. Assoc. Study Liver.* 2007 Oct;39(10):959–62.
11. Silverberg MS, Satsangi J, Ahmad T, Arnott IDR, Bernstein CN, Brant SR, et al. Toward an integrated clinical, molecular and serological classification of inflammatory bowel disease: report of a Working Party of the 2005 Montreal World

Congress of Gastroenterology. Can. J. Gastroenterol. J. Can. Gastroenterol. 2005 Sep;19 Suppl A:5A–36A.

12. Chow DKL, Sung JJY, Wu JCY, Tsoi KKF, Leong RWL, Chan FKL. Upper gastrointestinal tract phenotype of Crohn's disease is associated with early surgery and further hospitalization: Inflamm. Bowel Dis. 2009 Apr;15(4):551–7.
13. Louis E. Behaviour of Crohn's disease according to the Vienna classification: changing pattern over the course of the disease. Gut. 2001 Dec 1;49(6):777–82.
14. Press & Awareness [Internet]. [cited 2015 Sep 21]. Available from: <https://www.ecco-ibd.eu/index.php/public-affairs/press-awareness.html>
15. Loftus EV. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology. 2004 May;126(6):1504–17.
16. Kappelman MD, Rifas-Shiman SL, Kleinman K, Ollendorf D, Bousvaros A, Grand RJ, et al. The prevalence and geographic distribution of Crohn's disease and ulcerative colitis in the United States. Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc. 2007 Dec;5(12):1424–9.
17. CDC - Epidemiology of the IBD - Inflammatory Bowel Disease [Internet]. [cited 2015 Aug 9]. Available from: <http://www.cdc.gov/ibd/ibd-epidemiology.htm>
18. Orel R, Kamhi T, Vidmar G, Mamula P. Epidemiology of pediatric chronic inflammatory bowel disease in central and western Slovenia, 1994-2005. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2009 May;48(5):579–86.
19. Urlep D, Trop TK, Blagus R, Orel R. Incidence and phenotypic characteristics of pediatric IBD in northeastern Slovenia, 2002-2010. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 2014 Mar;58(3):325–32.
20. Dušan Baraga, Tatjana Cvetko, Ivan Ferkolj. Epidemiologija bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo v družinski medicini. Gastroenterolog. 2014; 18 Suppl 1:10-17.
21. Burisch J, Jess T, Martinato M, Lakatos PL, ECCO -EpiCom. The burden of inflammatory bowel disease in Europe. J. Crohns Colitis. 2013 May;7(4):322–37.
22. Stark R, König H-H, Leidl R. Costs of inflammatory bowel disease in Germany. Pharmacoeconomics. 2006;24(8):797–814.
23. Lichtenstein GR, Yan S, Bala M, Hanauer S. Remission in patients with Crohn's disease is associated with improvement in employment and quality of life and a decrease in hospitalizations and surgeries. Am. J. Gastroenterol. 2004 Jan;99(1):91–6.

24. Louis E, Löfberg R, Reinisch W, Camez A, Yang M, Pollack PF, et al. Adalimumab improves patient-reported outcomes and reduces indirect costs in patients with moderate to severe Crohn's disease: results from the CARE trial. *J. Crohns Colitis*. 2013 Feb;7(1):34–43.
25. Peeters M, Nevens H, Baert F, Hiele M, de Meyer AM, Vlietinck R, et al. Familial aggregation in Crohn's disease: increased age-adjusted risk and concordance in clinical characteristics. *Gastroenterology*. 1996 Sep;111(3):597–603.
26. Etiology & Pathogenesis | Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and... [Internet]. [cited 2015 Sep 21]. Available from: <https://expertconsult.inkling.com/read/feldman-sleisenger-fordtrans-gastrointestinal-liver-9th/chapter-111/chapter111-reader-3#03ffd3e7ecab44218832118b57f27530>
27. Dorn SD, Abad JF, Panagopoulos G, Korelitz BI. Clinical characteristics of familial versus sporadic Crohn's disease using the Vienna Classification. *Inflamm. Bowel Dis*. 2004 May;10(3):201–6.
28. Jostins L, Ripke S, Weersma RK, Duerr RH, McGovern DP, Hui KY, et al. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*. 2012 Oct 31;491(7422):119–24.
29. Economou M, Trikalinos TA, Loizou KT, Tsianos EV, Ioannidis JPA. Differential effects of NOD2 variants on Crohn's disease risk and phenotype in diverse populations: a metaanalysis. *Am. J. Gastroenterol*. 2004 Dec;99(12):2393–404.
30. Cucino C, Sonnenberg A. Occupational mortality from inflammatory bowel disease in the United States 1991-1996. *Am. J. Gastroenterol*. 2001 Apr;96(4):1101–5.
31. Hughes JB, Hellmann JJ, Ricketts TH, Bohannon BJ. Counting the uncountable: statistical approaches to estimating microbial diversity. *Appl. Environ. Microbiol*. 2001 Oct;67(10):4399–406.
32. Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet Lond. Engl*. 2007 May 12;369(9573):1627–40.
33. Sartor RB. Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol*. 2006 Jul;3(7):390–407.
34. Colombel J-F. Decade in review—IBD: IBD—genes, bacteria and new therapeutic strategies. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol*. 2014 Oct 14;11(11):652–4.
35. Bouguen G, Levesque BG, Pola S, Evans E, Sandborn WJ. Endoscopic assessment and treating to target increase the likelihood of mucosal healing in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc*. 2014 Jun;12(6):978–85.

36. Cosnes J, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, Afchain P, Tiret E, Gendre J-P. Impact of the increasing use of immunosuppressants in Crohn's disease on the need for intestinal surgery. *Gut*. 2005 Feb;54(2):237–41.
37. Cosnes J, Cattan S, Blain A, Beaugerie L, Carbonnel F, Parc R, et al. Long-term evolution of disease behavior of Crohn's disease. *Inflamm.Bowel.Dis.* 7;8(1078–0998 (Print)):244–50.
38. Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1990 Oct;99(4):956–63.
39. Feagan BG, Rutgeerts P, Sands BE, Hanauer S, Colombel J-F, Sandborn WJ, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N. Engl. J. Med.* 2013 Aug 22;369(8):699–710.
40. Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Hanauer S, Colombel J-F, Sands BE, et al. Vedolizumab as induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 2013 Aug 22;369(8):711–21.
41. Sands BE, Feagan BG, Rutgeerts P, Colombel J-F, Sandborn WJ, Sy R, et al. Effects of vedolizumab induction therapy for patients with Crohn's disease in whom tumor necrosis factor antagonist treatment failed. *Gastroenterology*. 2014 Sep;147(3):618–627.e3.
42. Brignola C, De Simone G, Belloli C, Iannone P, Belluzzi A, Gionchetti P, et al. Steroid treatment in active Crohn's disease: a comparison between two regimens of different duration. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 1994 Aug;8(4):465–8.
43. Singleton JW, Law DH, Kelley ML, Mekhjian HS, Sturdevant RA. National Cooperative Crohn's Disease Study: adverse reactions to study drugs. *Gastroenterology*. 1979 Oct;77(4 Pt 2):870–82.
44. Modigliani R, Mary JY, Simon JF, Cortot A, Soule JC, Gendre JP, et al. Clinical, biological, and endoscopic picture of attacks of Crohn's disease. Evolution on prednisolone. Groupe d'Etude Thérapeutique des Affections Inflammatoires Digestives. *Gastroenterology*. 1990 Apr;98(4):811–8.
45. Papi C, Fasci-Spurio F, Rogai F, Settesoldi A, Margagnoni G, Annese V. Mucosal healing in inflammatory bowel disease: Treatment efficacy and predictive factors. *Dig. Liver Dis.* 2013 Dec;45(12):978–85.
46. Abdou NI, Zweiman B, Casella SR. Effects of azathioprine therapy on bone marrow-dependent and thymus-dependent cells in man. *Clin. Exp. Immunol.* 1973 Jan;13(1):55–64.

47. Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D, et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 2003 Apr 15;111(8):1133–45.
48. Sandborn W, Sutherland L, Pearson D, May G, Modigliani R, Prantera C. Azathioprine or 6-mercaptopurine for inducing remission of Crohn's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2000;(2):CD000545.
49. Colombel JF, Sandborn WJ, Reinisch W, Mantzaris GJ, Kornbluth A, Rachmilewitz D, et al. Infliximab, azathioprine, or combination therapy for Crohn's disease. *N.Engl.J.Med.* 10 4;362(1533–4406 (Electronic)):1383–95.
50. Role and Place of Methotrexate in Vasculitis Management: Mechanisms of Action, Metabolism and Pharmacology of Methotrexate [Internet]. [cited 2015 Sep 23]. Available from: http://www.medscape.org/viewarticle/712891_2
51. Cutolo M, Sulli A, Pizzorni C, Serio B, Straub RH. Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 2001 Aug;60(8):729–35.
52. Feagan BG, Rochon J, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, et al. Methotrexate for the treatment of Crohn's disease. The North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* 1995 Feb 2;332(5):292–7.
53. Feagan BG, Fedorak RN, Irvine EJ, Wild G, Sutherland L, Steinhart AH, et al. A comparison of methotrexate with placebo for the maintenance of remission in Crohn's disease. North American Crohn's Study Group Investigators. *N. Engl. J. Med.* 2000 Jun 1;342(22):1627–32.
54. Laharie D, Reffet A, Belleannée G, Chabrun E, Subtil C, Razaire S, et al. Mucosal healing with methotrexate in Crohn's disease: a prospective comparative study with azathioprine and infliximab: Mucosal healing with methotrexate in Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011 Mar;33(6):714–21.
55. Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies: *Clin. Pharmacokinet.* 2010 Aug;49(8):493–507.
56. Tracey D, Klareskog L, Sasso EH, Salfeld JG, Tak PP. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. *Pharmacol. Ther.* 2008 Feb;117(2):244–79.
57. Wallis RS. Tumour necrosis factor antagonists: structure, function, and tuberculosis risks. *Lancet Infect. Dis.* 2008 Oct;8(10):601–11.
58. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, Mayer LF, Schreiber S, Colombel JF, et al. Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet.* 2002 May 4;359(9317):1541–9.

59. Present DH, Rutgeerts P, Targan S, Hanauer SB, Mayer L, Van Hogezand RA, et al. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 1999;340(18):1398–1405.
60. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1997 Oct 9;337(15):1029–35.
61. Schnitzler F, Fidder H, Ferrante M, Noman M, Arijis I, Van Assche G, et al. Long-term outcome of treatment with infliximab in 614 patients with Crohn's disease: results from a single-centre cohort. *Gut.* 2008 Oct 2;58(4):492–500.
62. Ferkolj I, Ihan A, Markovic S. CD19+ in intestinal mucosa predict the response to infliximab in Crohn's disease. *Hepatogastroenterology.* 2005 Aug;52(64):1128–33.
63. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh DG, et al. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut.* 2007 Sep;56(9):1232–9.
64. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, MacIntosh D, et al. Human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody (adalimumab) in Crohn's disease: the CLASSIC-I trial. *Gastroenterology.* 2006 Feb;130(2):323–333; quiz 591.
65. Jilani NZ, Akobeng AK. Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P et al. *Gastroenterology* 2007;132:52-65. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008 Feb;46(2):226–7.
66. Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel J-F, Panaccione R, et al. Adalimumab induction therapy for Crohn disease previously treated with infliximab: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* 2007 Jun 19;146(12):829–38.
67. Koder S, Repnik K, Ferkolj I, Pernat C, Skok P, Weersma RK, et al. Genetic polymorphism in ATG16L1 gene influences the response to adalimumab in Crohn's disease patients. *Pharmacogenomics.* 2015;16(3):191–204.
68. Gisbert JP, Panés J. Loss of response and requirement of infliximab dose intensification in Crohn's disease: a review. *Am. J. Gastroenterol.* 2009 Mar;104(3):760–7.
69. Allez M, Karmiris K, Louis E, Van Assche G, Ben-Horin S, Klein A, et al. Report of the ECCO pathogenesis workshop on anti-TNF therapy failures in inflammatory bowel diseases: Definitions, frequency and pharmacological aspects. *J. Crohns Colitis.* 2010 Oct;4(4):355–66.

70. Colombel J-F, Feagan BG, Sandborn WJ, Van Assche G, Robinson AM. Therapeutic drug monitoring of biologics for inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel Dis.* 2012 Feb;18(2):349–58.
71. Papamichael K, Van Stappen T, Jairath V, Gecse K, Khanna R, D’Haens G, et al. Review article: pharmacological aspects of anti-TNF biosimilars in inflammatory bowel diseases. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015 Sep;n/a-n/a.
72. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Blank M, Zhou H, Davis HM. Pharmacokinetic properties of infliximab in children and adults with Crohn’s disease: a retrospective analysis of data from 2 phase III clinical trials. *Clin. Ther.* 2011 Jul;33(7):946–64.
73. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Ford J, Hernandez D, Johanns J, Hu C, et al. Population pharmacokinetic analysis of infliximab in patients with ulcerative colitis. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2009 Dec;65(12):1211–28.
74. Xu Z, Seitz K, Fasanmade A, Ford J, Williamson P, Xu W, et al. Population Pharmacokinetics of Infliximab in Patients With Ankylosing Spondylitis. *J. Clin. Pharmacol.* 2008 Jun;48(6):681–95.
75. Maria Teresa Arias, Isabelle Cleynen, Karolien Claes, David Drobne, Ann Gils, Matthias Jürgens, Marc Ferrante, Vera Ballet, Gert A. Van Assche, Paul J. Rutgeerts, Severine Vermeire. The Role of FC Gamma Receptor (FCGR) Mutations in the Response to Infliximab in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 2011; 140(5) (Suppl 1) S-1.
76. Seow CH, Newman A, Irwin SP, Steinhart AH, Silverberg MS, Greenberg GR. Trough serum infliximab: a predictive factor of clinical outcome for infliximab treatment in acute ulcerative colitis. *Gut.* 2010 Jan 1;59(1):49–54.
77. Arias MT, Van de Casteele N, Drobne D, Ferrante M, Cleynen I, Ballet V, et al. OP10 Importance of trough levels and antibodies on the long-term efficacy of infliximab therapy in ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis.* 2012 Feb;6:S5.
78. Fasanmade AA, Adedokun OJ, Olson A, Strauss R, Davis HM. Serum albumin concentration: a predictive factor of infliximab pharmacokinetics and clinical response in patients with ulcerative colitis. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 2010 May;48(5):297–308.
79. Dotan I, Ron Y, Yanai H, Becker S, Fishman S, Yahav L, et al. Patient factors that increase infliximab clearance and shorten half-life in inflammatory bowel disease: a population pharmacokinetic study. *Inflamm. Bowel Dis.* 2014 Dec;20(12):2247–59.
80. Gremese E, Carletto A, Padovan M, Atzeni F, Raffeiner B, Giardina AR, et al. Obesity and reduction of the response rate to anti-tumor necrosis factor α in rheumatoid arthritis: an approach to a personalized medicine. *Arthritis Care Res.* 2013 Jan;65(1):94–100.

81. Ferrante M, Vermeire S, Fidder H, Schnitzler F, Noman M, Van Assche G, et al. Long-term outcome after infliximab for refractory ulcerative colitis. *J. Crohns Colitis*. 2008 Sep;2(3):219–25.
82. Brandse JF, van den Brink GR, Wildenberg ME, van der Kleij D, Rispens T, Jansen JM, et al. Loss of Infliximab Into Feces Is Associated With Lack of Response to Therapy in Patients With Severe Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2015 Aug;149(2):350–355.e2.
83. Hanauer SB, Wagner CL, Bala M, Mayer L, Travers S, Diamond RH, et al. Incidence and importance of antibody responses to infliximab after maintenance or episodic treatment in Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2004 Jul;2(7):542–53.
84. 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. *N. Engl. J. Med.* 2003 Feb 13;348(7):601–8.
85. Vermeire S, Noman M, Van Assche G, Baert F, D'Haens G, Rutgeerts P. Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut*. 2007 Sep;56(9):1226–31.
86. Farrell RJ, Alsahli M, Jeen Y-T, Falchuk KR, Peppercorn MA, Michetti P. Intravenous hydrocortisone premedication reduces antibodies to infliximab in Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2003 Apr;124(4):917–24.
87. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, Fedorak RN, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* 2004 Feb 26;350(9):876–85.
88. Vande Casteele N, Gils A, Singh S, Ohrmund L, Hauenstein S, Rutgeerts P, et al. Antibody response to infliximab and its impact on pharmacokinetics can be transient. *Am. J. Gastroenterol.* 2013 Jun;108(6):962–71.
89. Vande Casteele N, Breynaert C, Vermeire S, Rutgeerts PJ, Gils A, Van Assche G. Incidence of acute severe infusion reactions to infliximab depends on definition used rather than assay: Letters to the Editors. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2011 Aug;34(3):401–3.
90. Baert F, Drobne D, Gils A, Casteele NV, Hauenstein S, Singh S, et al. Early Trough Levels and Antibodies to Infliximab Predict Safety and Success of Re-initiation of Infliximab Therapy. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2014 Jan 28;

91. Ben-Horin S, Yavzori M, Katz L, Kopylov U, Picard O, Fudim E, et al. The immunogenic part of infliximab is the F(ab')₂, but measuring antibodies to the intact infliximab molecule is more clinically useful. *Gut*. 2011 Jan 1;60(1):41–8.
92. Van Assche G, Magdelaine-Beuzelin C, D'Haens G, Baert F, Noman M, Vermeire S, et al. Withdrawal of immunosuppression in Crohn's disease treated with scheduled infliximab maintenance: a randomized trial. *Gastroenterology*. 6;134(1528–0012 (Electronic)):1861–8.
93. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van AG, D' Haens G, Carbonez A, et al. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease. *N.Engl.J.Med*. 03 2;348(1533–4406 (Electronic)):601–8.
94. Vermeire S, Noman M, Van Assche G, Baert F, D'Haens G, Rutgeerts P. Effectiveness of concomitant immunosuppressive therapy in suppressing the formation of antibodies to infliximab in Crohn's disease. *Gut*. 9;56(0017–5749 (Print)):1226–31.
95. Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, Vasiliauskas E, Hanauer SB, Present DH, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumor necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1999 Oct;117(4):761–9.
96. Toruner M, Loftus EV, Harmsen WS, Zinsmeister AR, Orenstein R, Sandborn WJ, et al. Risk factors for opportunistic infections in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 4;134(1528–0012 (Electronic)):929–36.
97. Kotlyar DS, Osterman MT, Diamond RH, Porter D, Blonski WC, Wasik M, et al. A systematic review of factors that contribute to hepatosplenic T-cell lymphoma in patients with inflammatory bowel disease. *Clin.Gastroenterol.Hepatol*. 1;9(1542–7714 (Electronic)):36–41.
98. Osterman MT, Sandborn WJ, Colombel J-F, Robinson AM, Lau W, Huang B, et al. Increased Risk of Malignancy with Adalimumab Combination Therapy, Compared to Monotherapy, for Crohn's Disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 Dec [cited 2014 Jan 23]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851301809X>
99. Sokol H, Seksik P, Carrat F, Nion-Larmurier I, Vienne A, Beaugerie L, et al. Usefulness of co-treatment with immunomodulators in patients with inflammatory bowel disease treated with scheduled infliximab maintenance therapy. *Gut*. 10;59(1468–3288 (Electronic)):1363–8.
100. Spekhorst LM, Visschedijk MC, Alberts R, Festen EA, van der Wouden E-J, Dijkstra G, et al. Performance of the Montreal classification for inflammatory bowel diseases. *World J. Gastroenterol. WJG*. 2014 Nov 7;20(41):15374–81.

101. Vande Casteele N, Buurman DJ, Sturkenboom MGG, Kleibeuker JH, Vermeire S, Rispens T, et al. Detection of infliximab levels and anti-infliximab antibodies: a comparison of three different assays. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2012 Oct;36(8):765–71.
102. Breynaert C, Ferrante M, Fidder H, van SK, Noman M, Ballet V, et al. Tolerability of shortened infliximab infusion times in patients with inflammatory bowel diseases: a single-center cohort study. *Am.J.Gastroenterol.* 4;106(1572–0241 (Electronic)):778–85.
103. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and the, R Development Core Team (2012). nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. R package version 3.1-105.
104. R Development Core Team (2012). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria;
105. Sands BE, Blank MA, Patel K, van Deventer SJ, ACCENT II Study. Long-term treatment of rectovaginal fistulas in Crohn's disease: response to infliximab in the ACCENT II Study. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2004 Oct;2(10):912–20.
106. Information for trough level determination sheet – Faculteit Farmaceutische Wetenschappen KU Leuven [Internet]. [cited 2015 Dec 29]. Available from: <https://pharm.kuleuven.be/biotech/TherandDiagAnt/infliximab-adalimumab-hoofdfolder/information-for-trough-level-determination-sheet>
107. Vande Casteele N, Ferrante M, Van Assche G, Ballet V, Compennolle G, Van Steen K, et al. Trough Concentrations of Infliximab Guide Dosing for Patients With Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology.* 2015 Jun;148(7):1320–1329.e3.
108. Jürgens M, Mahachie John JM, Cleynen I, Schnitzler F, Fidder H, van Moerkercke W, et al. Levels of C-reactive protein are associated with response to infliximab therapy in patients with Crohn's disease. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* 2011 May;9(5):421–427.e1.
109. Ungar B, Levy I, Yavne Y, Yavzori M, Picard O, Fudim E, et al. Optimizing anti-TNF α therapy: Serum Levels of Infliximab and Adalimumab Associate With Mucosal Healing in Patients with Inflammatory Bowel Diseases. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* [Internet]. 2015 Oct [cited 2015 Dec 28]; Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1542356515014925>
110. Ben-Horin S, Chowers Y, Ungar B, Kopylov U, Loebstein R, Weiss B, et al. Undetectable anti-TNF drug levels in patients with long-term remission predict successful drug withdrawal. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2015 Aug;42(3):356–64.

111. Louis E, Mary J-Y, Vernier-Massouille G, Grimaud J-C, Bouhnik Y, Laharie D, et al. Maintenance of remission among patients with Crohn's disease on antimetabolite therapy after infliximab therapy is stopped. *Gastroenterology*. 2012 Jan;142(1):63–70.e5; quiz e31.
112. Brandse JF, Vos LMC, Jansen J, Schakel T, Ponsioen CIJ, van den Brink GR, et al. Serum Concentration of Anti-TNF Antibodies, Adverse Effects and Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease in Remission on Maintenance Treatment. *J. Crohns Colitis*. 2015 Nov;9(11):973–81.
113. Hendler SA, Cohen BL, Colombel J-F, Sands BE, Mayer L, Agarwal S. High-dose infliximab therapy in Crohn's disease: clinical experience, safety, and efficacy. *J. Crohns Colitis*. 2015 Mar;9(3):266–75.
114. Wang S-L, 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 Aug 31;382(1–2):177–88.
115. Ungar B, Anafy A, Yanai H, Ron Y, Yavzori M, Picard O, et al. Significance of low level infliximab in the absence of anti-infliximab antibodies. *World J. Gastroenterol*. 2015 Feb 14;21(6):1907–14.
116. Kopylov U, Mazor Y, Yavzori M, Fudim E, Katz L, Coscas D, et al. Clinical utility of antihuman lambda chain-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) versus double antigen ELISA for the detection of anti-infliximab antibodies. *Inflamm. Bowel Dis*. 2012 Sep;18(9):1628–33.
117. 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. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc*. 2013 Apr;11(4):444–7.