

Piccola storia della terapia antireumatica - VII. I farmaci "biologici"

A short history of anti-rheumatic therapy - VII. Biological agents

G. Pasero¹, P. Marson², B. Gatto³

¹Università di Pisa;

²Unità di Aferesi Terapeutica, U.O.C. Immunotrasfusionale, Azienda Ospedale Università di Padova;

³Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Padova

SUMMARY

The introduction of biological agents has been a major turning-point in the treatment of rheumatic diseases, particularly in rheumatoid arthritis. This review describes the principle milestones that have led, through the knowledge of the structure and functions of nucleic acids, to the development of production techniques of the three major families of biological agents: proteins, monoclonal antibodies and fusion proteins. A brief history has also been traced of the cytokines most involved in the pathogenesis of inflammatory rheumatic diseases (IL-1 and TNF) and the steps which have led to the use of the main biological drugs in rheumatology: anakinra, infliximab, adalimumab, etanercept and rituximab.

Reumatismo, 2011; 63 (3): 185-194

Negli ultimi due decenni si è verificato in reumatologia, così come in altre branche della medicina, l'avvento - a dir poco epocale e destinato, con ogni verosimiglianza, ad avere un grande sviluppo futuro - dei *farmaci biologici*. Si tratta di farmaci che, invece di essere accomunati, come si fa abitualmente, per la loro azione farmacodinamica (antiflogistici, immunodepressori, ecc.), la loro struttura chimica (cortisonici, antiflogistici non steroidei) o la loro principale indicazione terapeutica (farmaci dell'artrite reumatoide, della gotta, dell'osteoporosi, ecc.), sono definiti in base alla loro tecnica di produzione, che non è né estrattiva né sintetica, ma è frutto dell'attività di strutture viventi (batteri, cellule in cultura).

I farmaci biologici, comunque, non vanno confusi con i farmaci di origine animale, che sono invece estrattivi o sintetici.

Ovviamente non possiamo affrontare l'analisi dell'enorme letteratura che negli

ultimi anni si è accumulata sull'argomento - che implica, tra l'altro, conoscenze d'ingegneria genetica, assai lontane dal patrimonio culturale dei reumatologi - per cui ci limiteremo a ricordare alcune tappe "storiche" che hanno portato alla realizzazione di questi farmaci, per citare quelli che hanno un ruolo nella terapia delle malattie reumatiche, in particolare dell'artrite reumatoide (AR).

Trattandosi di farmaci disponibili da pochissimi anni e ancora oggetto di studio, non si è neppure tentato di esser esaustivi - il numero dei farmaci biologici aumenta continuamente! - e forse sarebbe stato corretto aspettare ancora qualche tempo prima di includerli in uno dei capitoli di questa "*Piccola storia della terapia anti-reumatica*": lo si è fatto lo stesso, perché essi rappresentano una tappa, che, com'è già stato sottolineato, non è esagerato definire epocale nella storia della farmacoterapia reumatologica, ma anche perché la sto-

Indirizzo per la corrispondenza:
Dott. Piero Marson
Via delle Melette, 8/1
35138 Padova
E-mail: piero.marson@sanita.padova.it

ria, a ben riflettere, è un “continuum” che non ammette interruzioni cronologiche.

Prima, però, di affrontare la storia dei farmaci biologici e del loro impiego in reumatologia è opportuno accennare sinteticamente alla *storia del DNA*, struttura che è al centro di tutte le implicazioni biologiche relative a questi farmaci.

Gli acidi nucleici sono stati scoperti nel 1869 dallo svizzero Johann Friedrich Miescher (Fig. 1), allora studente a Tubinga, in Germania, il quale individuò nel nucleo dei globuli bianchi, che prelevava dal pus delle ferite chirurgiche (nel prosieguo delle ricerche, una volta rientrato in Svizzera, utilizzò gli spermatozoi di salmone, a quel tempo molto diffuso nel Reno), un composto chimico, che aveva le caratteristiche di un acido, era ricco di fosforo ed era organizzato in molecole di grosse dimensioni: lo denominò “nucleina” (1), denominazione che il suo allievo Richard Altmann sostituirà poi con “acido nucleico” (2).

Nel 1909 Phoebus Aaron Levene (3), del Rockefeller Institute di New York, accertò che gli acidi nucleici, in realtà, sono due: uno, presente solo nel nucleo, che corrispondeva al composto identificato da Miescher, l'altro presente anche nel citoplasma, che anzi n'è più ricco: poiché la componente zuccherina, che rientra nella loro composizione chimica, è rappresentata nel primo dal desossiribosio e nel secondo dal ribosio, furono denominati rispettivamente DNA (deoxyribonucleic acid) e RNA (ribonucleic acid).

L'interesse per gli acidi nucleici fu stimolato quando, nel 1944, Oswald Theodor Avery, Colin MacLeod e Maclyn McCarty (4) riuscirono a trasmettere un carattere da un batterio ad un altro attraverso il solo acido nucleico, dimostrando così che i geni sono costituiti da acidi nucleici.

Sembra però che già Miescher avesse intuito la grande importanza di questi composti, in quanto in una lettera scritta pochi anni prima di morire aveva ipotizzato che le caratteristiche di queste macromolecole potevano essere idonee a contenere il patrimonio ereditario (5).

Nel 1953 fu poi chiarita la struttura del DNA: l'americano James D. Watson e l'in-



Figura 1 - Johann Friedrich Miescher (1844-1895).

glese Francis H. Crick (6) stabilirono, infatti, che il DNA è costituito da una lunga sequenza di nucleotidi, ognuno dei quali è formato da acido fosforico, da uno zucchero ed una base purinica o pirimidinica, e che la sua conformazione spaziale è quella di una struttura a doppia elica.

Il ruolo del DNA nella sintesi delle proteine (il ruolo dell'RNA, la cui sequenza è speculare a quella del DNA, è quello di trasmettere il “messaggio” dai geni, dove è presente il DNA, ai ribosomi, gli organuli citoplasmatici deputati alla sintesi delle proteine, da cui il termine di “RNA messaggero”) fu chiarito all'inizio degli anni '60, sempre dallo stesso Crick, assieme a Leslie Barnett, Sidney Brenner e Richard J Watts-Tobin (7), i quali dimostrarono che una diversa tripletta di nucleotidi codificava la sintesi di uno specifico aminoacido. Infine, nel 1966 gli americani Marshall Warren Nirenberg (8) e Har Gobind Khorana (9), quest'ultimo cittadino statunitense ma indiano di nascita, riuscirono ad interpretare quello che fu definito il “codice genetico”, cioè tutte le triplette nucleotidiche, che codificano la sintesi dei singoli aminoacidi.

Nel frattempo, venivano identificati gli enzimi che intervengono nel metabolismo

degli acidi nucleici: nel 1958, l'équipe di Alfred Kornberg (10) aveva purificato la polimerasi I, un enzima capace di produrre *in vitro* molecole di DNA, e nel 1970 Hamilton O. Smith e Kent W. Wilcox (11) avevano identificato il primo "enzima di restrizione", capace di tagliare la molecola di DNA a livello di siti specifici di riconoscimento.

Questi enzimi, insieme ad altri isolati negli anni successivi, si sono poi rivelati gli strumenti indispensabili per tutte le manipolazioni che oggi è possibile operare sulle molecole di DNA, cioè per praticare quella che viene definita "ingegneria genetica", secondo una terminologia entrata in uso nei primi anni '70 e sempre più diffusasi dopo la "Conferenza sul DNA ricombinante" tenutasi ad Asilomar, in California, nel 1975 (12). Molto schematicamente, possiamo anzitutto distinguere *tre famiglie di farmaci biologici*:

- a) *proteine*, prodotte di norma dalle sequenze codificanti umane e capaci di esercitare, in soggetti che ne sono carenti o a concentrazioni non realizzabili in condizioni fisiologiche, effetti terapeuticamente utili. Oggi è disponibile un numero crescente di farmaci biologici di questo tipo, sia immo-
dificati che coniugati a macromolecole come il polietilenglicole (PEG): citochine (interferone, *colony stimulating factors* o CSF, ecc), ormoni (insulina, ormone della crescita, eritropoietina, teriparatide), fattori della coagulazione (fattore VII, fattore VIII, fattore IX);
- b) proteine caratterizzate dalla desinenza in "mab", ovvero *anticorpi monoclonali* (MoAb) volti a neutralizzare citochine (ad esempio, il TNF α) o *markers* di superficie dei linfociti (ad esempio, il CD4, *marker* dei linfociti *helper-inducer*); le citochine ed i *markers* di superficie dei linfociti hanno un ruolo molto importante nel meccanismo di molte malattie reumatiche, soprattutto nell'artrite reumatoide e in altri reumatismi infiammatori;
- c) prodotti caratterizzati dalla desinenza in "cept" e che, tra l'altro, hanno un prevalente interesse reumatologico,

rappresentati da *proteine di fusione*, cioè derivanti dalla fusione di una proteina (recettore solubile) con la frazione costante (Fc) di una immunoglobulina G umana, che ne assicura il trasporto verso la sede d'azione.

Le due *biotecnologie* fondamentali per la produzione dei farmaci biologici sono, in generale, la tecnica del DNA ricombinante, utilizzata per i farmaci biologici del primo e del terzo gruppo, e l'insieme delle tecniche per la produzione di anticorpi monoclonali (MoAb), utilizzata per i farmaci biologici del secondo gruppo, in particolare per i nuovi MoAb completamente umani (*fully human*).

La *tecnica del DNA ricombinante* è un procedimento molto complesso, che qui non è il caso di approfondire: semplificando al massimo, basti sottolineare che la conoscenza delle sequenze nucleotidiche del DNA, il ruolo del DNA nella sintesi proteica, la constatazione che ad ogni tripletta di nucleotidi corrisponde uno specifico aminoacido e, infine, la possibilità di "tagliare" la molecola di DNA e di "ricombinare" i singoli spezzoni tra loro, consentono di modificare il DNA di una struttura vivente capace di una proliferazione illi-



Figura 2 - Paul Berg (Premio Nobel per la Chimica, 1980).

mitata in coltura (lievito, cellula di mammifero in coltura o batterio), in modo da renderla idonea a promuovere la sintesi di un determinato polipeptide o proteina di struttura relativamente semplice. Questa tecnica ha preso le mosse, più di 30 anni fa, dalle ricerche di Paul Berg (Fig. 2) e Annie Chang dell'Università di Stanford e di Herbert Boyer dell'Università di San Francisco in California (13).

Nel 1977 nacque la prima industria specializzata in ingegneria genetica (Genentech), e nel 1978 fu preparato con questa tecnica un analogo della somatostatina (14), la prima proteina "ricombinante" disponibile per uso terapeutico.

La *tecnica di produzione di MoAb* fu realizzata nel 1975 dal tedesco Georges J. Köhler e dall'argentino César Milstein (15), e l'anno seguente dall'équipe di David H. Margulies (16). Essa consiste nel realizzare un ibridoma, cioè una linea cellulare derivante dalla fusione in coltura di un linfocita B normale (di regola di provenienza splenica) con una cellula tumorale (inizialmente una cellula di mieloma murino) e stimolarlo poi con un antigene specifico.

I linfociti B hanno la proprietà di produrre un solo tipo di anticorpi specifici per l'antigene, le cellule tumorali hanno una capacità di moltiplicazione illimitata, dando origine ad una linea cellulare (clone) omogenea, da cui il termine "monoclonale".

La tecnica è stata progressivamente perfezionata. I primi MoAb, infatti, erano d'origine murina e davano luogo abbastanza rapidamente ad una perdita d'attività per la formazione di anticorpi anti-anticorpo murino (*human anti-mouse antibody*, generalmente indicati con la sigla HAMA). Mediante un procedimento abbastanza complesso d'ingegneria genetica si passò dapprima agli anticorpi "chimerici", nei quali il sito attivo dell'immunoglobulina (Fab e sua regione variabile) è d'origine murina, mentre il sito di supporto (Fc) è umano (17).

Successivamente si è pervenuti all'allestimento di MoAb completamente "umanizzati", nei quali solo la regione ipervariabile del Fab è di origine murina, sì che

l'induzione di una resistenza viene praticamente evitata (18). La nuova frontiera nel campo degli MoAb è rappresentata da quelli completamente umani, ottenuti con due tipi di tecniche: la prima, che utilizza metodiche di tipo combinatoriale *in vitro* come il *phage display*, e la seconda, che utilizza topi transgenici in grado di produrre, quando immunizzati con un antigene, anticorpi monoclonali umani (19).

Entrambe queste tecniche consentono la produzione, in cellule di mammifero in coltura, di immunoglobuline perfettamente uguali tra loro e soprattutto di mantenerla per un tempo illimitato, attraverso un numero infinito di divisioni cellulari, sì da permetterne la produzione anche a livello industriale.

Le caratteristiche principali dei farmaci biologici sono, infatti, la purezza e la specificità. I polipeptidi prodotti con la tecnica del DNA ricombinante sono decisamente più puri degli analoghi polipeptidi d'origine estrattiva, anche perché è possibile selezionare la sequenza aminoacidica biologicamente attiva e non immunogena, com'è avvenuto, ad esempio, nel caso del teriparatide. Sono inoltre possibili vari tipi di modifiche atte ad aumentare o ad eliminare le risposte effettrici tipiche degli anticorpi (20).

I MoAb sono decisamente più specifici degli immunodepressori, anche perché è inimmaginabile che un immunodepressore, sia pure il più selettivo, possa avere un unico bersaglio.

Altra caratteristica propria dei farmaci biologici è la quasi totale mancanza di effetti tossici perlomeno al confronto con i farmaci antireumatici "tradizionali", in quanto gli eventi indesiderati sono le possibili e non sempre prevedibili conseguenze di un iperdosaggio (nel caso dei farmaci agonisti) o della neutralizzazione del bersaglio (nel caso dei farmaci antagonisti).

Rimane ancora aperta la problematica dell'immunogenicità di molti farmaci biologici, che ne può ridurre l'efficacia e la potenza, e rappresenta senz'altro un terreno sul quale l'industria delle bioterapie dovrà intervenire nei prossimi anni (21).

Prima di passare in rassegna i principali

farmaci biologici utilizzati in reumatologia è però opportuno accennare anche alla *storia delle citochine*, in quanto la maggior parte di questi farmaci sono citochine o antagonisti delle citochine.

Le *citochine* sono proteine solubili, rilasciate dalle cellule, soprattutto dai T-linfociti e dai monociti-macrofagi, ed attive nel regolare la proliferazione, la differenziazione e la funzione di altre cellule, in particolare di quelle implicate nel processo infiammatorio e nella reazione immunitaria: linfocine, se prodotte dai T-linfociti, monochine, se prodotte dai monociti-macrofagi, interleuchine, se responsabili delle interazioni tra cellule, fattori di crescita o CSF (*colony stimulating factors*), se atte a promuovere la proliferazione di una determinata linea cellulare. Il termine "citochine" fu proposto nel 1974 da Stanley Cohen (Fig. 3) (22), e la loro nomenclatura fu definita nel 1979 al *Second International Cytokine Workshop* di Ermatingen in Svizzera (23), ma alcune di esse erano state già identificate in base alle loro proprietà biologiche.

Se non si considerano, infatti, le indagini pionieristiche sul TNF, cui accenneremo più avanti, il primo riferimento a quelle

che saranno poi le citochine si deve, infatti, a Valy Menkin (24), che nel 1944 suggerì che la febbre fosse indotta da un fattore solubile, che denominò "piressina", presente negli essudati infiammatori, anche se fu poi accertato che le sue preparazioni erano contaminate da endotossine batteriche. Il "pirogeno endogeno", poi identificato con l'interleuchina-1 (IL-1), fu isolato nel 1953 dai leucociti ad opera di Ivan L. Bennett jr. e Paul B. Beeson (25), mentre sempre nel 1953 un *nerve growth factor*, attivo nel promuovere la crescita delle strutture nervose, fu identificato da Rita Levi Montalcini e Victor Hamburger (26), e nel 1957 Alick Isaac e Jean Lindenmann (27) identificarono l'"interferone", così denominato perché "interferisce" con la replicazione dei virus. Il numero delle citochine conosciute è oggi molto elevato (28), ma quelle delle quali ci interessa qui ricostruire la storia sono sostanzialmente due: l'IL-1 e il TNF (*tumor necrosis factor*), che hanno una particolare rilevanza nella patogenesi dell'artrite reumatoide (29).

L'IL-1 è, appunto, una delle citochine già identificate per le loro proprietà biologiche. È stato già ricordato il "pirogeno endogeno" (30), così denominato perché implicato nella genesi della febbre, ma sono stati poi identificati con l'IL-1 il *lymphocyte blastogenic factor*, descritto da Shinpei Kasakura e Louis Lowenstein (31) nel 1965, il *lymphocyte activating factor* (LAF), descritto da Iral Gery e Byron H. Waksman (32) nel 1972 e il *mononuclear cell factor* (MCF), descritto dall'*équipe* dello svizzero Jean-Michel Dayer (33) nel 1977, tutti implicati nella proliferazione e nell'attivazione dei timociti maturi, ed anche l'*osteoclastic activating factor*, descritto dall'*équipe* di John E. Horton (34), sempre nel 1972, implicato nel riassorbimento dell'osso nel corso di reumatismi infiammatori. L'IL-1 esercita però molte altre attività correlate con i processi flogistici e, pertanto, coinvolte nella patogenesi dei reumatismi infiammatori e nel danno tessutale indotto da queste malattie.

Il *tumor necrosis factor* (TNF), del quale esistono varie forme (quello che qui ci interessa è il TNF α) e che, come vedremo,

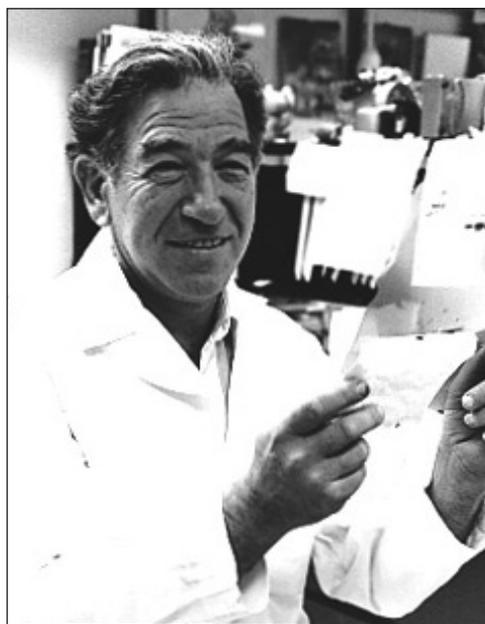


Figura 3 - Stanley Cohen (Premio Nobel per la Medicina, 1986).

è il bersaglio dei primi MoAb commercializzati come farmaci, è una monochina, identificata dall'*équipe* di Lawrence Helson (35) nel 1974 e così denominata perché capace di indurre nell'animale una lisi delle cellule tumorali, ha rivelato poi di possedere varie altre attività e riveste un ruolo centrale nella patogenesi dell'artrite reumatoide (36). Vi sono però dei precedenti storici interessanti (37): addirittura nel 1868 il tedesco Wilhelm Busch descrisse la regressione spontanea di tumori in seguito a infezioni batteriche acute, esperienza poi ripetuta da Paul von Bruns, nel 1888, il quale trattò pazienti neoplastici inoculando streptococchi e provocando così infezioni cutanee (erisipela).

Nel 1891 un chirurgo di New York, William Bradley Coley (Fig. 4), iniettò ad alcuni malati terminali di tumore un *cocktail* di batteri Gram + e Gram -, osservando una necrosi emorragica all'interno della neoplasia (38) ed aprendo così nuove prospettive per una terapia dei tumori, per così dire, "naturale", attraverso le cosiddette *Coley's toxins*.

Nei primi anni '40 del XX secolo alcuni ricercatori osservarono lo stesso fenomeno iniettando a degli animali con tumori sperimentali un lipopolisaccaride purifica-

to di *Serratia marcescens* (39) e nel 1962 Murray J. Shear ed i suoi collaboratori del *National Cancer Institute* di Bethesda (40) riuscirono ad ottenere un risultato analogo iniettando non il polisaccaride, ma il sangue di animali ai quali era stato inoculato in precedenza il lipopolisaccaride. Oggi sappiamo che le infezioni batteriche ed i lipopolisaccaridi sono tra i più potenti induttori del TNF.

A questo punto possiamo affrontare, molto sinteticamente, la storia dell'impiego in reumatologia dei farmaci biologici. Quando si affronta l'argomento, si pensa istintivamente al trattamento dell'AR, cosa che non è esatta, sia perché l'impiego di questi farmaci si è poi esteso ad altre malattie reumatiche infiammatorie e immunomediate, in particolare i reumatismi cronici dell'infanzia (41) e le spondiloartriti (42), sia perché, soprattutto tra i farmaci del primo gruppo, alcuni hanno indicazioni reumatologiche diverse.

Tra le *proteine prodotte con metodo biologico* alcune hanno un impiego marginale, ma non trascurabile, nelle malattie reumatiche: possiamo ricordare l'interferone ricombinante, utilizzato nella crioglobulinemia mista (43, 44), l'eritropoietina, proposta per la terapia dell'anemia dell'AR (45) e il CSF per i granulociti (G-CSF), impiegato nelle neutropenie indotte dai farmaci immunodepressori (46), ma anche nel trattamento topico delle ulcere cutanee della sclerodermia (47).

Maggiore importanza hanno, invece, il *teriparatide*, peptide ricombinante contenente i primi 34 aminoacidi che rappresentano la sequenza biologicamente attiva dell'ormone paratiroideo umano, per questo impiegato nella terapia dell'osteoporosi e, per quanto riguarda l'AR, l'*anakinra*. Si tratta di un antagonista per il recettore dell'IL-1 (IL1-Ra), una sostanza naturale, identificata dall'*équipe* di William P. Arend nelle urine nel 1987 (48) ed in seguito sintetizzata biologicamente.

L'IL1-Ra ricombinante differisce da quella naturale solo per l'aggiunta di una metionina N-terminale (49), è stata sperimentata nell'AR dal 1996 (50) ed è disponibile in Italia dal 2001.

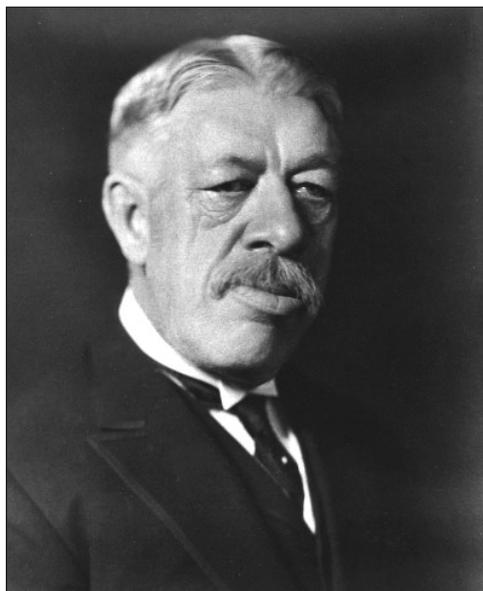


Figura 4 - William Bradley Coley (1862-1936).

I primi *anticorpi monoclonali* utilizzati in reumatologia furono quelli che avevano come bersaglio un *marker* di superficie dei linfociti T, l'antigene CD4: i linfociti CD4+ erano stati identificati fin dal 1975 (51) come quelli più rappresentati negli infiltrati reumatoidi e costituiscono, tra l'altro, anche il principale bersaglio della ciclosporina, che proprio in quegli anni cominciava a porsi all'attenzione come immunosoppressore.

I primi MoAb anti-CD4 sono stati sperimentati in modelli animali di artrite nel 1985 (52) e nell'uomo nel 1987 (53). I risultati, inizialmente promettenti, non hanno avuto però conferma nella sperimentazione a lungo termine, per cui questo filone di ricerca non ha avuto seguito.

Sempre in quegli anni vi furono altri tentativi di terapia con MoAb nell'AR (54), come ad esempio quelli anti-CD25 (55), anti-MHC (56), anti-CDw52 (57), anti-CD5 (58) ed anti-CD54 (59), ma non si è mai andati al di là di segnalazioni occasionali.

Il bersaglio, invece, che finora ha portato ai risultati più concreti nelle malattie reumatiche e in particolare nell'AR è stato il TNF α , una citochina della quale abbiamo già ricordato precedenti storici e che si ritiene avere un ruolo centrale nella patogenesi della malattia.

Nei suoi confronti sono stati sviluppati due MoAb, commercializzati ormai da alcuni anni: un MoAb chimerico (*infliximab*), la cui sperimentazione ha avuto inizio nel 1993 (60) e che è disponibile dal 1999 e un MoAb completamente umano (*adalimumab*), ottenuto mediante tecniche di *phage display* (61), la cui sperimentazione ha avuto inizio nel 2002 (62) ed è disponibile dal 2003.

Un nuovo MoAb completamente umano anti-TNF ottenuto mediante la tecnologia dei topi transgenici è il *golimumab*, approvato recentemente in terapia per il trattamento dell'AR, dell'artrite psoriasica e della spondilite anchilosante (63). Un quarto agente anti-TNF, il *certolizumab pegol* (CIMZIA), è un Fab, quindi un frammento di anticorpo, ottenuto, in virtù del suo minore peso molecolare, per pro-

duzione in *E. coli*, seguita dalla coniugazione con una catena di PEG (64).

Il quinto agente anti-TNF oggi disponibile, l'*etanercept*, non è, come si vedrà, un MoAb, ma una proteina di fusione.

Un impiego più marginale in reumatologia hanno altri MoAb.

Il *rituximab*, un MoAb chimerico, rivolto contro l'antigene di superficie dei B-linfociti CD20 è stato sperimentato fin dal 1994 (65) ed è utilizzato in varie indicazioni ematologiche (linfomi non-Hodgkin, plasmocitoma, macroglobulinemia, porpora trombocitopenica idiopatica, anemie emolitiche autoimmuni), ma è stato sperimentato, sia pure limitatamente, anche nell'AR (66) e nel lupus eritematoso sistemico (67).

Un nuovo farmaco approvato recentemente per il trattamento dell'AR è il *tocilizumab*, un anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il recettore dell'IL-6, che impedirebbe quindi l'esplicarsi dell'attività biologica di questa importante citochina proinfiammatoria (68).

Tra le *proteine di fusione* troviamo, anzitutto, l'*etanercept*, che è un agente anti-TNF, in quanto è una proteina derivante dalla fusione tra il recettore solubile per il TNF, isolato dalle urine nel 1989 (69) e prodotto mediante la tecnica del DNA ricombinante (70) e la porzione Fc di un'immunoglobulina umana, che ne assicura il trasporto in circolo, ove lega il TNF α , bloccandone l'interazione con i suoi recettori cellulari.

L'*etanercept*, è stato sperimentato nell'AR a partire dal 1996 (71) ed è disponibile dal 1999.

L'*abatacept* e il quasi identico *belatacept*, prodotti di fusione con l'Fc di una IgG1 umana di un antigene associato ai T-linfociti citotossici (CTLA-4 o *cytotoxic-T-lymphocyte associated antigen 4*), espresso sulla superficie dei linfociti T dopo la loro attivazione e capace di inibire la loro costimolazione da parte della *antigen presenting cells*. Questi farmaci, definiti "bloccanti della costimolazione" sono stati già sperimentati con successo nell'AR (72), anche resistente ai MoAb anti-TNF (73).

RIASSUNTO

L'introduzione dei farmaci biologici ha rappresentato una svolta epocale nella terapia delle malattie reumatiche, e in particolare dell'artrite reumatoide. In questa rassegna vengono descritte le principali tappe che hanno condotto, attraverso le conoscenze sulla struttura e sulle funzioni degli acidi nucleici, allo sviluppo delle tecniche di produzione delle tre principali famiglie di farmaci biologici (proteine, anticorpi monoclonali e proteine di fusione). Viene anche tracciata una breve storia delle citochine maggiormente implicate nella patogenesi delle reumatoartropatie infiammatorie (IL-1 e TNF) e delle fasi che hanno portato all'utilizzo in reumatologia dei principali farmaci biologici (anakinra, infliximab, adalimumab, rituximab ed etanercept).

Parole chiave: Storia della reumatologia, farmaci biologici, anticorpi monoclonali, citochine.

Key words: History of rheumatology, biological agents, monoclonal antibodies, cytokines.

■ BIBLIOGRAFIA

- Miescher JF. Über die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. Hoppe-Seyler Med.-chem Untersuchungen 1871; 4:441-60. Citato da: Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. Dev Biol 2005; 278: 274-88.
- Altmann R. Über Nucleinsäuren. Arch f Anat Physiol, Physiologische Abteilung, Leipzig, 1889; 524-36.
- Levene PA. Über die Hefenucleinsäure. Biochem Zeit 1909; 17: 120-31.
- Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from pneumococcus type III. J Exp Med 1944; 79: 137-58.
- Judson HF. The eight day of creation. Markers of the revolution in biology. New York, Simon and Schuster, 1979.
- Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 1953; 171: 737-8.
- Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. Nature 1961; 192: 1227-32.
- Nirenberg M, Leder P, Bernfield R, Brimacombe R, Trupin J, Rottman F, O'Neil C. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. Proc Natl Acad Sci USA 1965; 53: 1161-8.
- Khorana H. Polynucleotide synthesis and the genetic code. Fed Proc 1965; 24: 1473-87.
- Lehman IR, Bessman MJ, Simms ED, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from Escherichia coli. J Biol Chem 1958; 233: 163-70 (degli stessi autori anche: Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. II. General properties of the reaction. J Biol Chem 1958; 233: 171-7).
- Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. J Mol Biol 1970; 51: 379-91.
- Barinaga M. Asilomar revisited: lessons for today? Science 2000; 287: 1584-5.
- Emery AEH. DNA ricombinante (traduzione italiana di A. Lombardi e G.A. Danieli). Padova, Piccin Editore, 1986.
- Vale W, Rivier J, Ling N, Brown M. Biologic and immunologic activities and applications of somatostatin analogs. Metabolism 1978; 27 (suppl 1):1391-401. Citato da: Pless J: From Somatostatin to Sandostatin®: history and chemistry. Digestion 1993; 54 (Suppl. 1): 7-8.
- Köhler JF, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256: 495-7 (riprodotto in J Immunol 2005; 174: 2453-5).
- Margulies DH, Kuehl WM, Scharff MD. Somatic cell hybridization of mouse myeloma cells. Cell 1976; 8: 405-15.
- Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, Oi VT. Chimeric human antibody molecule: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 6851-5.
- Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G. Reshaping human antibodies for therapy. Nature 1988; 332: 323-7.
- Marasco WA, Sui J. The growth and potential of human antiviral monoclonal antibody therapeutics. Nat Biotechnol 2007; 25: 1421-34.
- Strohl WR. Optimization of Fc-mediated effector functions of monoclonal antibodies. Curr Opin Biotechnol 2009; 20: 685-91.
- Strand V, Kimberly R, Isaacs JD. Biologic therapies in rheumatology: lessons learned, future directions. Nat Rev Drug Discov 2007; 6: 75-92.
- Cohen S, Bigazzi PE, Yoshida T. Similarities of T cell function in cell-mediated immunity and antibody production. Cell Immunol 1974; 12: 150-8. Citato da: Cohen S. Cytokine: more than a new word, a new concept proposed by Stanley Cohen thirty years ago. Cytokine 2004; 28: 242-7.

23. Proceedings of the Second International Lymphokine Workshop, Ermatingen, Switzerland, 1979 (de Weck A, Kristensen F, Landy M, eds). New York, Academic Press, 1980.
24. Menkin V. Chemical basis of fever. *Science* 1944; 100: 337-8.
25. Bennett IL jr, Beeson PB. Studies of the pathogenesis of fever. II. Characterization of fever-producing substances from polymorphonuclear leukocytes and from the fluid of sterile exudates. *J Exp Med* 1953; 98: 493-508.
26. Levi-Montalcini R, Hamburger V. A diffusible agent of mouse sarcoma producing hyperplasia of sympathetic ganglia and hyperneurotization of viscera in the chick embryo. *J Exp Zool* 1953; 123: 233-87.
27. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957, 147: 258-67.
28. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol* 2007; 37: S34-45.
29. Arend WF, Dayer JM. Inhibition of the production and effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 151-60.
30. Duff GW, Durum SK. The pyrogenic and mitogenic actions of interleukin-1 are related. *Nature* 1983; 304: 449-51.
31. Kasakura S, Lowenstein L. A factor stimulating DNA synthesis derived from the medium of leukocyte cultures. *Nature* 1965; 208: 794-5.
32. Gery I, Waksman BH. Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediators. *J Exp Med* 1972; 136: 143-55.
33. Dayer J-M, Graham R, Russell GG, Krane SM. Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor. *Science* 1977; 195: 181-3.
34. Horton JE, Raisz LG, Simmons HA, Oppenheim JJ, Mergenhagen SE. Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. *Science* 1972; 177: 93-5.
35. Helson L, Green S, Carswell E, Old LJ. Effect of tumor necrosis factor on cultured human melanoma cells. *Nature* 1974; 258: 731-2.
36. Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. TNF-alpha - a pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 1992; 31: 293-8.
37. Old LJ. Tumor necrosis factor (TNF). *Science* 1985; 230: 630-2.
38. McCarthy EF. The toxins of William B Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *Iowa Orthop J* 2006; 26: 154-8.
39. Dinarello CA, Moldawer LL: Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. Thousand Oaks (CA), Amgen, 1999: 60.
40. O'Malley WE, Achinstein B, Shear MJ. Action of bacterial polysaccharide on tumors. II. Damage of sarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide, and induced tolerance. *J Nat Cancer Inst* 1962; 29: 1169-75 (riprodotto in *Nutr Rev* 1988; 46: 389-91).
41. Lovell DJ, Giannini EH, Reiff A, Cawkwell GD, Silverman ED, Nocton JJ, Stein LD, Gedalia A, Ilowite NT, Wallace CA, Whitmore J, Finck BK for the Pediatric Rheumatology Collaborative Study Group. Etanercept in children with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2000; 342: 763-9.
42. Mease PJ, Goffe BS, Metz J, Vanderstoep A, Finck B, Burge DJ. Etanercept in the treatment of psoriatic arthritis and psoriasis. A randomized trial. *Lancet* 2000; 356: 385-90.
43. Bonomo L, Casato M, Afeltra A, Caccavo D. Treatment of idiopathic mixed cryoglobulinemia with alpha interferon. *Am J Med* 1987; 83: 726-30.
44. Ferri C, Marzo E, Longombardo G, Lombardini F, La Civita L, Vanacore P, Liberati AM, Gerli R, Greco F, Moretti A, Monti M, Gentilini P, Bombardieri S. Interferon-alpha in mixed cryoglobulinemia patients. A randomized crossover, controlled trial. *Blood* 1992; 61: 1132-6.
45. Means RT Jr, Olsen NJ, Krantz SB, Dessypris EN, Graber SE, Stone WJ, O'Neil VL, Pincus T. Treatment of the anemia of rheumatoid arthritis with recombinant human erythropoietin: clinical and in vitro studies. *Arthritis Rheum* 1989; 32: 638-42.
46. Morstyn G, Campbell L, Souza LM, Alton NK, Keech J, Green M, Sheridan W, Metcalf D, Fox R. Effect of granulocyte colony stimulating factor on neutropenia induced by cytotoxic chemotherapy. *Lancet* 1988; i: 667-72.
47. Giuggioli D, Magistro R, Colaci M, Franciosi U, Caruso A, Ferri C. Fattori di crescita e terapia delle ulcere cutanee correlate alla sclerosi sistemica: uso del G-GSF in una casistica di 26 pazienti. *Reumatismo* 2006; 58: 26-30.
48. Arend W. Interleukin-1 receptor antagonist. A new member of the interleukin-1 family. *J Clin Invest* 1991; 88: 1445-51.
49. Hannum CH, Wilcox CJ, Arend WP, Joslin FG, Dripps DJ, Heimdal PL, Armes LG, Sommer A, Eisenberg SP, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist activity of a human interleukin-1 inhibitor. *Nature* 1990; 343: 336-40.
50. Champion CV, Lebsack ME, Lookabaugh J, Gordon G, Catalano M and the IL-1Ra Arthritis Study Group. Dose-range and dose-frequency study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1092-101.
51. Cush JJ, Lipsky PE. Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid

- arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31: 1230-8.
52. Ranges GE, Sriram S, Cooper SM. Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with L3T4. *J Exp Med* 1985; 162: 1105-10.
53. Herzog C, Walker C, Pichler W, Aeschlimann A, Wassmer P, Stockinger H, Knapp W, Rieber P, Muller W. Monoclonal anti-CD4 in arthritis. *Lancet* 1987; i:1461-2.
54. Cush JJ, Kavanaugh AF. Biologic interventions in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 1995; 21: 797-816.
55. Kyle V, Coughlan RJ, Tighe H, Waldmann H, Hazleman BL. Beneficial effect of monoclonal antibody to interleukin-2 receptor on activated T cells in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1989; 48: 428-9.
56. Fiocco U, Cozzi L, Cozzi E, Fagiolo U, Ferzone S. Treatment of rheumatoid arthritis by murine anti-idiotypic monoclonal antibodies to a syngeneic anti-HLA class II monoclonal antibody. *Br J Rheumatol* 1991; 30 (Suppl. 2):90.
57. Isaacs JD, Watts RA, Hazleman BL, Hale G, Keogan MT, Cobbald SP, Waldmann H. Humanised monoclonal antibody therapy for rheumatoid arthritis. *Lancet* 1992; 340: 748-52.
58. Strand V, Lipsky PE, Cannon GW, Calabrese LH, Wiesenhutter C, Cohen SB, Olsen NJ, Lee ML, Lorenz TJ, Nelson B. Effects of administration of an anti-CD5 plus immunconjugate in rheumatoid arthritis. Results of two phase II studies. The CD5 Plus Rheumatoid Arthritis Investigators Group. *Arthritis Rheum* 1993; 36: 620-30.
59. Kavanaugh AF, Davis LS, Nichols LA, Norris SH, Rothlein R, Scharschmidt LA, Lipsky PE. Treatment of refractory rheumatoid arthritis with a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1. *Arthritis Rheum* 1994; 37: 992-9.
60. Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis R, Brennan FM, Walker J, Bijl H, Ghayeb J, Wood JN: Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor- α . *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1681-90.
61. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, Winter G. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 1991; 352: 624-8. Citato da: Hoogenboom HR, Chames P: Natural and designer binding sites made by phage display technology. *Immunol Today* 2000; 21: 371-8.
62. den Broeder AA, Joosten LA, Saxne T, Heinegård D, Fenner H, Miltenburg AM, Frasa WL, van Tits LJ, Buurman WA, van Riel PL, van de Putte LB, Barrera P. Long-term anti-tumor necrosis factor alpha monotherapy in rheumatoid arthritis: effect on radiological course and prognostic value of markers of cartilage turnover and endothelial activation. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: 11-8.
63. Chan AC, Carter PJ. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 301-16.
64. Nelson AL, Reichert JM. Development trends for therapeutic antibody fragments. *Nat Biotechnol* 2009; 27: 331-7.
65. Reff ME, Carner K, Chambers KS, Chinn PC, Leonard JE, Raab R, Newman RA, Hanna N, Anderson DR. Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 1994; 83: 435-45.
66. Edwards JC, Cambridge G. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designated to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* 2001; 40: 205-11.
67. Townsend MJ, Monroe JC, Chan AC. B-cell targeted therapies in human autoimmune diseases: an updated perspective. *Immunol Rev* 2010; 237: 264-83.
68. Scheinecker C, Smolen J, Yasothan U, Stoll J, Kirkpatrick P. Tocilizumab. *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8: 273-4.
69. Engelmann H, Aderka D, Rubinstein M, Rotman D, Wallach D. A tumor necrosis factor-binding protein purified to homogeneity from human urine protects cells from tumor necrosis factor toxicity. *J Biol Chem* 1989; 264: 11974-80.
70. Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R: Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol* 1995; 155: 5038-45.
71. Moreland LW, Margolies G, Heck LW Jr, Saway A, Blosch C, Hanna R, Koopman WJ. Recombinant soluble tumor necrosis factor receptor (p80) fusion protein: toxicity and dose finding trial in refractory rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1996; 23: 1849-55.
72. Kremer JM, Westhovens R, Leon M, Di Giorgio E, Alten R, Steinfeld S, Russell A, Dougados M, Emery P, Nuamah IF, Williams GR, Becker JC, Hagerty DT, Moreland LW. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion proteins CTLA4Ig. *N Engl J Med* 2003; 349: 1907-15.
73. Genovese MC, Becker JC, Schiff M, Luggen M, Sherrer Y, Kremer J, Birbara C, Box J, Natarajan K, Nuamah I, Li T, Aranda R, Hagerty DT, Dougados M. Abatecept for rheumatoid arthritis refractory to tumor necrosis factor alpha inhibition. *N Engl J Med* 2005; 353: 1114-23.