

**Ana Pocrnja**

**Terapijsko praćenje serumske koncentracije biološkog  
lijeka infliksimaba**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2016.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Klinička biokemija organa i organskih sustava 2 na Zavodu za medicinsku biokemiju i hematologiju Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, a izrađen je na Kliničkom zavodu za kemiju KBC Sestre milosrdnice u Zagrebu pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Nade Vrkić i komentorice dr. sc. Nore Nikolac, specijalistice analitičke toksikologije.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Nadi Vrkić koja je svojim znanjem i stručnošću, strpljenjem i prijateljskim pristupom omogućila izradu ovoga rada.*

*Hvala komentorici dr. sc. Nore Nikolac na velikoj pomoći pri izradi ovoga rada.*

*Hvala svim mojim kolegama i prijateljima na svim lijepim trenutcima po kojima ću doživotno pamtiti godine studiranja.*

*Zahvaljujem se i Ivanu na pruženoj podršci i optimizmu tijekom svih ovih godina.*

*Veliko hvala i mag. med. biokemije Ines Šahinović na nesebičnoj pomoći, korisnim i prijateljskim savjetima koji su uvelike pomogli pri izradi ovoga rada.*

*Na kraju, veliko hvala mojoj obitelji, bratu i roditeljima, za nesebičnu podršku i bezuvjetnu ljubav tijekom cjelokupnog školovanja. Hvala vam što ste mi svojim radom i ljubavlju omogućili sve što sam dosada postigla.*

# SADRŽAJ

Stranica

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Infliksimab</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Monklonska protutijela.....	2
<b>1.2</b>	<b>Čimbenik nekroze tumora alfa ( TNF-<math>\alpha</math>)</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Biološki i bioslični lijekovi</b> .....	<b>3</b>
<b>1.4</b>	<b>Klinička primjena Infliksimaba (IFX)</b> .....	<b>6</b>
1.4.1	Upalne bolesti crijeva (IBD eng. <i>Inflammatory bowel disease</i> ).....	6
1.4.2	Reumatoidni artritis .....	10
1.4.3	Optimizacija terapije infliksimabom .....	10
<b>1.5</b>	<b>Štetni učinci Infliksimaba (IFX)</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBRAZLOŽENJE TEME</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIJALI I METODE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Uzorci</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Postupak određivanja koncentracije infliksimaba</b> .....	<b>18</b>
3.2.1	ELISA test .....	18
3.2.2	Reagensi.....	21
3.2.3	Postupak određivanja infliksimaba.....	21
3.2.4	Izračunavanje koncentracije infliksimaba .....	22
<b>3.3</b>	<b>Statističke metode</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Deskriptivna analiza</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Koncentracija lijeka u krvi u odnosu na faze liječenja i intervale aplikacije lijeka</b> .....	<b>26</b>
<b>4.3</b>	<b>Povezanost koncentracije lijeka u krvi s dozom, duljinom terapije i kliničkim odgovorom</b> .....	<b>28</b>
<b>5</b>	<b>RASPRAVA</b> .....	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>ZAKLJUČCI</b> .....	<b>35</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>36</b>
<b>8</b>	<b>SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>41</b>

## POPIS KRATICA

ACPA - anti-citrulinska antitijela (*engl. anti-citrullinated peptide antibodies*)

AP-1 - aktivirajući protein 1

ASCAs - anti-Saccharomyces cerevisiae antitijela (*engl. anti-Saccharomyces cerevisiae antibodies*)

ATI - antitijela na infliksimab

AZA - azatioprin

DMARD - lijekove koji modificiraju tijek bolesti (*engl. disease-modifying antirheumatic drugs*)

FDA - Agencija za hranu i lijekove (*engl. Food and Drug Administration*)

IBD - upalne bolesti crijeva (*engl. inflammatory bowel disease*)

IFX - infliksimab

IFN $\gamma$  - interferon gama

IL4 - interleukin 4

IL5 - interleukin 5

IL6 - interleukin 6

IL17 - interleukin 17

MP - merkaptopurin

NF $\kappa$  $\beta$  - nuklearni faktor kapa

pANCA - perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska autoantitijela (*engl. perinuclear anti-neutrophil cytoplasmica antibodies*)

RA - reumatoidni faktor

solTNF - solubilni čimbenik nekroze tumora alfa

TACE - TNF- $\alpha$  konvertirajući enzima (*TNF $\alpha$  Converting Enzyme*)

tmTNF - transmembranski čimbenik nekroze tumora alfa

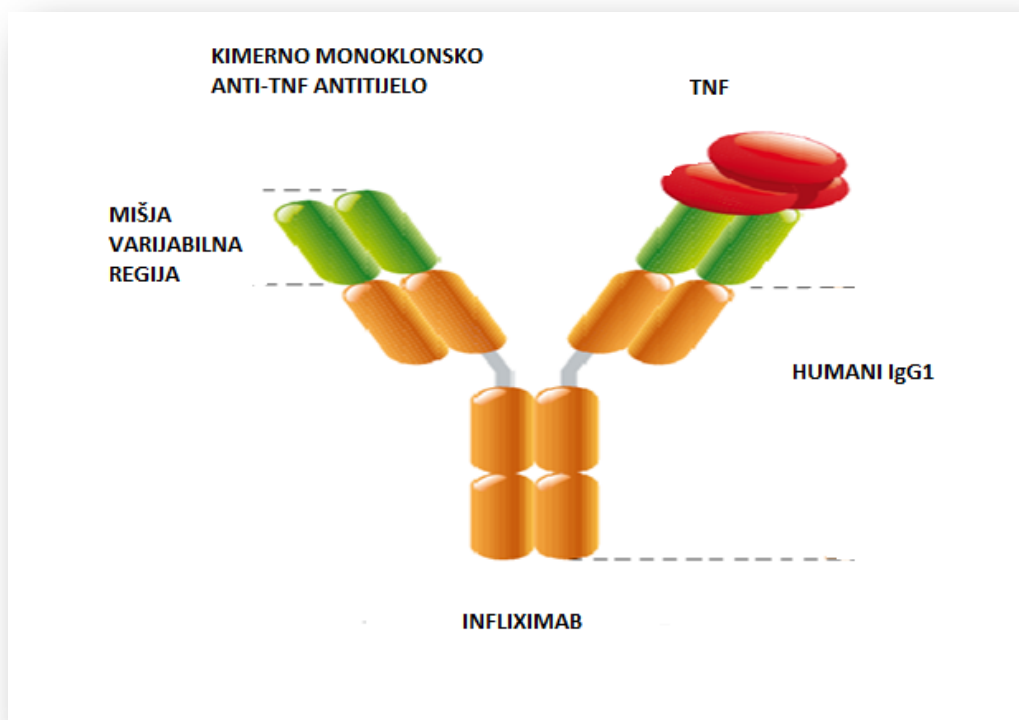
TNF- $\alpha$  - čimbenik nekroze tumora alfa (*engl. tumor necrosis factor  $\alpha$* )

---

# 1 UVOD

## 1.1 Infliksimab

Infliksimab je protuupalni lijek, odnosno kimerno monoklonsko protutijelo subklase IgG<sub>1κ</sub> (Slika 1.), koje se visokim afinitetom veže za topljivi i za membranu vezani čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) te na taj način blokira vezanje TNF- $\alpha$  na receptor i ispoljavanje njegovog proupalnog učinka (Katzung i sur., 2011; Guerra i Bermejo, 2014). Primjenjuje se kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima crijeva, kože i reumatskim bolestima (Lis i sur., 2014).



Slika 1. Prikaz strukture Infliksimaba (preuzeto sa [http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure\\_EN.pdf](http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure_EN.pdf))

Veći dio strukture infliksimaba čine humane konstantne regije (75 %) fuzirane sa mišjim varijabilnim regijama (25%). Dakle, mišji varijabilni dio lakog lanca ( $V_L$ ) vezan je za humani konstantni dio lakog lanca ( $C_L$ ), a mišji varijabilni dio teškog lanca ( $V_H$ ) vezan je na humani konstantni dio teškog lanca ( $C_{H1}-C_{H2}-C_{H3}$ ) (Slika 1.) (Dodig, 2015; Katzung i sur., 2011; Guerra i Bermejo, 2014). Tako dizajnirano kimerično protutijelo ima smanjenu

---

imunogeničnost u odnosu na animalno monoklonsko protutijelo i zbog toga produžen poluživot. Međutim, moguće je da i kimerično protutijelo zadrži imunogeničnost i da potakne sintezu antiidiotipskih protutijela tj. protutijela protiv sebe samih što onda itekako može utjecati na terapijski odgovor pacijenta (Dodig, 2015).

### **1.1.1 Monklonska protutijela**

Monoklonska protutijela su sva ona protutijela koja su monospecifična jer prepoznaju pojedinačni epitop, svojstven pojedinoj molekuli analita. Nastaju iz jednog pojedinačnog klona limfocita B te pripadaju istoj klasi protutijela. Za infliksimab kažemo da je monoklonsko protutijelo zato jer se veže i prepoznaje isključivo čimbenik nekroze tumora alfa (Dodig, 2015).

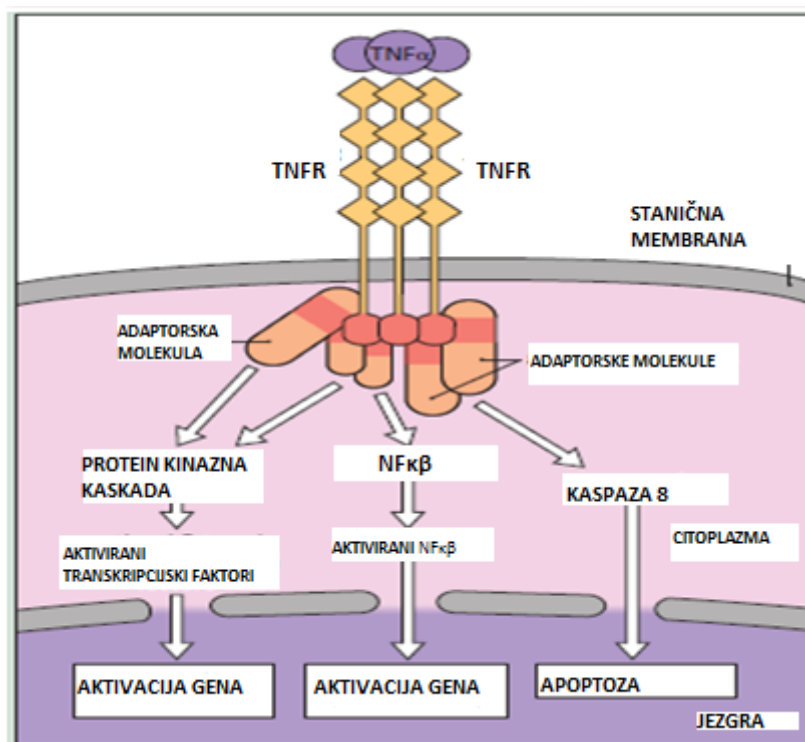
### **1.2 Čimbenik nekroze tumora alfa ( TNF- $\alpha$ )**

Jedan od ključnih proupalnih citokina u kroničnim upalnim bolestima crijeva i reumatskim bolestima je čimbenik nekroze tumora (TNF $\alpha$ ) ili kahektin. On se najranije luči i potiče ekspresiju drugih prouupalnih citokina kao što su IL-1 i IL-6. Jedan je od najvažnijih aktivatora makrofaga koji pod utjecajem TNF- $\alpha$  postaju toksični za unutarstanične parazite i maligne stanice pa ga svrstavamo u skupinu citoksina. Izrazito povećava otpornost organizma na infekcije, osobito na uzročnike koji žive unutar stanica. Ostala djelovanja TNF $\alpha$  uključuju poticanje migracije leukocita, aktivacije neutrofila i endotelnih stanica, indukcije sinteze proteina akutne faze, povećanje prokoagulacijskog djelovanja endotelnih stanica i drugih prokoagulacijskih čimbenika, djelovanje na hipotalamus te porast tjelesne temperature, poticanje hondrocita na sintezu enzima za razgradnju tkiva (matriksne metaloproteinaze), poticanje lučenja kortikosteroida. TNF $\alpha$  inhibira lipoprotein lipazu, a to uzrokuje lipemiju, anoreksiju i kaheksiju pri uznapredovalim infekcijama i zloćudnim tumorima pa otuda i drugo ime TNF $\alpha$ -kahektin (Conti i sur., 2013; Andreis i sur., 2010; Katzung i sur., 2011).

TNF proizvode stanice koje su dio urođenog (npr. makrofagi, dendritičke stanice) i stečenog imunskog sustava (posebno T<sub>H1</sub> stanice) kao i neimunološke stanice (glatke mišićne stanice) (Katzung i sur., 2011.). TNF $\alpha$  nastaje intracelularno pomoću specifične metaloproteinaze TACE (*TNF $\alpha$  Converting Enzyme*) koja cijepa transmembransku prekursorsku molekulu producirajući na taj način solubilni TNF $\alpha$ . Solubilni TNF $\alpha$  (solTNF) i transmembranski TNF $\alpha$  (tmTNF) biološki su aktivni, ali imaju potpuno različite uloge. Transmembranski TNF $\alpha$  ima ulogu u održavanju fiziološkog urođenog imunog odgovora na infekcije npr. tuberkulozu i osigurava toleranciju na autoantigene dok solTNF $\alpha$  dovodi do upalnog odgovora. Sve te

funkcije potvrđene su na animalnim modelima gdje se pokazalo da je inhibicijom solTNF $\alpha$  došlo do anti-upalnog efekta, a inhibicijom tmTNF $\alpha$  povećala se osjetljivost na infekcije i došlo je do egzacerbacija demijelinizacija (Lis i sur., 2013; Pedersen i sur., 2104).

Porodica receptora za TNF $\alpha$  ima dvije podvrste receptora koje imaju sličnu građu izvanstaničnog dijela receptorske molekule (cisteinom bogate domene), a razlikuju se po građi unutarstaničnog dijela koji veže različite adaptorske molekule pa dovodi do različitog prijenosa signala u stanicu. TNF $\alpha$  potiče trimerizaciju receptora i ukoliko dolazi do vezanja adaptorskih molekula koje imaju tzv. *domenu smrti*, aktivira se proteolitički enzim kaspaza 8 i uzrokuje apoptozu. TNF $\alpha$  se može istodobno vezati za adaptorske proteine koji nemaju domenu smrti i pobuditi protein kinaze koje aktiviraju transkripcijske čimbenike NF $\kappa$ B i AP-1, koji dovode do aktivacije gena za sintezu proupalnih citokina i drugih medijatora upale (Slika 2.) (Lis i sur., 2013; Andreis i sur., 2010; Tian i sur., 2014; Bremer, 2013; Damjanov i Vojinović, 2009).



Slika 2. Višestruki putovi prijenosa unutarstaničnog signala nakon vezanja TNF $\alpha$  za receptor tipa I (preuzeto i modificirano prema Maleu, 8. izdanje)

### 1.3 Biološki i bioslični lijekovi

Biološki lijekovi sadrže jednu ili više djelatnih tvari dobivenih iz živog organizma, najčešće bakterija, plijesni ili sisavca, a proizvode se genetskim inženjeringom. Geni koji kodiraju određeni protein ugrade se u živu stanicu koja počinje proizvoditi željeni protein koji se

---

potom vrlo složenim postupcima ekstrahira, pročišćuje i kao djelatna tvar koristi u proizvodnji određenog lijeka. Pripadaju novoj generaciji tzv. „pametnih“ lijekova koji se ciljano stvaraju, najčešće protiv određenog proupalnog citokina za kojeg se smatra da ima ključnu ulogu u patogenezi određene bolesti. Većina bioloških lijekova su monoklonska protutijela (Simon D Roger, 2006; Danese i Gomolon, 2013; Rinaudu-Gaujous, 2013). Prema sufiksu koji se dodaje imenu monoklonskog protutijela može se prepoznati o kojoj vrsti protutijela je riječ:

- kimerično protutijelo, sufiks *-ximab*
- humanizirano protutijelo, sufiks *-zumab*
- humano protutijelo, sufiks *-umab*

Prema važećoj karakterizaciji i definiciji, osim monoklonskih protutijela, razlikujemo još dvije kategorije biologika: 1) biologici koji su gotovo identični prirodnim složenim molekulama i služe kao nadomjesna terapija ili se daju sa svrhom pojačavanja specifičnog fiziološkog odgovora organizma, 2) proteine koji predstavljaju topive receptore ili antagoniste receptora. Tako u biologike ubrajamo biotehnološki dobivene citokine, hormone, različite čimbenike rasta, činitelje zgrušavanja krvi, monoklonska protutijela, cjepiva i složene molekule koje služe u staničnoj i tkivnoj terapiji (Simon D Roger, 2006; Hrvatsko gastroenterološko društvo, Sekcija za upalne bolesti crijeva, 2013; Danese, 2013; Dodig, 2015).

Primjena bioloških lijekova 1980-tih donijela je značajan napredak u liječenju upalnih bolesti crijeva, upalnih reumatskih bolesti, dijabetesa, multiple skleroze, malignih bolesti i rijetkih bolesti. Ono što ih razlikuje od klasičnih lijekova jest činjenica da su biološki lijekovi veliki (oko 1000 puta veći od klasičnih lijekova), kompleksni te izrazito heterogene strukture za razliku od klasičnih lijekova koji su male molekule, vrlo jednostavne strukture, proizvedene kemijskom sintezom pa ih je vrlo lako reproducirati (Dong Il Park, 2016; Rinaudu-Gaujous, 2013; Simon D Roger, 2006; [www.hucuk.hr](http://www.hucuk.hr)).

Bioslični lijekovi su kopije izvornih bioloških lijekova. Na tržištu se mogu naći nakon isteka patenta izvornog biološkog lijeka. Bioslični lijekovi nisu identični, nego visoko slični referentnom lijeku tj. izvornom lijeku. S obzirom da se proizvode u živoj stanici te da biologija ne poznaje koncept identičnosti, niti jedan lijek proizveden biotehnološkim postupkom ne može biti identičan referentnom lijeku. Zbog prirode bioloških sustava ni različite serije istog lijeka jednog proizvođača ne mogu biti identične. Bez obzira na razlike,



---

odobreni bioslični lijekovi moraju imati isti profil učinkovitosti, kvalitete, farmakokinetike i sigurnosti kao i referentni lijek. Proizvođači su dužni dokazati da male varijabilnosti koje postoje između biosličnog i referentnog lijeka ne utječu na kvalitetu, učinkovitost i sigurnost primjene lijeka (Rinaudu-Gaujous, 2013). Bioslični lijekovi po svojoj strukturi uglavnom spadaju u glikoproteine. U usporedbi sa izvornim biološkim lijekom očekuje se ista aminokiselinska sekvenca te slični glikozilacijski obrazac, ali zbog vrlo složenog postupka proizvodnje to je vrlo teško postići. Razlog tome je činjenica da rekombinantna tehnologija omogućuje stvaranje kopije sekvence aminokiselina, ali nije u mogućnosti kontrolirati moguće kasnije post-translacijske modifikacije koje ovise o okolišu staničnih linija koje se koriste u proizvodnom procesu. Jedan od razloga zašto je teško postići točnu kopiju originalnog lijeka jesu razlike u postupcima proizvodnje biosimilara i referentnog lijeka budući da zbog ograničenog pristupa informacijama proizvođač biosimilara nema saznanja o proizvodnom procesu originalnog lijeka (www.hucuk.hr; Hrvatsko gastroenterološko društvo, Sekcija za upalne bolesti crijeva, 2013; Rinaudu-Gaujous i sur., 2013; McCamish i Woollet, 2011; Brian G.Fegan i sur., 2014).

U Europskoj uniji biološke i bioslične lijekove registrira isključivo Europska agencija za lijekove (EMA) dok je u SAD-u za to zadužena Agencija za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) (Dong Il Park, 2016; Danese i Gomolon, 2013). Osim dokumentacije kojom se dokazuje kvaliteta lijeka, proizvođač je obavezan priložiti rezultate kliničkih ispitivanja učinkovitosti i sigurnosti primjene lijeka, odnosno dokazati usporedivost s referentnim lijekom na svim razinama. Nakon stavljanja lijeka u promet, proizvođači su obavezni pratiti sigurnost primjene lijeka (Ebbbers, 2014; D Roger, 2006).

Korištenje bioloških lijekova je u stalnom porastu, poglavito zbog činjenice kontinuiranih i rastućih potreba u liječenju imunološki posredovanih, upalnih i malignih bolesti. Procjenjuje se da su biološki lijekovi u 2012. godini jedni od najprodavanijih lijekova u svijetu (Danese i Gomolon, 2013). Međutim, njihova primjena generira visoke troškove liječenja što značajno ograničuje dostupnost skupe biološke terapije. Zbog toga se u biološki sličnim lijekovima vidi potencijal smanjenja troškova zdravstvene zaštite, na sličan način kako su ostvarene uštede uvođenjem generičkih verzija kemijskih lijekova, a što može potaknuti kompeticiju na tržištu. Ušteda koja se ostvaruje korištenjem biosličnih lijekova procjenjuje se na 25%-75% u usporedbi sa izvornim biološkim lijekovima (Dong Il Park, 2016). Stoga se korištenjem

---

biosličnih lijekova omogućuje bolja dostupnost skupe biološke terapije pacijentima kojima je ona uistinu potrebna, uz jednaku kvalitetu i niže troškove liječenja. Jedna od prednosti proizvodnje biosličnih lijekova jest razvoj „biobetter“ molekula koje prepoznaju isti epitop kao i izvorni biološki lijek, ali su genetički modificirane u svrhu poboljšanja farmakokinetičkih svojstava npr. promjena Fc domene kako bi se povećalo vrijeme poluraspada lijeka u serumu (Dong Il Park, 2016).

U rujnu 2013. godine Europska agencija za lijekove (EMA) odobrila je prvo bioslično monoklonsko protutijelo Infliksimab za liječenje Crohnove bolesti i ulceroznog kolitisa kod djece i odraslih, upalnih reumatskih bolesti i psorijaze. Bioslične verzije izvornog lijeka Infliksimaba (Remicade®) koje su odobrene od strane Europske agencije za lijekove su Remsima® i Inflectra® , koja je ujedno i prvi biosimilar dostupan u Hrvatskoj (Ebbbers, 2014; Brian G.Fegan, 2014; www.hucuk.hr; Rinaudu-Gaujous, 2013).

#### **1.4 Klinička primjena Infliksimaba (IFX)**

Uvođenje infliksimaba, ali i drugih protutijela protiv humanog TNF $\alpha$  (Adalimumab i Etanercept), dovelo je do revolucije u liječenju upalnih bolesti crijeva (eng. Inflammatory bowel disease-IBD), reumatoidnog artritisa i ostalih reumatskih bolesti te kožnih oboljenja jer se pokazalo da mogu inducirati i održavati remisiju bolesti te uvelike poboljšati kvalitetu života pacijenata (smanjena potreba za kirurškim zahvatima, manji broj hospitalizacija, oporavak sluznice crijeva u slučaju IBD) (Akiho, 2015; Amiot i Peyrin-Biroulet, 2015). Odobreni su za liječenje akutnih i kroničnih bolesnika koji imaju medicinske kontraindikacije ili ne odgovaraju na konvencionalnu terapiju imunomodulatorima (6-merkaptopurin i azatioprin), kortikosteroidima i u slučaju reumatoidnog artritisa na lijekove koji modificiraju tijek bolesti (engl. *disease-modifying antirheumatic drugs*, DMARD) (Sažetak i opis svojstava lijeka-Remicade, HALMED; Katzung i sur.2011)

##### **1.4.1 Upalne bolesti crijeva (IBD eng. *Inflammatory bowel disease*)**

Upalne bolesti debelog crijeva mogu biti akutnog i kroničnog tijeka, a mogu ih uzrokovati različiti etiološki čimbenici (infekcijski agensi, lijekovi, ishemija, zračenje, toksične tvari i dr.), odnosno mogu biti nepoznatoga uzroka. Ulcerozni kolitis i Crohnov kolitis (u sklopu

---

Crohnove bolesti) čine oko 90% svih kroničnih upalnih bolesti debelog crijeva nepoznatoga uzroka. Ta dva etnita imaju puno preklapanja pa se često zajedno opisuju kao upalne bolesti crijeva (engl. inflammatory bowel disease, IBD) (Včev, 2002).

Ulcerozni kolitis (colitis ulcerosa) je kronična idiopatska upalna bolest debelog crijeva s brojnim akutnim recidivima i remisijama koja je ograničena isključivo na sluznicu i podsluznicu debelog crijeva. Kliničkom slikom dominiraju proljevi, rektalno krvarenje, bol u trbuhu, tenezmi (bolna potreba za pražnjenjem crijeva čak i kad je zadnje crijevo prazno), ulceracije crijevne sluznice, povišena tjelesna temperatura i gubitak tjelesne težine kao posljedice upale sluznice debelog crijeva. Upalni proces uvijek zahvaća rektum i širi se kontinuirano proksimalno. Bolest je češća u Židova i bijelaca, u razvijenim zemljama Europe i SAD-a. Uzrok nastanka ulceroznog kolitisa još uvijek je nepoznat. Istraživanja pokazuju da upala pokazuje međudjelovanje niza čimbenika: genetike, imunološkog sustava, mikroorganizama, okolišnih čimbenika. Niska podudarnost obolijevanja od ulceroznog kolitisa među jednojajčanim blizancima (6-14%) u usporedbi s Crohnovom bolesti (44-50%) najjači je dokaz za veću važnost okolišnih nego genetskih čimbenika u razvoju ulceroznog kolitisa. Jedna od hipoteza kojom se pokušava objasniti patogeneza ulceroznog kolitisa je ta da su crijevne bakterije zapravo autoantigeni ("vlastita" meta imunološkog sustava), a ulcerozni kolitis uzrokovan gubitkom tolerancije ili abnormalnom imunom reakcijom prema inače neškodljivim mikro-stanovnicima crijeva. Visoka učestalost (oko 70%) nalaza pANCA (perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska autoantitijela) u oboljelih od ulceroznog kolitisa jedan je od najvažnijih podataka koji podupiru ne-epitelnu autoimunost (autoimunost koja nije usmjerena na površne, epitelne, stanice). U prognostičke i terapijske svrhe, bolest je podijeljena u tri oblika prezentacije: blaga, umjerena i teška. Težina simptoma često je odraz anatomske proširenosti bolesti, što je također važno za liječenje (Včev, 2002; www.hucuk.hr; Jurjus i sur., 2015; Leitner i Vogelsang, 2016).

Crohnova bolest (Morbus Chron) kronična je recidivirajuća upalna bolest koja može zahvatiti bilo koji dio probavnog trakta od usnica do anusa, ali se najčešće javlja u terminalnom ileumu i desnome kolonu. Upalom su zahvaćeni svi slojevi crijevne stijenke te mezenterij i regionalni limfni čvorovi, a upalni proces je segmentalan i oštro ograničen od susjednog normalnog crijeva. Katkada je nekoliko zahvaćenih segmenata odijeljeno normalnim crijevom, a ta se slika naziva „preskakajuće lezije“. Tijek bolesti je varijabilan sa

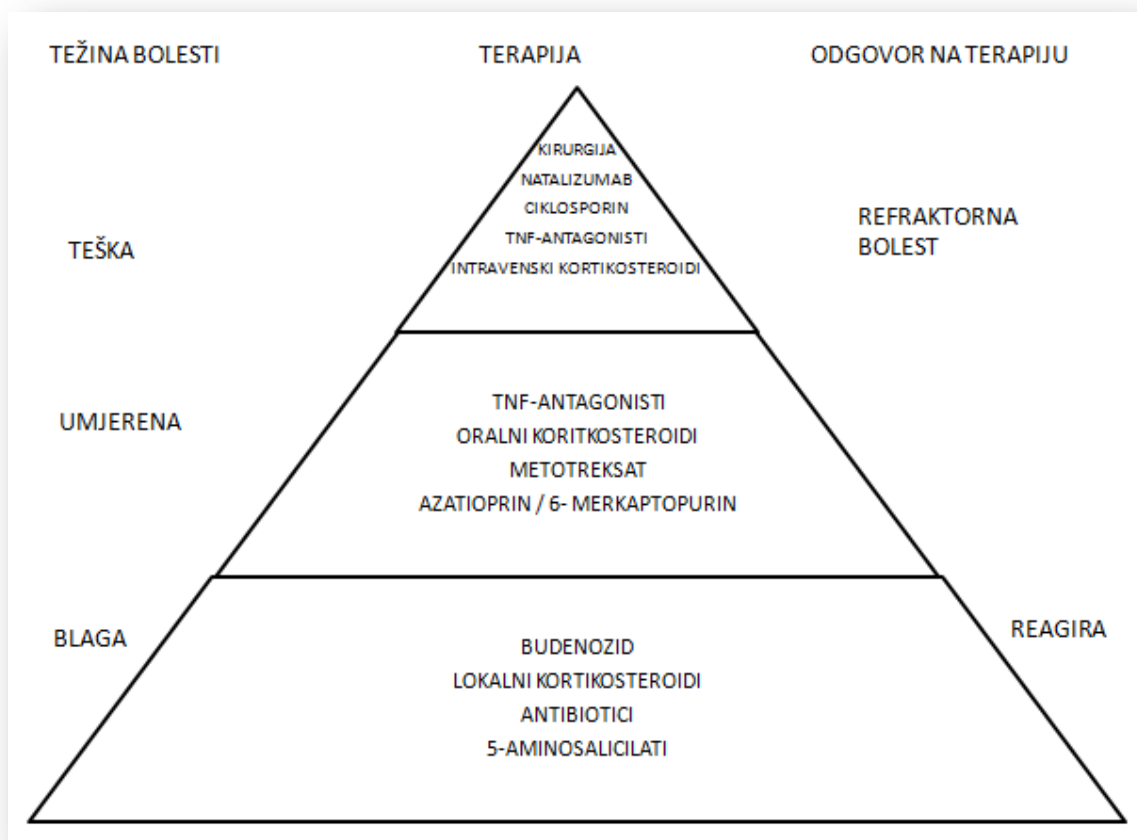
---

brojnim remisijama i recidivima, različitim očitovanjima bolesti, čestim perianalnim, intestinalnim i ekstraintestinalnim komplikacijama te čestim recidivima poslije kirurške resekcije bolesnog segmenta crijeva. Klinička slika karakterizirana je proljevom, vrućicom, gubitkom tjelesne mase, osjećajem umora, bolovima u trbuhu, perforacijama (pukotine u zidu crijeva), fistulama (neprirodne komunikacije između organa koji su inače odvojeni), mučninama i povraćanjem. Za razliku od ulceroznog kolitisa, nazočnost krvi, gnoja i sluzi u stolici kod ovih bolesnika je atipična, ali moguća pojava. Pacijenti mogu imati simptome i izvan gastrointestinalnog trakta kao što su kožni osip, crvenilo očiju, bolovi u zglobovima. Crohnova bolest kao i ulcerozni kolitis pojavljuje se češće u bijelaca, Židova i stanovnika razvijenih zemalja Europe i Sjeverne Amerike. Etiologija bolesti je nepoznata, a kao rizični čimbenici za Crohnovu bolest navode se povećana konzumacija šećera, pušenje, oralni kontraceptivi, pretjerana higijena u modernim društvima, antibiotici. Uočena je i genetička predispozicija, odnosno 15-40 % opasnost za srodnike prvog stupnja te povećana podudarnost u identičnih blizanaca. Za lakše diferenciranje ulceroznog kolitisa od Crohnove bolesti pomažu nam dva serološka markera: pANCA (perinuklearna antineutrofilna citoplazmatska autoantitijela) i ASCA (anti-Saccharomyces cerevisiae antitijela). ASCA su detektirana kod 40-68% oboljelih od Crohnove bolesti za razliku od ulceroznog kolitisa gdje su detektirana kod 6-12% pacijenata. Obratni slučaj je sa pANCA koja prevladavaju kod pacijenata sa ulceroznim kolitisom, a detektirana su samo kod 10% pacijenata oboljelih od Crohnove bolesti (Včev, 2002; www.hucuk.hr; Jurjus i sur., 2015; Leitner i Vogelsang, 2016).

Upalne bolesti crijeva, ulcerozni kolitis i Crohnovu bolest, povezujemo sa intestinalnom disbiozom koja za posljedicu ima kvantitativne i kvalitativne promjene u ravnoteži između korisnih i štetnih bakterija u crijevima. Takve promjene intestinalne homeostaze utječu na lokalnu i sistemsku imunost te pridonose patogenezi upalnih bolesti crijeva. U sluznici crijeva oboljelih od IBD pronađena je povećana vrijednost TNF $\alpha$  koji ima jednu od glavnih uloga u patogenezi upalnih bolesti crijeva, zajedno sa ostalim citokinima kao što su IL6, IL1, IL17, IFN $\gamma$ , IL4, IL5 (Jurjus i sur., 2015; Leitner i Vogelsang, 2016). Bez obzira na sve pretpostavke o etiologiji upalnih bolesti crijeva važno je naglasiti da su to multifaktorijalne bolesti čiji je stvarni uzrok još uvijek nejasan i nepoznat.

Farmakološko liječenje upalnih bolesti crijeva, upravo zbog nejasne etiologije i patogeneze, uključuje lijekove koji pripadaju različitim terapijskim skupinama i imaju različite

nespecifične mehanizme protuupalnog djelovanja. Izbor lijekova koji se primjenjuju u liječenju temelji se na težini bolesti, osjetljivosti bolesti na lijek i toksičnosti lijekova (Slika 3.). Općenito, lijekovi se mogu rabiti samostalno ili u različitim kombinacijama. Lijekovi pri dnu piramide manje su djelotvorni, ali nose manji rizik od ozbiljnih štetnih učinaka. Bolesnici sa blagim oblikom bolesti mogu se liječiti sa 5-aminosalicilatima, kortikosteroidim za lokalnu primjenu, antibioticima. Bolesnike s umjereno teškom bolešću može se liječiti oralnim kortikosteroidima za postizanje remisije bolesti ili imunomodulatorima (azatioprin, merkaptopurin, metotreksat) i TNF $\alpha$  antagonistima koji pomažu i održavanje remisije. Bolesnici sa umjereno teškim oblikom bolesti, a nisu odgovorili na prethodno propisanu terapiju, mogu se liječiti intravenskim kortikosteroidima, anti-TNF-antitijelima ili kirurški (uglavnom rezervirano za liječenje komplikacija). Ciklosporin, imunosupresiv, djelotvoran je i primjenjuje se u teškim oblicima bolesti rezistentnim na drugu terapiju (Katzung i sur., 2011).



Slika 3. Terapijska piramida u liječenju upalnih bolesti crijeva (preuzeto iz Katzunga, 12. izdanje)

---

Kod pacijenata oboljelih od upalnih bolesti crijeva infliksimab se primjenjuje u obliku višestrukih intravenoznih infuzija nulti, drugi i šesti tjedan u dozi od 5 mg/kg i to nazivamo indukcijskom fazom liječenja (eng. induction phase). Ukoliko pacijent povoljno reagira na terapiju prelazi se u tzv. fazu održavanja (eng. maintenance phase) s ciljem održavanje remisije. U toj fazi infliksimab se primjenjuje u dozi od 5 mg/kg svakih osam tjedana (Katzung i sur., 2011; Miheller i sur., 2011).

### **1.4.2 Reumatoidni artritis**

Reumatoidni artritis je autoimuna kronična upalna bolest karakterizirana sinovitisom i progresivnom erozijom hrskavice i kosti zglobova sa prisutnošću autoantitijela kao što su reumatoidni faktor (RA) i anti-citrulinska antitijela (ACPA-anti-citrullinated peptide antibodies). Reumatoidni faktor je cirkulirajuće antitijelo kojemu je antigen Fc dio IgG protutijela te zbog toga dolazi do nakupljanja imunskih kompleksa koji aktiviraju komplement i potiču upalu uzrokujući kronični sinovitis. Reumatoidni artritis zahvaća oko 0.5-1% populacije, a žene obolijevaju 2-3 puta češće nego muškarci (Selaas i sur., 2015; perpetuum-lab.com.hr). Krajnji rezultat bolesti su deformacije i funkcionalna oštećenja zglobova te 50% pacijenata postaje nefunkcionalno za rad unutar 10 godina od početka bolesti (Simsek, 2010.). TNF $\alpha$ , kao i kod IBD, ključni je citokin u pokretanju upalnog procesa u RA, te su mnogi eksperimentalni modeli dokazali da monoklonska protutijela koja se vežu na TNF $\alpha$  neutraliziraju ne samo njegovo djelovanje već i produkciju ostalih upalnih citokina koji doprinose patogenezi bolesti (Novak i sur., 2012).

Kod oboljelih se primjenjuje intravenskim infuzijama od 3 do 10 mg/kg, a uobičajena je doza 3-5 mg/kg svakih osam tjedana. Nakon primjene u redovitim vremenskim razmacima (intermitentna primjena) infliksimab ubrzava razvoj humanih antikimeričnih protutijela u približno 62% bolesnika. (Katzung i sur., 2011).

### **1.4.3 Optimizacija terapije infliksimabom**

Unatoč dokazanoj učinkovitosti infliksimaba pojedina populacija pacijenata ne pokazuje klinički odgovor nakon indukcijske faze liječenja (eng. primary non-responders), a pojedini

---

pacijenti unatoč dobrom kliničkom odgovoru na infliksimab u indukcijskoj fazi liječenja ipak izgube klinički odgovor tijekom terapije održavanja (eng. secondary non-responders). Statistički gledano nakon početne terapije (indukcijska faza liječenja) 70% bolesnika ima klinički odgovor, a trećina postigne kliničku remisiju. Uz kontinuiranu primjenu infuzija svakih 8 tjedana u oko 50% bolesnika uočava se nastavak pozitivnoga kliničkog odgovora.

Da bi mogao izvršiti svoj farmakološki učinak lijek mora postići adekvatnu koncentraciju u cirkulaciji. Ciljne terapijske koncentracije infliksimaba iznose 3-7  $\mu\text{g/ml}$ . Cilj svake terapije je održavati dinamičku ravnotežu tj. približno stalnu koncentraciju lijeka u cirkulaciji koja uzrokuje željeni farmakološki učinak. Koncentracija infliksimaba u serumu prije sljedeće infuzije tj. koncentracija u dinamičkoj ravnoteži (engl. trough concentration) se mjeri i koristi u svrhu terapijskog praćenja koncentracije lijeka te služi kao dobar pokazatelj kliničkog odgovora pacijenta. Niska koncentracija infliksimaba u serumu povezana je sa nedostatkom kliničkog odgovora kod pacijenata (Steenholdt i sur., 2011; Štraus, 2009; Katzung i sur., 2011).

Poluvrijeme eliminacije infliksimaba iznosi 8-10 dana. Volumen raspodjele (3-6 L) je ponajprije unutar vaskularnog prostora i distribuira se malo izvan vaskularnog prostora u upaljena tkiva. Aplicira se intravenozno jer oralna aplikacija nije moguća zbog neutralizacije lijeka probavnim sustavom. Moglo bi se očekivati da se infliksimab unatoč mišjoj promjenjivoj regiji metabolizira i eliminira na sličan način kao većina imunoglobulina, s recikliranjem aminokiselina i eliminacijom putem žuči i urina, međutim, točne anatomske lokacije katabolizma antitijela tek treba identificirati (Marušić i Mihaljević, 2013; Moss i sur., 2013; Yarur i sur., 2014).

Osim koncentracije infliksimaba prije sljedeće infuzije (trough concentration), na terapijski odgovor pacijenta utječe i produkcija antitijela na infliksimab, točnije na mišje varijabilne regije protutijela koje organizam prepoznaje kao strane te pokreće imunu reakciju kako bi neutralizirao djelovanje tog stranog antigena, u ovom slučaju infliksimaba. Normalna vrijednosti antitijela na infliksimab je manja od 10  $\mu\text{g/ml}$ . Ovaj fenomen, poznat kao imunogenost, povećava klirens infliksimaba putem retikuloendotelnog sustava za 30%, dakle smanjuje koncentraciju infliksimaba u cirkulaciji i doprinosi kraćem trajanju, nedostatku i gubitku kliničkog odgovora pacijenta na terapiju. Antitijela se mogu javiti odmah nakon prve

---

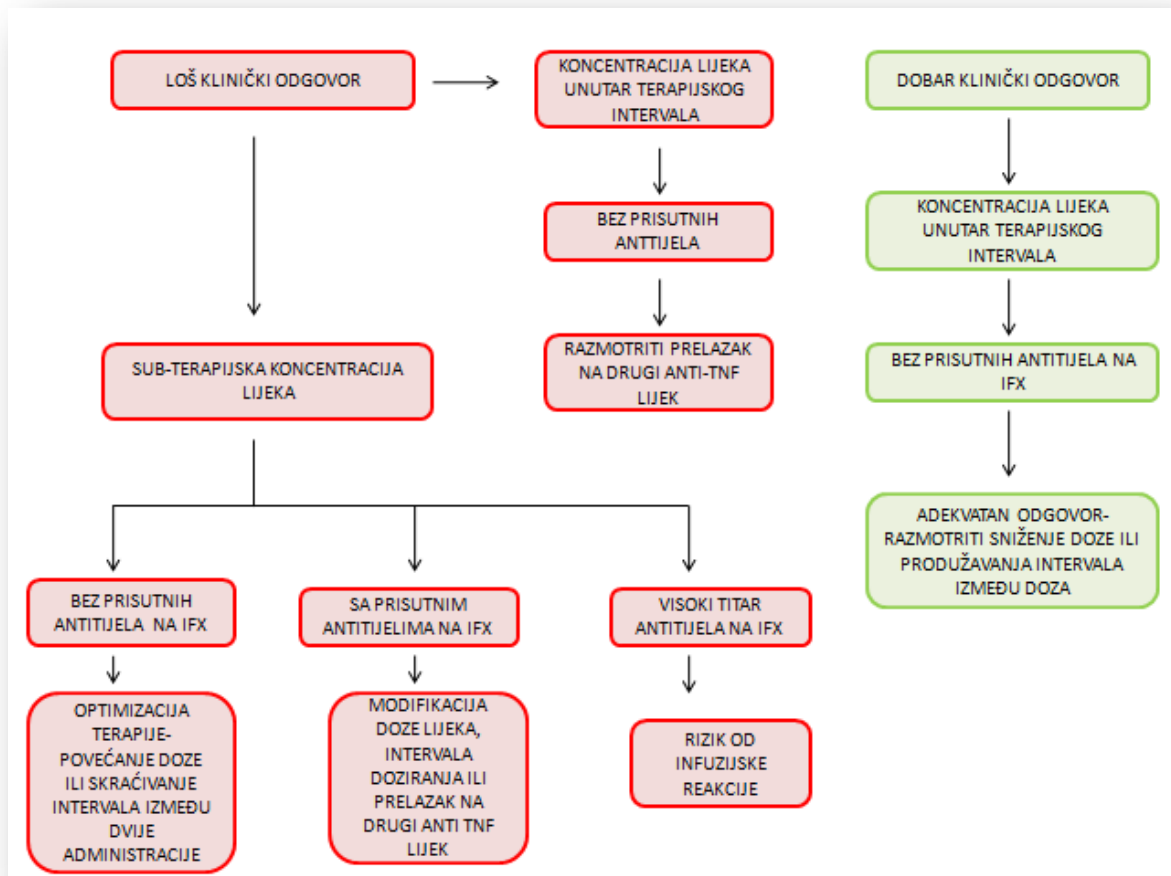
infuzije IFX te mogu perzistirati u krvotoku 1-4.5 godine čak iako je terapija IFX-a prekinuta. ATI (antitijela na infliksimab) povećavaju vjerojatnost akutne i odgođene infuzijske reakcije. Visoka pojavnost antitijela povezuje se sa epizodnim režimom doziranja (terapija nije konstantna već sa prekidima) i nekorištenjem konkomitantne terapije. Smatra se da istodobna primjena imunomodulatora (AZA- azatioprin, MP-merkaptopurin ili metotreksat) i prethodna terapija kortikosteroidima povećava koncentraciju IFX-a i smanjuje formiranje antitijela na IFX. U upalnim stanjima gdje se egzogena monoklonalna protutijela koriste kao terapija, polimorfizmi u genima za pojedine citokine, humani leukocitni antigen (HLA) i imunoglobuline također mogu povoljno utjecati na proizvodnju antitijela na lijek. U studijama se izvještava o različitoj učestalosti stvaranja protutijela u rasponu od 8-68 % bolesnika koji su primali infliksimab (Marušić i Mihaljević, 2013; Moss i sur., 2013; Yarur i sur., 2014; Nanda i sur., 2013; Guerra i Bermejo, 2014; Pallagi-Kunstar i sur., 2014; Miheller i sur., 2011).

Na koncentraciju infliksimaba utječe i sistemska upala te ozbiljnost i aktivnost bolesti. Sistemska upala inducira RES na povećanje kataboličke aktivnosti te na taj način smanjuje koncentracije albumina i IgG-a. Gubitak odgovora na terapiju korelira sa niskom koncentracijom albumina, povećanim CRP-om, i niskom koncentracijom infliksimaba u cirkulaciji. Teška upala sluznice crijeva uzrokuje patološki gubitak proteina (enteropatija sa gubitkom proteina) kroz intestinalni lumen zajedno sa lijekom. Studije su pokazale da su kod pacijenata u indukcijskoj fazi liječenja pronađene određene koncentracije IFX-a u stolici, ali kod onih koji nisu odgovorili na terapiju koncentracije su bili puno veće (Yarur i sur., 2014). Za praćenje djelotvornosti terapije, aktivnosti bolesti i predviđanja mogućih recidiva, osim CRP-a, albumina i sedimentacije eritrocita, koristi se i koncentracija ektina u fecesu (Leitner i Vogelsang, 2016).

Obrazloženje za gubitak i nedostatak odgovora na terapiju infliksimabom je multifaktorijalno te se povezuje sa razvojem antitijela na infliksimab (ATI), imunološkim statusom, genetskim čimbenicima, interindividualnim razlikama u farmakokinetici (odnosi se na razliku odnosa doze i koncentracije zbog interindividualne razlike u apsorpciji, distribuciji i eliminaciji lijeka) i farmakodinamici (odnosi se na interindividualnu razliku odnosa koncentracije i terapijskog odgovora) lijeka, konkomitantnom terapijom. Zbog svega navedenog vrlo je važno pratiti koncentraciju infliksimaba i antitijela na IFX tijekom terapije



kako bismo ju mogli optimizirati tj.individualno dozirati ukoliko je to potrebno. Individualno doziranje osigurava maksimalnu učinkovitost primijenjene terapije i svodi učestalost toksičnih učinaka lijeka na najmanju moguću mjeru. Predloženi pristup pacijentima na infliksimabu , kojim se želi poboljšati ishod liječenja i smanjiti loše upravljanje terapijom, prikazan je na shematskom prikazu (Slika 4.) (Štraus, 2009; Guerra i Bermejo, 2014).



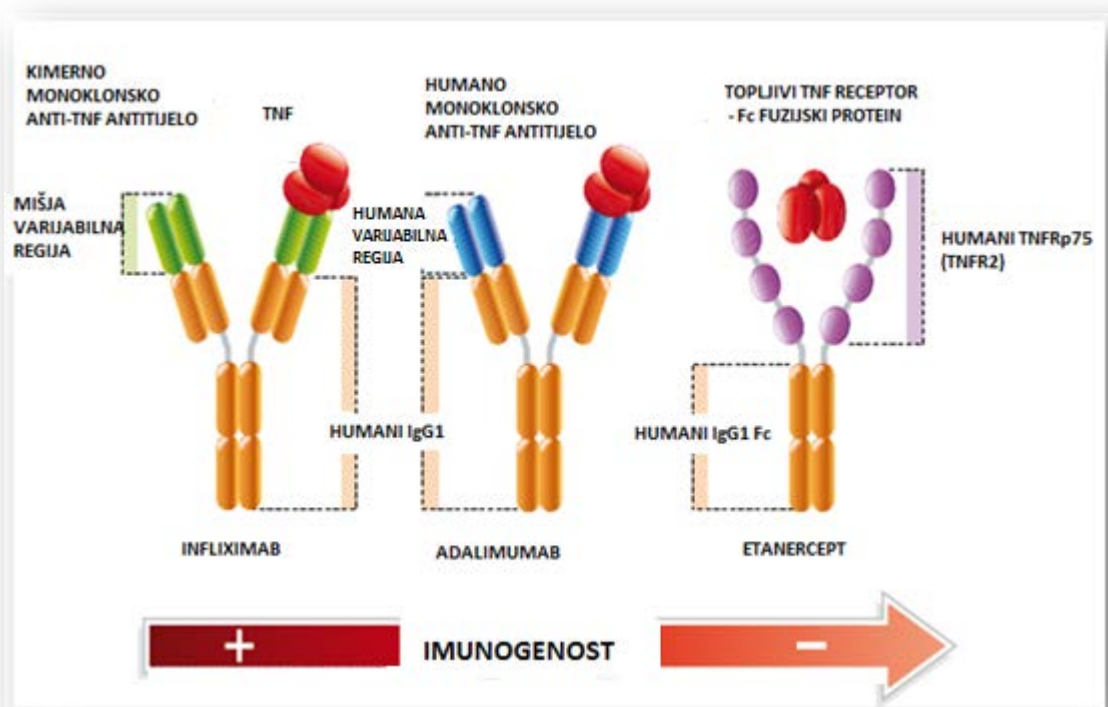
Slika 4. Optimizacija terapije pacijenata na infliksimabu (preuređeno prema shemi preuzetoj s [http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure\\_EN.pdf](http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure_EN.pdf))

Ukoliko osoba pokazuje dobar klinički odgovor na terapiju, nema razvijena antitijela na infliksimab i koncentracija lijeka je unutar referentnog intervala može se razmatrati smanjenje doze lijeka i produžavanje intervala između primjenjenih doza, a ako je pacijent na monoterapiji primjena imunosupresiva kako bi eventualno umanjili rizik za proizvodnju antitijela.

U slučaju lošeg kliničkog odgovora pacijenta prvo se treba odrediti je li koncentracija lijeka unutar očekivanog referentnog intervala. Ako nemamo prisutna antitijela na IFX i ako je koncentracija lijeka unutar referentnog intervala, a klinički odgovor izostaje jedino što nam preostaje je razmotriti primjenu drugog biološkog lijeka čija glavna meta nije TNF $\alpha$  jer možda u tom slučaju to nije citokin sa glavnom ulogom u određenoj patofiziologiji.

Ako je loš klinički odgovor povezan sa niskom koncentracijom IFX (subterapijske koncentracije) bez prisutnih antitijela preporuča se optimizacija terapije u smislu povećanja (sa 5 mg/kg na 10 mg/kg) doze ili skraćivanja intervala između dvije administracije (umjesto svakih 8 smanjiti na svakih 6 tjedana) jer se pretpostavlja da je klirens IFX ubrzan.

Obratni slučaj sa niskom koncentracijom IFX, a prisutnim antitijelima zahtijeva također modifikaciju terapije u smislu režima doziranja, ali i promjenu anti TNF antagonista npr. infliksimab se može zamijeniti sa adalimumabom ili etanerceptom. To su tri najčešće korištena biološka lijeka čija različita struktura uvjetuje i razlike u imunogenosti. Kao rezultat svoje strukturne sličnosti s ljudskim IgG1 i zato što nije kimerično antitijelo, adalimumab ima smanjenu imunogenost u odnosu na infliksimab te samim time ne zahtijeva paralelnu primjenu imunosupresiva (azatioprina ili metotreksata) (Slika 5.).



Slika 5. Različita struktura anti TNF antagonista uvjetuje različitu imunogenost (preuzeto sa [http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure\\_EN.pdf](http://www.proteomika.com/images/stories/PromonitorBrochure_EN.pdf))

---

## 1.5 Štetni učinci Infliksimaba (IFX)

Ozbiljne se nuspojave vide u do 6% bolesnika koji primaju anti-TNF-terapiju. Najvažniji štetni učinak ovih lijekova jest infekcija zbog potiskivanja upalnog odgovora posredovanog T<sub>HI</sub> stanicama. To može dovesti do ozbiljnih infekcija poput bakterijske sepse, tuberkuloze, invazivne mikoze, reaktivacije hepatitisa B, listerioze i drugih oportunističkih infekcija. Dolazi i do reaktivacije latentne tuberkuloze uz diseminaciju bolesti. Rizik od ozbiljnih infekcija znatno je povećan u bolesnika koji istodobno uzimaju kortikosteroide. Zabilježen je povećan broj slučajeva hepatosplenarnog limfoma T-stanica kod bolesnika koji su na kombiniranoj terapiji imunomodulatori, IFX ili kortikosteroidi.

Infliksimab se povezuje s akutnim reakcijama vezanima uz infuziju, uključujući anafilaktički šok te reakcije kasne preosjetljivosti. Akutna štetna infuzijska reakcija javlja se u do 10% bolesnika. Infuzijske reakcije češće su kod druge ili naknadne infuzije nego kod početne. Simptomi umjerene rane infuzijske reakcije su: vrućica, glavobolja, urtikarija, dispneja, bol u prsima. Bolesnicima se prije infuzije može dati antihistaminik, hidrokortizon i/ili paracetamol kako bi se spriječili blagi i prolazni učinci. Odgođena reakcija koja nalikuje na serumsku bolest može se pojaviti jedan do dva tjedna nakon primjene IFX u 1% bolesnika. Sastoji se od mijalgija, artralgija, osipa, vrućice, edema i obično zahtjeva prekid terapije.

Razvoj sindroma nalik sistemskom lupusu rijedak je i nestaje nakon uzimanja lijeka. Jedan od rijetkih, ali ozbiljnih štetnih učinaka IFX-a jest teška jetrena reakcija koja dovodi do akutnog zatajenja jetre, demijelinizacijske bolesti, hematoloških reakcija i zatajenja srca.

U kliničkim ispitivanjima prijavljen je veći udio infekcija u pedijatrijskih bolesnika u odnosu na odrasle bolesnike. Žene generativne dobi moraju koristiti odgovarajuću kontracepciju za sprječavanje trudnoće i nastaviti je koristiti najmanje 6 mjeseci nakon primjene posljednje doze lijeka. Infliksimab prolazi kroz placentu i pronađen je u serumu dojenčadi do 6 mjeseci nakon rođenja. Nakon izlaganja infliksimabu *in utero*, dojenčad može biti pod povećanim rizikom od razvoja infekcije, uključujući ozbiljnu diseminiranu infekciju koja može dovesti do smrtnog ishoda. Ne preporučuje se primjena živih cjepiva (npr. BCG cjepiva) u dojenčadi izloženoj infliksimabu *in utero* najmanje 6 mjeseci nakon rođenja. Nije poznato izlučuje li se

---

infliksimab u majčino mlijeko niti dolazi li do sustavne apsorpcije nakon hranjenja. Budući da se humani imunoglobulini izlučuju u majčino mlijeko, žene ne smiju dojiti najmanje 6 mjeseci nakon liječenja IFX. Nema dovoljno prekliničkih podataka da bi se donio zaključak o utjecaju infliksimaba na plodnost i opću reproduktivnu funkciju (Katzung i sur., 2011; Lis i sur., 2013; Dodatak i sažetak opisa svojstava lijeka Remicade, preuzeto sa [www.halmed.hr](http://www.halmed.hr)).

---

## 2 OBRAZLOŽENJE TEME

Infliksimab (IFX) kao antagonist TNF $\alpha$  uvelike je pridonio poboljšanju liječenja i promijeni terapijske strategije kod pacijenata oboljelih od reumatskih bolesti te kroničnih upalni bolesti crijeva i kože. Primjenjuje se kod pacijenata koji su intolerantni ili ne odgovaraju na konvencionalnu terapiju, a kako je etiologija svih tih bolesti izrazito kompleksna potreba za infliksimabom, ali i drugim TNF $\alpha$  antagonistima je u velikom porastu. Tijekom terapije potrebno je lijek dozirati upravo u takvim količinama i vremenskim razmacima da se koncentracija u cirkulaciji održava stalno unutar intervala u kojem on vrši svoj farmakološki učinak. Više čimbenika utječa na održavanje terapijske doze te jako važno izmjeriti koncentraciju lijeka prije sljedeće infuzije i povezati ju s terapijskim učinkom lijeka, tj. s kliničkim odgovorom na terapiju. Ukoliko je ona ispod najmanje učinkovite koncentracije lijeka predviđa se loš terapijski ishod, odnosno ne odgovaranje pacijenta na terapiju. Terapijsko praćenje koncentracije infliksimaba uvelike pridonosi procjeni ishoda liječenja te usmjerava liječnika u modificiranju ili promijeniti terapije. Ciljne terapijske koncentracije infliksimaba iznose 3-7  $\mu\text{g/L}$ . Stabilna koncentracija se postiže 14. tjedan od započete terapije.

Cilj ovog istraživanja je utvrditi koncentracije infliksimaba kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima u ovisnosti o vremenu od započinjanja terapije te utvrditi stupanj povezanosti između koncentracije infliksimaba i kliničkog odgovora pacijenta.

Specifični ciljevi:

1. Utvrditi korelaciju između primljene doze (mg) i koncentracije IFX ( $\mu\text{g/mL}$ ) u cirkulaciji
2. Utvrditi korelaciju između tjedana od početka terapije i koncentracije IFX ( $\mu\text{g/mL}$ ) u cirkulaciji
3. Ispitati povezanost između koncentracije IFX ( $\mu\text{g/mL}$ ) u cirkulaciji i kliničkog odgovora pacijenta
4. Usporediti koncentracije IFX ( $\mu\text{g/mL}$ ) između inicijalne i faze održavanja

---

## 3 MATERIJALI I METODE

### 3.1 Uzorci

U ovom istraživanju sudjelovala su 23 bolesnika na terapiji infliksimabom različite uputne dijagnoze koji su bili u različitim fazama liječenja (inicijalna ili faza održavanja). Svi ispitanici su primali infliksimab, ali različitih trgovačkih naziva, odnosno proizvođača (Remicade, Remsima, Inflectra). Za 23 bolesnika zaprimljena su ukupno 42 uzorka venske krvi (za 19 bolesnika uzorkovanje je načinjeno prije dviju uzastopnih doza). Raspon dobi bolesnika proteže se od 20. do 61. godine. Uzorci su prikupljeni s različitih odjela KBC Sestre milosrdnice:

- Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju, Klinika za unutarnje bolesti
- Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju
- Klinika za pedijatriju

Krv je uzorkovana u epruvetu s podtlakom i dodatkom aktivatora zgrušavanja (Vacuette, Grainer Bio-One, Kremsmunster, Austrija) neposredno prije aplikacije doze. Uzorci su prikupljeni od listopada 2015. godine do siječnja 2016. godine. Odmah po uzimanju krvi uzorci su centrifugirani u laboratorijskoj centrifugi brzinom od 3500 okretaja u minuti kroz 15 minuta te je odvojen serum. Takvi uzorci pohranjeni su na temperaturi -20 °C do postupka obrade u siječnju 2016. Koncentracija infliksimaba u serumu mjerena je ELISA testom (RIDASCREEN® IFX Monitoring, R-Biopharm AG, Darmstadt, Njemačka). Korišteni test jednako vrijedno kvantificira biološki lijek Remicade, kao i bioslične lijekove Inflectru i Remsimu.

### 3.2 Postupak određivanja koncentracije infliksimaba

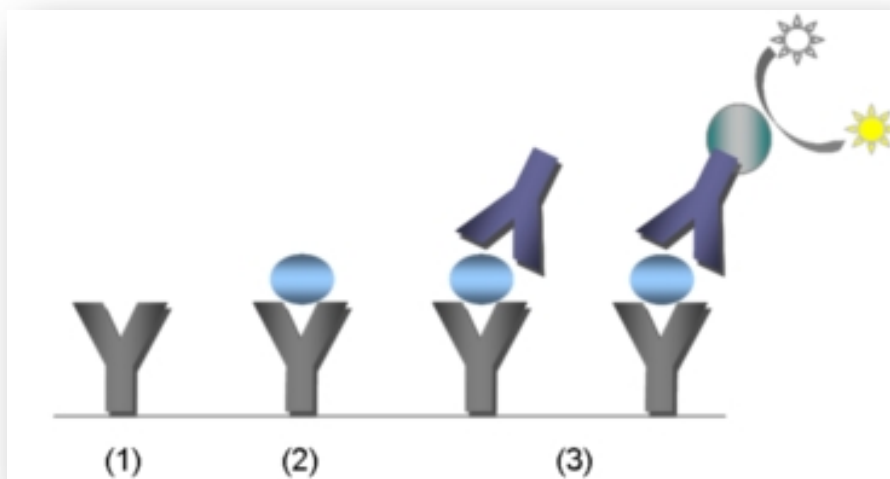
#### 3.2.1 ELISA test

ELISA je enzim-imunokemijska metoda (enzyme-linked immunosorbent assay) koja se često koristi u medicinskoj biokemiji u svrhu detektiranja raznovrsnih molekula u uzorcima tjelesnih tekućina ili homogenatima tkiva/stanica. Kao enzim-imunokemijska metoda temelji se na formiranju kompleksa antigen-protutijelo i stvaranju obojenja. Reakcija antigen-protutijelo događa se na mikrotitrskoj pločici koja može biti imobilizirana ili sa antigenom ili

---

sa protutijelom. U imunokemijskim metodama koriste se dvije vrste protutijela - poliklonalna i monoklonalna protutijela. Poliklonalna su protutijela polispecifična, a monoklonalna su protutijela veoma specifična jer prepoznaju pojedinačni epitop, svojstven pojedinoj molekuli analita. Zbog tog se svojstva u rabe kao vezna protutijela za ciljni analit (engl. *capture antibody*; novi naziv za primarna protutijela). Poliklonalna protutijela prepoznaju mnoge epitope što omogućuje detekciju više antigena koji sadržavaju zajedničke epitope. U imunokemijskim metodama služe za detekciju konačne imunokemijske reakcije pa se nazivaju detekcijskim protutijela (engl. *detection antibody*; novi naziv za sekundarna protutijela). Da bismo detektirali konačnu imunokemijsku reakciju detekcijsko protutijelo je obilježeno enzimom pa dodatkom supstrata dolazi do reakcije i stvaranja obojenog produkta. Najčešće korištene enzimi su peroksidaza hrena (engl. *horseradish peroxidase, HRP*) koja reducira vodikov peroksid i alkalna fosfataza (ALP) koja djeluje na estersku vezu između fosforne kiseline i alkohola. Supstrat izbora za ALP je p-nitrofenil fosfat koji nakon djelovanja enzima prelazi u p-nitrofenol i daje žuto obojenje u alkalnom mediju. Nakon stvaranja obojenog produkta, potrebno je zaustaviti enzimsku reakciju te očitati apsorbanciju na definiranoj valnoj duljini. Usporedbom signala uzorka s poznatim vrijednostima iz baždarne krivulje izračunavaju se kvantitativni rezultati (Dodig, 2015.).

U RIDASCREEN® IFX Monitoring za određivanje koncentracije infliksimaba koristi se sendvič enzim-imunokemijska metoda (engl. *sandwich ELISA*). Kod tipične sendvič-metode analit (antigen u pacijentovu uzorku) reagira s veznim protutijelom vezanim za čvrstu fazu, pri čemu nastaje kompleks analit-protutijelo. Nakon ispiranja dodaje se obilježeno detekcijsko protutijelo koje reagira s prvim kompleksom. Tako nastaje sendvič (čvrsti nosač-vezno protutijelo-analit-detekcijsko protutijelo). Nakon ponovnog ispiranja i dodatka odgovarajućeg supstrata nastaje obojeni produkt koji se mjeri spektrofotometrijski (Dodig, 2015.) (Slika 6.).



*Slika 6. Prikaz sendvič enzim-imunokemijske metode (preuzeto sa <http://sciencev2.orf.at/stories/1707141/>)*

U slučaju određivanja koncentracije infliksimaba na mikrotitarskoj pločici vezano je protutijelo na TNF $\alpha$ . Infliksimab iz uzorka na koji je vezan TNF $\alpha$  iz krvi pacijenta veže se na protutijelo na TNF $\alpha$  koje je imobilizirano na mikrotitarskoj pločici. Nakon inkubacije slijedi ispiranje puferom kako bi isprali nevezane biološke komponente i dodavanje monoklonskog protutijela na infliksimab koji je konjugiran sa peroksidazom hrena. Opet slijedi inkubacija pa ispiranje kako bismo uklonili višak nevezanog protutijela na IFX. Ukoliko je infliksimab prisutan u uzorku pacijenta, formira se sendvič kompleks koji se sastoji od imobiliziranog protutijela na TNF $\alpha$  na mikrotitarskoj pločici, kompleksa IFX- TNF $\alpha$  i konjugiranog protutijela. Sendvič mogu stvoriti samo oni TNF $\alpha$  koji su vezani na IFX i to je onda mjera za sadržaj IFX. Sljedeći korak je dodavanje supstrata i treća po redu inkubacija pri čemu dolazi do nastanka plavog obojenja u mikrotitarskoj pločici ako je test pozitivan, odnosno ako je IFX prisutan u uzorku. Dodavanjem stop reagensa, 0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, zaustavlja se enzimska reakcija, a boja iz plave prelazi u žutu. Apsorbancije se mjeri na 450 nm i proporcionalna je koncentraciji IFX u uzorku. Kalibracijska (baždarna krivulja) radi se iz 6 točaka standarda infliksimab-TNF $\alpha$  i na temelju kalibracijske krivulje očitavaju se rezultati, tj. koncentracije infliksimaba.



---

### 3.2.2 Reagensi

- Mikrotitarska pločica sa 96 jažica , 12 redova po 8 jažica
- Standardi od 1 do 6 , koncentracijski raspon 0 /5 /10 /20 /60 / 120 ng/ml, sadrže  $\text{NaN}_3$ , volumen 1300  $\mu\text{l}$
- Niska pozitivna kontrola (*engl. low control*) , sadrži 30 ng/ml IFX i 0.09 %  $\text{NaN}_3$ , volumena 1300  $\mu\text{l}$
- Pozitivna kontrola, sadrži 70 ng/ml IFX i 0.09 %  $\text{NaN}_3$ , volumena 1300  $\mu\text{l}$
- Diluent/otapalo volumena 100 ml, sadrži 0.09 %  $\text{NaN}_3$
- Monoklonalno protutijelo na IFX konjugirano sa peroksidazom hrena, volumen 12 ml
- Supstrat koji sadrži vodikov peroksid i kromogen tetrametilbenzidin, volumen 12 ml
- Pufer za ispiranje (*engl. wash buffer*), razrjeđenje 20x, sadrži fosfatni pufer i otopinu NaCl, detergente i antimikrobne agense, volumen je 50 ml
- Stop reagens, 0.5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , volumena 6 ml
- 2 pokrova za ELISA mikrotitarsku ploču

### 3.2.3 Postupak određivanja infliksimaba

1. Koncentrat otopine za ispiranje ( wash buffer) volumena 50 ml razrijediti sa destiliranom vodom do volumena 1000 ml
2. Pripremiti razrjeđenja uzoraka:
  - Uzorak se razrijedi sa diluentom (*engl. sample dilution buffer*) u omjeru 1:100, tj. 10  $\mu\text{l}$  uzorka se razrijedi sa 990  $\mu\text{l}$  diluenta. U daljnjem radu koristi se 100  $\mu\text{l}$  tog diluiranog uzorka. Ako je uzorak razrijeđen u omjeru 1:100, mogu se odrediti koncentracije IFX između 0.5-12  $\mu\text{g/ml}$ .
  - Ukoliko nam koncentracija u uzorku premašuje 12  $\mu\text{g/ml}$ , uzorak se razrijedi sa diluentom (*engl. sample dilution buffer*) u omjeru 1:400. Prvo se 10  $\mu\text{l}$  uzorka razrijedi sa 390  $\mu\text{l}$  diluenta i dobije se otopina uzorka i diluenta razrijeđena u omjeru 1:40. Nakon toga 100  $\mu\text{l}$  te već razrijeđene otopine uzorka i diluenta razrijedimo sa 900  $\mu\text{l}$  diluenta tj. napravimo razrjeđenje u omjeru 1:10. U daljnjem radu koristi se 100  $\mu\text{l}$  te konačne otopine. Sa razrjeđenjem 1:400 mogu se odrediti koncentracije IFX između 2-48  $\mu\text{l/ml}$ .
3. Odrediti broj mikrotitarskih jažica za standarde, kontrole i uzorke. Preporuča se raditi analizu u duplikatu ukoliko je to moguće.

- 
4. Nakon što smo odredili broj mikrotitarskih jažica koje su nam potrebne nanosimo naše standarde, kontrole i uzorke te inkubiramo 1 sat na 37 °C, pločicu prekrijemo adhezivnom folijom
  5. Zatim slijedi prvo ispiranje mikrotitarske pločice pet puta koristeći 300 µl pufera za ispiranje (Wash buffer)
  6. Dodavanje 100 µl konjugata (monoklonsko protutijelo + enzim) te inkubacija 30 minuta na 37 °C, pločicu prekrijemo adhezivnom folijom
  7. Drugo ispiranje- pet puta koristeći 300 µl pufera za ispiranje (Wash buffer)
  8. Treća inkubacija nakon dodavanja 100 µl supstrata (tetrametilbenzidina) na 37 °C u mraku 10 minuta
  9. Dodavanje 50 µl stop reagensa u svaku jažicu
  10. Pažljivo promiješati i mjeriti apsorbanciju na 450 nm

### **3.2.4 Izračunavanje koncentracije infliksimaba**

Nakon očitavanja apsorbancije standarda konstruira se baždarna krivulja sa poznatim apsorbancijama na ordinati i koncentracijama infliksimaba na apscisi. Za određivanje koncentracije infliksimaba iz uzorka, potrebno je na ordinati pronaći dobivenu apsorbanciju za uzorak i povući horizontalnu crtu te na presjecištu sa standardnom krivuljom povući okomicu na apscisu i očitati koncentraciju za određeni uzorak. Tijekom samog ELISA postupka, uzorci su bili razrijeđeni 1:100 ili 1:400, stoga se koncentracije očitane iz standardne krivulje moraju pomnožiti sa jednim od faktorom razrjeđenja ( x100 ili x400).

### **3.3 Statističke metode**

Za prikaz rezultata i statističku obradu podataka korišteni su računalni programi Excel 2010, Microsoft Office (Microsoft, SAD) i MedCalc v.10.1.2. (MedCalc Software, Mariakerke, Belgija). Metodom deskriptivne statistike prikazani su dobiveni podaci o ispitivanoj skupini, a skupovi podataka ispitani su D'Agostino-Pearsonovim statističkim testom na normalnost raspodjele. Za testiranje podataka koji ne slijede Gaussovu raspodjelu primijenjeni su neparametrijski testovi za usporedbu medijana te za korelacijsku analizu – Mann-Whitney test i Spearmanov test. Statistička značajnost utvrđivana je kod svih testiranja na razini  $P < 0,05$ .

---

Koeficijent korelacije tumačen je prema Coltonu (Tablica 1.). Rezultati su prikazani tablično i grafički.

*Tablica 1. Tumačenje koeficijenta korelacije  $r$  prema Coltonu*

<b>Koeficijent korelacije</b>	<b>Povezanost</b>
0 do $\pm 0,25$	nema povezanosti
$\pm 0,26$ do $\pm 0,50$	slaba povezanost
$\pm 0,51$ do $\pm 0,75$	umjereno do dobra povezanost
$\pm 0,76$ do $\pm 1$	dobra do izvrsna povezanost

## 4 REZULTATI

### 4.1 Deskriptivna statistička analiza

U istraživanju su sudjelovala 23 bolesnika. Ukupno smo imali 42 uzorka (mjerena) zato jer je u vremenu istraživanja 19 bolesnika primilo dvije uzastopne doze. U Tablici 2. prikazan je broj bolesnika i uzoraka u odnosu na pripadnost klinici KBC Sestre milosrdnice gdje su bolesnici liječeni.

*Tablica 2. Broj bolesnika i uzoraka po odjelima.*

<b>Klinika</b>	<b>Broj bolesnika (N)</b>	<b>Broj uzoraka (N)</b>
<b>Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju</b>	9	16
<b>Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju</b>	13	25
<b>Klinika za pedijatriju</b>	1	1
<b>Ukupno</b>	23	42

Bolesnici su liječeni od crijevnih i reumatskih upalnih bolesti. Tablica 3. rasčlanjuje broj bolesnika u odnosu na dijagnozu.

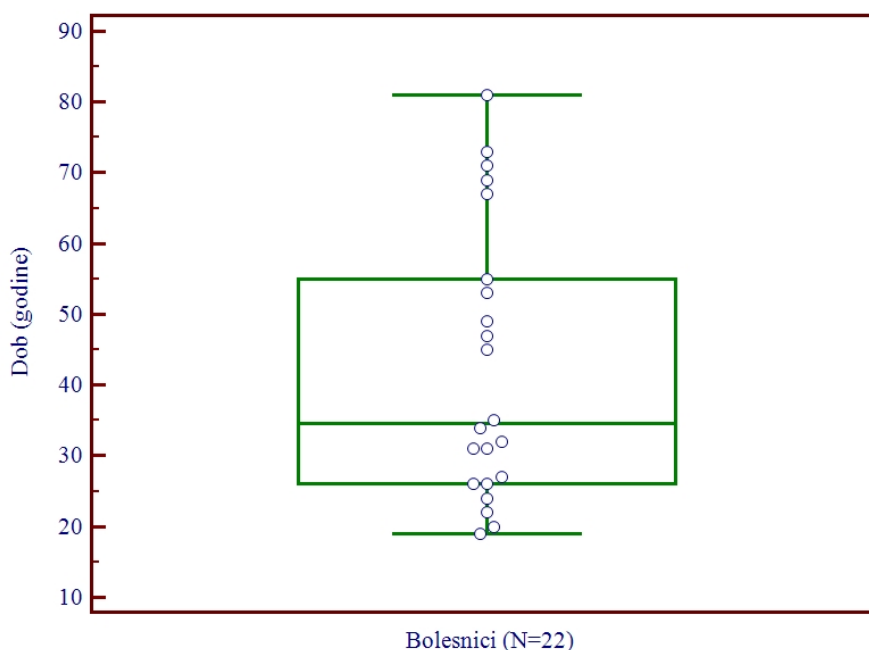
*Tablica 3. Raspodjela bolesnika ovisno o dijagnozi.*

<b>Dijagnoza</b>	<b>Broj bolesnika (N)</b>
<b>Arthritis psoriatica</b>	1
<b>Arthritis rheumatoides</b>	6
<b>Chronova bolest</b>	9
<b>Colitis ulcerosa</b>	5
<b>Spondylitis ankylosans</b>	2
<b>Ukupno</b>	23

Bolesnici su činili široku dobnu skupinu od 19 do 81 godine koja ne prati normalnu distribuciju po Gaussu te skupinu opisuje medijan s pripadajućim interkvartilnim rasponom, minimalnim i maksimalnim vrijednostima (Slika 7.). Tablica 4. prikazuje medijane životne dobi bolesnika s interkvartilnim rasponom u odnosu na pripadnost klinici na kojoj se liječe.

Tablica 4. Životna dob bolesnika prema klinikama gdje su liječeni

Klinika	Medijan životne dobi bolesnika (interkvartilni raspon)
Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju	61 (41-70)
Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju	31 (26-46)
Klinika za pedijatriju	20
<b>Ukupno</b>	<b>35 (26-55)</b>



Slika 7. Prikaz raspodjele bolesnika po dobi

Obrađena su 23 bolesnika, ali za jednog pacijenta nismo dobili informaciju o godini rođenja pa ukupan broj pacijenata koji su prikazani na Box and Whisker grafu iznosi 22.

Bolesnici su primali tri tipa lijeka od kojih je Remicade izvorni biološki lijek dok su Inflectra i Remisma bioslični lijekovi istog djelovanja kao i Remicade. Tablica 5. prikazuje udio primijenjenoga lijeka u odnosu na Kliniku gdje se bolesnici liječe. Biokemijski ELISA test jednakovrijedno kvantificira sve tri vrste lijeka. Doze apliciranog lijeka iznosile su od 186 do 500 mg po bolesniku s prosječnom vrijednosti (medijanom) 213, odnosno 400 mg (Tablica 6.)

*Tablica 5. Trgovački naziv primijenjenog lijeka infliksimaba*

<b>Klinika</b>	<b>Inflectra (N)</b>	<b>Remicade (N)</b>	<b>Remsima (N)</b>
<b>Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju</b>	16	0	0
<b>Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju</b>	11	11	3
<b>Klinika za pedijatriju</b>	0	1	0
<b>Ukupno</b>	27	12	3

IFX - infliksimab

*Tablica 6. Doza infliksimaba aplicirana bolesnicima*

<b>Klinika</b>	<b>Doza (mg)</b>
<b>Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju</b>	213 (186-500)
<b>Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju</b>	400 (250-500)
<b>Klinika za pedijatriju</b>	350
<b>Ukupno</b>	325 (186-500)

IFX – infliksimab; doza lijeka izražena je kao medijan s minimalnim i maksimalnim dozama

## 4.2 Koncentracija infliksimaba u krvi u odnosu na faze liječenja i intervale aplikacije lijeka

Najveći broj bolesnika bio je u fazi održavanja, što znači da su primali lijek u više od tri navrata, odnosno da su na terapiji više od 14 tjedana. U inicijalnoj fazi bilo je svega 9 bolesnika od kojih je uzeto 16 uzoraka krvi prije aplikacije nove doze lijeka (Tablica 7.).

Tablica 7. Broj uzorkovanja krvi u odnosu na fazu liječenja

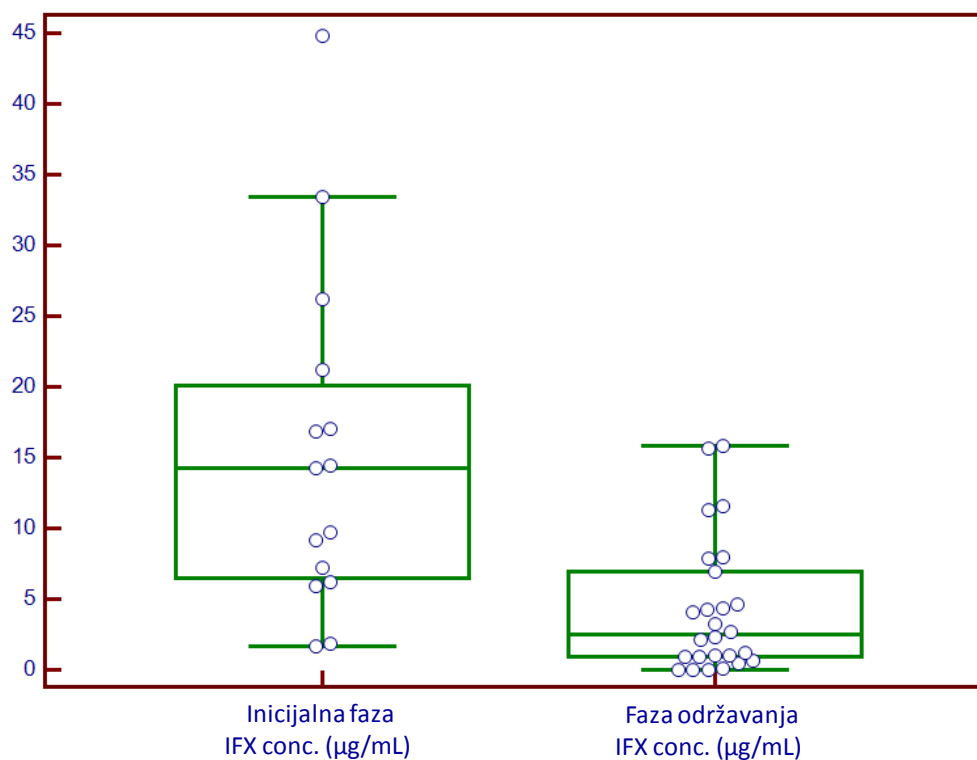
Klinika	Inicijalna	Održavanje
Klinika za reumatologiju, fizikalnu medicinu i rehabilitaciju	12	4
Klinika za unutarnje bolesti, Zavod za gastroenterologiju i hepatologiju	4	21
Klinika za pedijatriju	0	1
<b>Ukupno</b>	<b>16</b>	<b>26</b>

U ukupno 42 uzorka seruma izmjerene su koncentracije IFX. Prikazane su u Tablici 8., kao medijani s interkvartilnim rasponom za inicijalnu fazu i za fazu održavanja s pripadajućom vrijednosti P. Testiranje značajnosti razlike temelji se na neparametrijskom Mann-Whitney testu neovisnih uzoraka koji je pokazao da je koncentracija IFX značajno viša u inicijalnoj fazi u odnosu na fazu održavanja (P=0,0003).

Tablica 8. Koncentracija infliksimaba po fazama liječenja.

	Inicijalna faza N=16	Održavanje terapije N=26	P
<b>Infliksimab (µg/mL)</b> medijan (interkvartilni raspon)	14,2 (6,5-20,1)	2,47 (0,9-6,9)	0,0003

Slika 8. grafički prikazuje distribuciju svih koncentracija IFX, od minimalne do maksimalne koncentracije s pripadajućim medijanom i interkvartilnim rasponom.



Slika 8. Koncentracija infliksimaba u krvi prema fazama liječenja

### 4.3 Povezanost koncentracije lijeka u krvi s dozom, duljinom terapije i kliničkim odgovorom

Ispitane su moguće povezanosti izmjerene serumske koncentracije IFX s dozom i tjednima terapije. Statistička analiza korelacije provedena je Spearmanovim neparametrijskim testom.

Tablica 9. Povezanost koncentracije infliksimaba s apliciranom dozom i s tjednima trajanja terapije

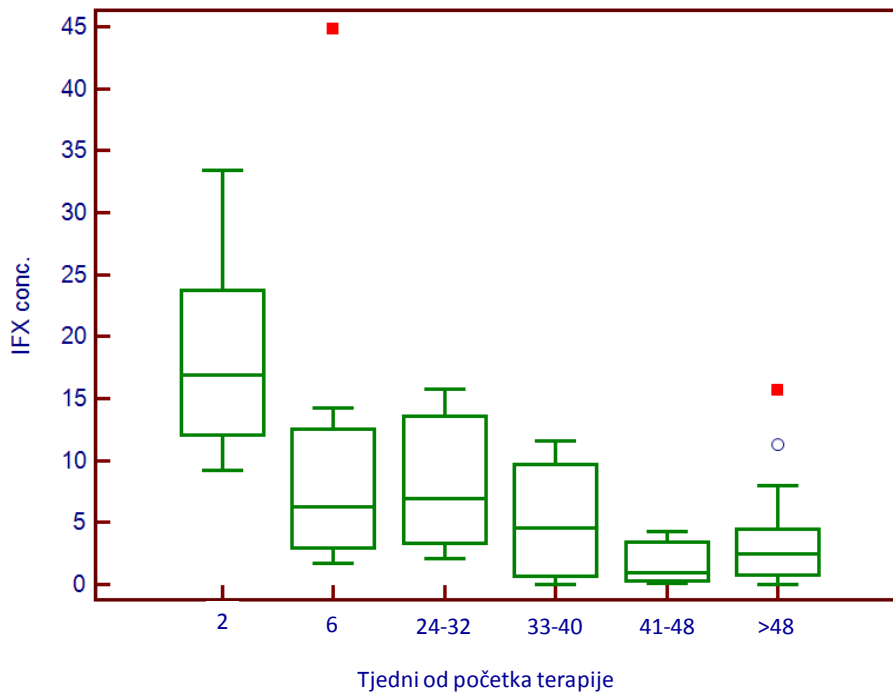
	Inflksimab (µg/mL)		
	r	P	Interpretacija*
<b>Doza (mg)</b>	-0,135	0,400	Nema povezanosti
<b>Tjedan terapije (tj)</b>	-0,57	<0,001	Negativna povezanost

r = koeficijent korelacije; \*interpretacija koeficijenta korelacije prema Coltonu (Tablica 1.)

Nije pronađena korelacija između doze i koncentracije lijeka ( $r=-0,14$ ;  $P=0,40$ ), dok je



pronađena negativna korelacija između koncentracije lijeka i tjedana trajanja terapije ( $r=-0,57$ ;  $p<0,001$ ) što upućuje na zaključak da koncentracija u krvi opada s duljinom trajanja liječenja (Tablica 9.). Slika 9. prikazuje koncentracije IFX ( $\mu\text{g/mL}$ ) rasčlanjeno po tjednima terapije.



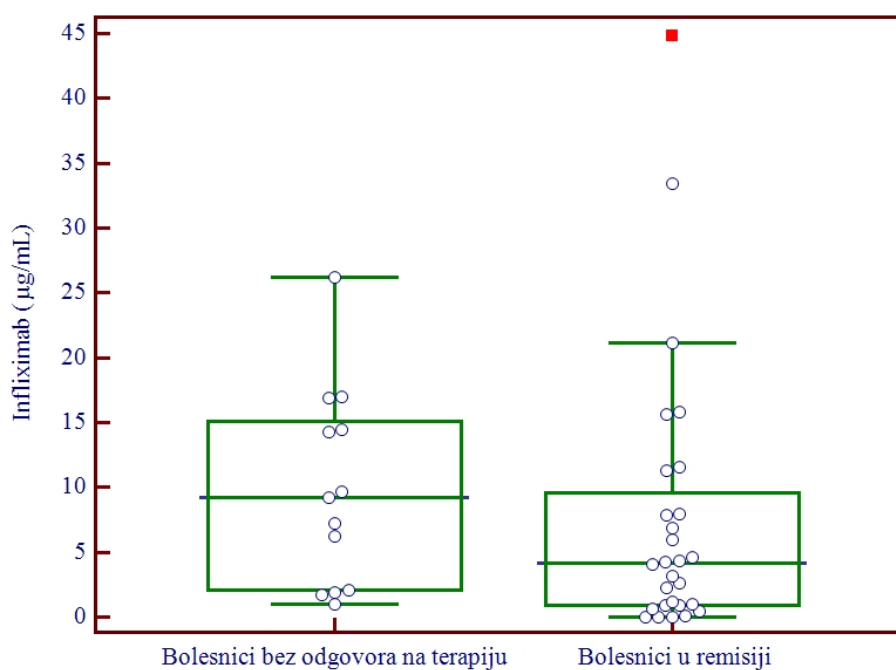
Slika 9. Koncentracija infliksimaba po tjednima od početka terapije

Za potrebe testiranja povezanosti serumske koncentracije IFX s odgovorom na terapiju, skupina bolesnika koja nije imala klinički odgovor ( $N=2$ ) pridružena je skupini s djelomičnim kliničkim odgovorom ( $N=11$ ). Nije nađena statistički značajna razlike u koncentraciji infliksimaba između bolesnika s djelomičnim odgovorom/bez odgovora i bolesnika s kliničkom remisijom ( $P=0,110$ ). Rezultati su prikazani u Tablici 10. Promatrajući samo medijane (9,20 vs. 4,17) čini se da postoji razlika, ali statistička analiza odbacuje značajnost jer se u interkvartilnom rasponu koncentracije u velikoj mjeri preklapaju (Slika 10.). Razlog vjerojatno leži u činjenici da je u ispitivanje uključen mali broj ispitanika koji nisu imali adekvatan klinički odgovor.

Tablica 10. Klinički odgovor na terapiju i koncentracija lijeka

Klinički odgovor	Infliksimumab ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Medijan (interkvartilni raspon)	
Nema odgovora (N=2)	9,5 (2,1-16,9)	*P=0,110
Djelomičan odgovor (N=11)	9,2 (3,0-14,4)	
Remisija (N=29)	4,17 (0,9-9,6)	

\*P se odnosi na usporedbu serumske koncentracije lijeka kod bolesnika u remisiji (N=29) prema ostalima koji su imali djelomičan ili negativan odgovor na terapiju(N=13)



Slika 10. Koncentracija infliksimumaba u krvi bolesnika bez odgovora na terapiju (N=13) i u bolesnika u remisiji (N=29)

---

## 5 RASPRAVA

Infliksimumab, kao biološki lijek, pokrenuo je revoluciju u liječenju upalnih bolesti crijeva, kože i reumatskih bolesti. Razumijevanje njihove patofiziologije te slijeda inflamatorne kaskade dovelo je do otkrića lijekova (biologika) koji mogu selektivno djelovati na određenu molekulu ili signalni put te ispraviti neravnotežu proinflammatornih i antiinflammatornih medijatora. Kako se pokazalo da je TNF $\alpha$  jedan od ključnih citokina u patofiziologiji ovih oboljenja infliksimumab, koji ciljano djeluje na TNF $\alpha$ , pokazao se kao lijek koji može inducirati remisiju i uvelike poboljšati kvalitetu života pacijenata. Iako infliksimumab ne liječi uzroke spomenutih bolesti, koji su još uvijek nedefinirani, znanje o uključenosti citokina u etiopatogenezu dalo je poticaj razvoju bioloških lijekova (Taxonera i sur., 2014) Istraživanja pokazuju da je moguće primijeniti biološke lijekove i u drugim bolestima te dokazuju primjerice opravdanost u terapiji neinfekcijskih uveitisa, posebice kada nema odgovora na kortikosteroidnu i imunosupresivnu terapiju (Sharma i sur., 2007).

Ono što se nameće kao problem je sama činjenica da on spada u skupinu bioloških lijekova čija je struktura, način proizvodnje i djelovanje puno složenije u odnosu na takozvane „male molekule“ dobivene kemijskim putem. Po isteku patenta izvornog biološkog lijeka na tržištu se javljaju i bioslični lijekovi koji su kopije izvornog biološkog lijeka. Oni bi trebali imati jednaku efikasnost i sigurnost kao i izvorni biološki lijek, ali problem je što prilikom njihova dolaska na tržište, zbog malog broja ispitanika u kliničkim istraživanjima, nema dovoljno informacija o farmakodinamici i učinkovitosti. Sam način proizvodnje nije identičan izvornom biološkom lijeku jer proizvođači izvornih biologika ne daju informacije o proizvodnom postupku. Veličina molekule i složenost strukture izvornih biologika i biosimilara otežava predviđanje njihove terapijske ekvivalentnosti zbog mogućnosti da i najmanje promjene nastale u postupku proizvodnje za posljedicu imaju značajne razlike u kliničkoj učinkovitosti i imunogeničnosti. Biosimilari koji su djelotvorni u jednoj indikaciji ne moraju nužno biti djelotvorni u drugoj indikaciji za koju je originalni lijek odobren. To je osobito važno ako se lijek u različitim indikacijama primjenjuje u drugoj dozi ili s drugom pratećom terapijom. Zbog svega toga sve veća primjena bioloških lijekova, odnosno biosličnih lijekova dovodi do brojnih nedoumica. Nedvojbeno je da bi se primjenom biosličnih lijekova doprinijelo održivosti zdravstvenog sustava jer su jeftiniji te bi se omogućio pristup lijeku većem broju bolesnika. Bez obzira na to uvijek treba imati na umu da je bolesnik u središtu sustava zdravlja, u kojem je dobrobit bolesnika na prvom mjestu, stoga

---

terapijski postupci kojima se bolesnici podvrgavaju moraju biti indicirani temeljem smjernica, a odluka o odabiru postupka i lijeka mora biti utemeljena na jasnim znanstvenim dokazima, uz bolesnikov informirani pristanak (Danese i Gomollon, 2013). Opsežno istraživanje kroz godinu dana na 168 bolesnika s reumatoidnim artritismom pokazalo je da je terapijski ishod s 4 različita biološka, odnosno bioslična lijeka podjednako djelotvoran (Gavrila i sur., 2015).

Unatoč dokazima o učinkovitosti infliksimaba (biologika) neki pacijenti ne odgovore na terapiju nakon indukcijske faze (primary non-responders), a neki izgube odgovor tokom terapije održavanja (secondary non-responders). Gubitak i nedostatak terapijskog odgovora je multifaktorijalan i povezuje se sa imunološkim stanjem pacijenta, polimorfizmom gena za TNF $\alpha$ , samim lijekom, razvojem antitijela na lijek, konkomitantnom terapijom (Levin i Shibolet, 2008). Upravo zbog sve te problematike preporuča se terapijsko praćenje koncentracije infliksimaba kako bi mogli optimizirati terapiju u odnosu na svakog pacijenta posebno tj. omogućiti individualizirani pristup svakom pacijentu. Smatra se da bi terapijskim praćenjem koncentracije infliksimaba mogli prevenirati gubitak odgovora tokom terapije održavanja kod pacijenata koji su prvotno odgovorili na terapiju jer bi na osnovu nje mogli predvidjeti mogući klinički ishodi te pravovaljano djelovati. Koncentracija koju mjerimo je koncentracija infliksimaba prije sljedeće infuzije (engl. trough concentration) (Amiot i Peyrin-Biroulet, 2015)..

Zdravstveni je sustav svjestan ekonomskih teškoća u primjeni bioloških lijekova, a li nalazi opravdanost i konačnu korist jer unapređuje kvalitetu života bolesnika s kroničnim upalnim bolestima, smanjuje duljinu boravka u bolnici i broj hitnih kolektomija (Black i sur., 2012; Kedia i sur., 2014).

U ovom istraživanju sudjelovala su 23 ispitanika (ukupno 42 uzorka). Za njih 19 uzorkovanje je provedeno prije dvije uzastopne doze. Jedan od ciljeva bio je ispitati korelaciju između koncentracije infliksimaba ( $\mu\text{g/mL}$ ) u cirkulaciji i kliničkog odgovora pacijenta. Prilikom testiranja, skupinu bolesnika koja nije imala klinički odgovor pridružili smo skupini s djelomičnim kliničkim odgovorom. Nismo dobili statistički značajnu razliku u koncentraciji infliksimaba između bolesnika s djelomičnim odgovorom/bez odgovora i bolesnika s kliničkom remisijom ( $P=0,110$ ), iako su medijani različiti (*Tablica 10.*). Ipak statistički gledano medijani se ne razlikuju jer se u interkvartilnom rasponu koncentracije preklapaju. Kao što sam navela u prethodnom poglavlju najvjerojatniji razlog je u tome što je u istraživanju sudjelovao mali broj ispitanika koji nisu imali adekvatan klinički odgovor.

---

Što se tiče objavljene literature navodi se kako je niska koncentracija infliksimaba mjerena prije sljedeće infuzije povezana sa lošim kliničkim odgovorom na terapiju i predstavlja opasnost za gubitak odgovora za one pacijente koji su u početku odgovorili na terapiju (Casteleei sur., 2014). Castelee navodi kako je koncentracija infliksimaba veća od 2.79  $\mu\text{g/ml}$  povezana sa remisijom, dok se sve vrijednosti ispod povezuju sa nedostatnim odgovorom na terapiju ili gubitkom odgovora te povećanim stvaranjem antitijela. Antitijela na sam infliksimaba uzrokuju povećan klirens lijeka i jedan su od važnih uzroka niske serumske koncentracije infliksimaba (Castelee i sur., 2014.; Pallagi-Kunstár i sur., 2014.). U našem istraživanju nismo ispitivali prisutnost antitijela na infliksimab, ali ukoliko se želi što bolje modificirati i optimizirati terapija poželjno je uz praćenje koncentracije infliksimaba pratiti i koncentraciju antitijela. Iako treba naglasiti da neki istraživači navode da nisu sva antitijela povezana s pogoršanjem kliničkog odgovora jer mogu biti prolazna, a ne perzistirajuća (Miheller i sur., 2011; Nanda i sur., 2013). U literaturi se navodi kako je za bolje predviđanje aktivnosti bolesti uz koncentraciju infliksimaba, antitijela na IFX, korisno i pratiti koncentraciju CRP-a (reaktanta akutne faze), sedimentaciju eritrocita i kalprotektin u fecesu (Leitner i Vogelsang, 2016). Veće koncentracije CRP-a povezane su sa niskim koncentracijama infliksimaba što rezultira lošijem ishodu terapije (Castelee i sur., 2014.; Adedokun i sur., 2014.; Steenholdt i sur., 2011.; Akiho i sur., 2015.).

Ispitivanjem korelacije između doze i koncentracije infliksimaba nismo dobili nikakvu povezanost što je u suprotnosti sa literaturnim podacima. Adedokun i suradnici su ispitivali koncentracije u 8., 30. i 54. tjednu, s time da su jednoj skupini aplicirali 5 mg/ml infliksimaba, a drugoj 10 mg/mL. Ono što se pokazalo jest da uspoređujući koncentracije između dviju skupina oni koji su primali više koncentracije lijeka imali su veće koncentracije infliksimaba u krvi u sva tri mjerenja (8., 30., 54. tjedan). Također se pokazalo da oni koji su pokazali povoljan klinički odgovor (neovisno o apliciranoj dozi) u pravilu su imali veće koncentracije od onih što nisu odgovorili na terapiju ili su tijekom faze održavanja izgubili odgovor. Navode kako je koncentracija infliksimaba mjerena u 14. tjednu, kada se postiže stabilna koncentracija infliksimaba, povezana sa kliničkim odgovorom u fazi održavanja. Takve rezultate podupire i istraživanje Proberta i suradnika.

Uspoređujući koncentracije infliksimaba između inicijalne i faze održavanja dobili smo značajne razlike, odnosno koncentracija IFX u inicijalnoj je veća (14.2  $\mu\text{g/ml}$ ) nego u fazi održavanja (2.47  $\mu\text{g/ml}$ ). To možemo povezati i sa ispitivanjem korelacije između koncentracije infliksimaba ( $\mu\text{g/ml}$ ) i tjedana od početka terapije gdje smo dobili negativnu

---

korelacije što znači da što dulje pacijent prima terapiju njegova koncentracija u krvi je manja tj. vremenski opada. Adedokun i suradnici prikazuju isto opadanje koncentracije infliksimaba u krvi s duljinom primanja terapije iako mjerenja u 54. tjednu pokazuju veliku sličnost sa onima u 30. tjednu. Istraživanja Papamichaela i suradnika 2015. pokaza su pak da koncentracija infliksimaba u krvi korelira s brzim cijeljenjem crijevne mukoze u indukcijskoj fazi terapije. Na osnovu našeg istraživanja ne možemo reći kako bi se ponašala koncentracija infliksimaba u 54. tjednu zbog malog broja uzorka.

Ono što možemo zaključiti uspoređujući inicijalnu fazu i fazu održavanja jest to da veću koncentraciju infliksimaba u inicijalnoj fazi možemo povezati sa činjenicom da tada još nije postignuta dinamička ravnoteža lijeka tj. stabilna koncentracija lijeka. Odnosno, brzina eliminacije lijeka nije ekvivalentna brzini ulaska što je nama zapravo terapijski cilj jer tek tada, s postignutom adekvatnom koncentracijom u krvi, lijek postiže terapijski učinak.

S biokemijskog stajališta treba spomenuti da se ELISA testovi u najširem smislu primjenjuju za kvantifikaciju infliksimaba te da su na tržištu različiti proizvođači koji pokazuju usporedive rezultate (Maličkova i sur., 2016), a što je vrlo pozitivno za kliničku praksu. No, ELISA testovi nisu prikladni za pojedinačna određivanja. Važnost praćenja terapije biološkim lijekovima potiče inovacije u tehnologiji i biokemijskim metodama koje će biti prikladne za brza i pouzdana pojedinačna mjerenja koncentracije lijeka. Primjerice, razvijaju se brze metode na principu biosenzora s optičkim vlaknima (Lu i sur., 2016).

---

## 6 ZAKLJUČCI

Određivanjem koncentracije infliksimaba u serumu pacijenata oboljelih od kroničnih crijevnih i reumatskih upalnih bolesti možemo zaključiti:

- Postoje značajne razlike između koncentracije infliksimaba u inicijalnoj fazi od koncentracije u fazi održavanja
- Nije pronađena korelacija između doze i koncentracija lijeka u serumu
- Pronađena je negativna korelacija između koncentracije infliksimaba i tjedna od započinjanja terapije
- Nema statistički značajne razlike u koncentraciji infliksimaba između bolesnika s djelomičnim odgovorom/bez odgovora i bolesnika s kliničkom remisijom
- Kod bolesnika u inicijalnoj fazi liječenja (0-14 tjedan) koncentracija infliksimaba bila je statistički značajno viša nego kod bolesnika kod kojih je postignuto stanje ravnoteže (nakon 14. tjedna)
- Za pravilnu interpretaciju rezultata terapijskog praćenja koncentracije infliksimaba, neophodno je načiniti mjerenje nakon 14 tjedna kad su postignute stabilne koncentracije lijeka u krvi. Prerano uzorkovanje može dovesti do lažno pozitivnog nalaza i pogrešne interpretacije.
- Procjena uspješnosti terapije nepotpuna je bez određivanja protutijela na infliksimab koja se pojavljuju u nekih bolesnika, a što iziskuje promjenu terapije.

---

## 7 LITERATURA

1. Adedokun OJ, Sandborn WJ, Feagan BG, Rutgeerts P, Xu Z, Marano CW. et al. Association Between Serum Concentration of Infliximab and Efficacy in Adult Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*, 2014, 147, 1296–1307
2. Amiot A, Peyrin-Biroulet L. Current, new and future biological agents on the horizon for the treatment of inflammatory bowel diseases. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2015, 8, 66-82
3. Andreis I, Batinić D, Čulo F, Gračević D, Lukinović-Škudar V, Marušić M, Taradi M, Višnjic D. *Imunologija*. Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str.126-130
4. Biološka terapija, Crohnova bolest, Ulcerozni kolitis, 2015, <http://www.hucuk.hr>, pristupljeno 5.6.2016.
5. Black C, Fan T, Jakopin Ž, Draskovic J. Budget impact model of infliximab for the treatment of steroiddependent, steroid-refractory and acute ulcerative colitis in the Republic of Croatia. *Value in Health*, 2012, 15, A 136
6. Bremer E. Targeting of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily for Cancer Immunotherapy. *ISRN Oncology*, 2013, 25 stranica
7. Castele NV, Khanna R, Levesque BG, Stitt L, Zou GY, Singh S, et al. The relationship between infliximab concentrations, antibodies to infliximab and disease activity in Crohn's disease. *Gut*, 2014, 0, 1-7
8. Conti F, Ceccarelli F, Massaro L, Cipriano E, Di Franco M, Alessandri C, Spinelli FR, Scivo R, Valesini G. Biological therapies in rheumatic diseases. *Clinical Therapeutics*, 2013, 164, e413-428
9. Damjanov N, Vojinović J. Biologic Therapy of Rheumatoid Arthritis. *Serbian Archives of Medicine*, 2009, 137, 205-210
10. Danese S, Gomollon F. ECCO position statement: The use of biosimilar medicines in the treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2013, 7, 586-589
11. Dodig S, *Imunologija*, Zagreb, Medicinska naklada 2015, 66, 67, 73, 74, 151
12. D Roger S. Biosimilars: How similar or dissimilar are they?. *Nephrology*, 2006, 11, 341–346
13. Ebbers HC. Biosimilars: In support of extrapolation of indications. *Journal of Crohn's and Colitis*, 2014, 8, 431-435



- 
14. Fassbender HG, Meyer-Scholten C, Zorn K. Klinička slika reumatoidnog artritisa-kompleks triju neovisnih mehanizama. *Reumatizam*, 2009, 56, 3 stranice
  15. Faustman D, Davis M. TNF receptor 2 pathway: drug target for autoimmune diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010, 9, 482-493
  16. Feagan BG, Choquette D, Ghosh S, Gladman DD, Ho V, Meibohm B, et al. The challenge of indication extrapolation for infliximab biosimilars. *Biologicals*, 2014, 42, 177-183
  17. Gavrilă BI, Ciofu C, Stoica V, Panaitescu E. The efficiency of biologic therapy in a group of patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Medicine and Life* 2015, 8, 79-84
  18. Guerra I, Bermejo F. Management of inflammatory bowel disease in poor responders to infliximab. *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 2104, 7, 359-367
  19. Jurjus A, Eid A, Al Kattar S, Zeenny MN, Gerges-Geagea A, Haydar H, et al. Inflammatory bowel disease, colorectal cancer and type 2 diabetes mellitus: The links. *BBA Clinical*, 2016, 5, 16–24
  20. Katzung GB, Masters BS, Trevor JA. Temeljna i klinička farmakologija, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 633, 644, 1087, 1088, 1091, 1092, 1093
  21. Kedia S, Ahuja V, Tandon R. Management of acute severe ulcerative colitis. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 2014, 5, 579-588
  22. Leitner GC, Vogelsang H. Pharmacological- and non-pharmacological therapeutic approaches in inflammatory bowel disease in adults. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 2016, 7, 5-20
  23. Levin A, Shibolet O. Inl iximab in ulcerative colitis. *Biologics:Targets & Therapy*, 2008, 2, 379–388
  24. Lis K, Kuzawińska O, Bałkowiec-Iskra E. Tumor necrosis factor inhibitors – state of knowledgE. *Archives of Medical Science*, 2014, 10, 1175-1185
  25. Lu J, Van Stappen T, Spasic D, Delpont F, Vermeire S, Gils A, Lammertyn J. Fiber optic-SPR platform for fast and sensitive infliximab detection in serum of inflammatory bowel disease patients *Biosensors and Bioelectronics*. 2016, 79, 173-179.
  26. Male D, Brostoff J, Roth BD, Roitt I. Immunology. United Kingdom, Elsevier, 2013., str. 113
  27. Malíčková K, Ďuricová D, Bortlík M, Hind'oš M, Machková N, Hrubá V. et al. Serum trough infliximab levels: A comparison of three different immunoassays for the

- 
- monitoring of CT-P13 (infliximab) treatment in patients with inflammatory bowel disease. *Biologicals*, 2016, 44, 33-36.
28. Marušić M, Mihaljević S. Farmakologija bioloških lijekova. *Acta Medica Croatica*, 2013, 67, 125-130
29. McCamish M, Woollett G. Worldwide experience with biosimilar development. *MAbs*, 2011, 3, 209-217
30. Miheller P, Kiss LS, Lorinczy K, Lakatos PL. Anti-TNF trough levels and detection of antibodies to anti-TNF in inflammatory bowel disease: are they ready for everyday clinical use? *Expert opinion on Biological Therapy*, 2011, 12, 179-182
31. Monitoring biological drugs, 2014, <http://www.progenika.com>, pristupljeno 20.6.2016
32. Moss AC, Brinks V, Carpenter JF. Review article: immunogenicity of anti-TNF biologics in IBD – the role of patient, product and prescriber factors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 38: 1188–1197
33. Nanda KS, Cheifetz AS, Moss AC. Impact of Antibodies to Infliximab on Clinical Outcomes and Serum Infliximab Levels in Patients With Inflammatory Bowel Disease (IBD): A Meta-Analysis. *The American Journal of Gastroenterology*, 2013, 108, 40-47
34. Novak S, Zekić T, Ravlin-Gulan J. Liječenje reumatoidnog artritisa. *Medicina fluminensis*, 2012, 48, 414-421
35. Pallagi-Kunstár E, Farkas K, Szepes Z, Nagy F, Szűcs M, Kui R, Gyulai R. et al.. Utility of serum TNF- $\alpha$ , infliximab trough level and antibody titers in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20, 5031-5035
36. Papamichael K, Van Stappen T, Castele NV, Gils A, Billiet T, Tops S. et al. Infliximab Concentration Thresholds During Induction Therapy Are Associated With Short-term Mucosal Healing in Patients With Ulcerative Colitis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2015, S1613-1614
37. Park DI. Current status of biosimilars in the treatment of inflammatory bowel diseases. *Intestinal Research*, 2016, 14, 15-20
38. Pedersen J, Coskun M, Soendergaard C, Salem M, Nielsen OH. Inflammatory pathways of importance for management of inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, 2014, 20, 64-77
39. Prieto-Pérez R, Almoguera B, Cabaleiro T, Hakonarson H, Abad-Santos F. Association between Genetic Polymorphisms and Response to Anti-TNFs in Patients with

- 
- Inflammatory Bowel Disease, *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17, 225
40. Probert CS, Hearing SD, Schreiber S, Kühbacher T, Ghosh S, Arnott ID, Forbes A. Infliximab in moderately severe glucocorticoid resistant ulcerative colitis: a randomised controlled trial. *Gut*, 2003, 52, 998-1002.
  41. Rinaudo-Gaujous M, Paul S, Tedesco ED, Genin C, Roblin X, Peyrin-Biroulet L. Review article: biosimilars are the next generation of drugs for liver and gastrointestinal diseases. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2013, 38, 914-924
  42. Sažetak opisa svojstava lijeka, 2013, <http://www.halmed.hr>, pristupljeno 2.6.2016.
  43. Selaas O, Nordal HH, Halse AK, Brun JG, Jonsson R, Brokstad KA. Serum Markers in Rheumatoid Arthritis: A Longitudinal Study of Patients Undergoing Infliksimab Treatment. *International Journal of Rheumatology*, 2015, 9 stranica
  44. Sharma SM, Ramanan AV, Riley P, Dick AD. Use of infliximab in juvenile onset rheumatological disease associated refractory uveitis: efficacy in joint and ocular disease. *Annals of Rheumatic Diseases*, 2007, 6, 840–841
  45. Simsek I. TNF inhibitors: New and old agents for rheumatoid arthhritis. *Bulletin of the Hospital for Joint Disease*, 2010, 68, 2014-210
  46. Stav o primjeni biološki sličnih lijekova (biosimilara) u liječenju upalnih bolesti crijeva, 2015, <http://www.hucuk.hr>, pristupljeno 15.6.2016.
  47. Steenholdt C, Bendtzen K, Brynskov J, Thomsen OØ, Ainsworth MA. Cut-off levels and diagnostic accuracy of infliximab trough levels and anti-infliximab antibodies in Crohn's disease. *Scandinavian Journal Gastroenterology*, 2011, 46, 310-318
  48. St.Clair EW, Wagner CL, Fasanmade AA, Wang B, Schaible T, Kavanaugh A, Keystone EC. The Relationship of Serum Infliximab Concentrations to Clinical Improvement in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 2002, 46 , 1451–1459
  49. Štraus B, Čvorišćec D. Štrausova medicinska biokemija. Određivanje koncentracije lijekova tijekom terapije. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 605-610
  50. Taxonera C, Olivares D, Mendoza JL, Díaz-Rubio M, Rey E. Need for infliximab dose intensification in Crohn's disease and ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 2014, 20, 9170-9177
  51. Včev A, Bolesti debelog crijeva, Osijek, Grafika, 2002, str. 187-204

- 
52. Yarur AJ, Abreu MT, Deshpande AR, Kerman DH, Sussman DA. Therapeutic drug monitoring in patients with inflammatory bowel disease. *World Journal Gastroenterology*, 2014, 20: 3475-3484

---

## 8 SAŽETAK

### Terapijsko praćenje serumske koncentracije biološkog lijeka infliksimaba

Infliksimab je protuupalni lijek, odnosno kimerno monoklonsko protutijelo subklase IgG<sub>1k</sub>, koje se visokim afinitetom veže za topljivi i za membranu vezani čimbenik nekroze tumora alfa (engl. tumor necrosis factor  $\alpha$ ) te na taj način blokira vezanje TNF- $\alpha$  na receptor i ispoljavanje njegovog proupalnog učinka. Spada u skupinu bioloških lijekova. Primjenjuje se kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima crijeva, kože i reumatskim bolestima. Ciljne terapijske koncentracije lijeka iznose 3-7  $\mu\text{g/mL}$ .

Cilj ovog istraživanja je utvrditi koncentracije infliksimaba kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima u ovisnosti o vremenu od započinjanja terapije te utvrditi stupanj povezanosti između doze i koncentracije infliksimaba u odnosu na klinički odgovora pacijenta na terapiju.

U ovo prospektivno istraživanje uključena su 23 bolesnika koja boluju od kroničnih crijevnih upalnih bolesti i reumatoidnog artritisa te su na terapiji infliksimabom. Za 23 bolesnika zaprimljena su 42 uzorka seruma (za 19 bolesnika uzorkovalose se prije dviju uzastopnih doza). Srednja koncentracija infliksimaba iznosila je 4,6 (1,1-12,2)  $\mu\text{g/mL}$ . Nije pronađena korelacija između doze i koncentracije lijeka ( $r=-0,14$ ;  $P=0,40$ ), dok je pronađena negativna korelacija između koncentracije lijeka i tjedna od započinjanja terapije ( $r=-0,57$ ;  $P<0,001$ ). Kod bolesnika u inicijalnoj fazi liječenja (0-14 tjedan) koncentracija infliksimaba bila je statistički značajno viša 14,2 (6,5-20,1)  $\mu\text{g/mL}$  nego kod bolesnika kod kojih je postignuto stanje ravnoteže (nakon 14. tjedna) (2,47 (0,9-6,9)  $\mu\text{g/mL}$ ;  $P<0,001$ ). Zaključno, za pouzdanu interpretaciju terapijske koncentracije infliksimaba korisno je određivati razinu nakon inicijalne faze, odnosno nakon 14. tjedna kad se dosegne ravnotežna koncentracija lijeka.

**Ključne riječi:** infliksimab, biološka terapija, imunosupresivi, kronične upalne bolesti, praćenje koncentracije lijeka

---

## 8 SUMMARY

### Therapeutic drug monitoring of serum concentrations of infliximab

Infliximab is an anti-inflammatory drug or a chimeric monoclonal antibody of the IgG<sub>1κ</sub> subclass, which binds with high affinity to the soluble and membrane-bound form of tumor necrosis factor  $\alpha$  and thus prevents TNF- $\alpha$  from binding to its receptor and its anti-inflammatory effect. It belongs to a group of biologic drugs. It is used in patients with chronic inflammatory bowel diseases, skin and rheumatic diseases. Targeting therapeutic drug concentrations are of 3-7  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

The purpose of the study is to determine the concentrations of infliximab in patients with chronic inflammatory diseases, depending on the time of the therapy start and the degree of correlation between the dose of and the concentration of infliximab in relation to the patient's clinical response to therapy.

23 patients were included in this prospective study. The 42 serum samples were collected from the 23 patients (for 19 patients samples were collected before dosing). The mean infliximab concentration was 4.6 (1.1 to 12.2)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . No correlation was found between the drug dose and the drug concentration ( $r = -0.14$ ;  $P = 0.40$ ), while negative correlation was found between the drug concentration and the week from the therapy start ( $r = -0.57$ ;  $P < 0.001$ ). For patients in the initial phase of treatment (0-14 weeks) the concentration of infliximab was significantly higher (14.2 (6.5 to 20.1)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) than in patients who achieved state of remission (after 14<sup>th</sup> week) (2.47 (0.9 to 6.9)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ;  $p < 0.001$ ).

In conclusion, for reliable interpretation of therapeutic concentrations of infliximab is useful to determine the level after the initial phase, ie after 14<sup>th</sup> weeks when it reaches the equilibrium concentration of the drug.

**Keywords:** infliximab, biologic therapy, immunosuppressants, chronic inflammatory diseases, therapeutic drug monitoring

---

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

# TERAPIJSKO PRAĆENJE SERUMSKE KONCENTRACIJE BIOLOŠKOG LIJEKA INFLIKSIMABA

Ana Pocrnja

## SAŽETAK

Infliksimumab je protuupalni lijek, odnosno kimerno monoklonsko protutijelo subklase IgG1 $\kappa$ , koje se visokim afinitetom veže za topljivi i za membranu vezani čimbenik nekroze tumora alfa te na taj način blokira vezanje TNF- $\alpha$  na receptor i ispoljavanje njegovog proupalnog učinka. Spada u skupinu bioloških lijekova. Primjenjuje se kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima crijeva, kože i reumatskim bolestima. Ciljne terapijske koncentracije lijeka iznose 3-7  $\mu\text{g/mL}$ .

Cilj ovog istraživanja je utvrditi koncentracije infliksimumaba kod bolesnika s kroničnim upalnim bolestima u ovisnosti o vremenu od započinjanja terapije te utvrditi stupanj povezanosti između doze i koncentracije infliksimumaba u odnosu na klinički odgovor pacijenta na terapiju.

U ovo prospektivno istraživanje uključena su 23 bolesnika koja boluju od kroničnih crijevnih upalnih bolesti i reumatoidnog artritisa te su na terapiji infliksimumabom. Za 23 bolesnika zaprimljena su 42 uzorka seruma (za 19 bolesnika uzorkovalose se prije dviju uzastopnih doza). Srednja koncentracija infliksimumaba iznosila je 4,6 (1,1-12,2)  $\mu\text{g/mL}$ . Nije pronađena korelacija između doze i koncentracije lijeka ( $r=-0,14$ ;  $P=0,40$ ), dok je pronađena negativna korelacija između koncentracije lijeka i tjedna od početne terapije ( $r=-0,57$ ;  $P<0,001$ ). U inicijalnoj fazi liječenja (0-14. tjedan) koncentracija infliksimumaba bila je statistički značajno viša 14,2 (6,5-20,1)  $\mu\text{g/mL}$  nego u postignutoj ravnoteži (nakon 14. tjedna) (2,47 (0,9-6,9)  $\mu\text{g/mL}$ ;  $P<0,001$ ). Za pouzdanu interpretaciju terapijske koncentracije infliksimumaba korisno je određivati razinu nakon inicijalne faze, odnosno nakon 14. tjedna kad se dosegne ravnotežna koncentracija lijeka.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 42 stranice, 10 grafičkih prikaza, 10 tablica i 52 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: infliksimumab, biološka terapija, imunosupresivi, kronične upalne bolesti, praćenje koncentracije lijeka

Mentor: **Dr. sc. Nada Vrkić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Nada Vrkić**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Olga Gornik**, izvanredna profesorica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: srpanj 2016.

---

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical Biochemistra  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

# THERAPEUTIC DRUG MONITORING OF SERUM CONCENTRATIONS OF INFLIXIMAB

Ana Pocrnja

## SUMMARY

Infliximab is an anti-inflammatory drug or a chimeric monoclonal antibody of the IgG<sub>1k</sub> subclass, which binds with high affinity to the soluble and membrane-bound form of tumor necrosis factor  $\alpha$  and thus prevents TNF- $\alpha$  from binding to its receptor and its anti-inflammatory effect. It belongs to a group of biologic drugs. It is used in patients with chronic inflammatory bowel diseases, skin and rheumatic diseases. Targeting therapeutic drug concentrations are of 3-7  $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

The purpose of the study is to determine the concentrations of infliximab in patients with chronic inflammatory diseases, depending on the time of the therapy start and the degree of correlation between the dose of and the concentration of infliximab in relation to the patient's clinical response to therapy.

23 patients were included in this prospective study. The 42 serum samples were collected from the 23 patients (for 19 patients samples were collected before dosing). The mean infliximab concentration was 4.6 (1.1 to 12.2)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ . No correlation was found between the drug dose and the drug concentration ( $r = -0.14$ ;  $p = 0.40$ ), while negative correlation was found between the drug concentration and the week from the therapy start ( $r = -0.57$ ;  $p < 0.001$ ). For patients in the initial phase of treatment (0-14 weeks) the concentration of infliximab was significantly higher (14.2 (6.5 to 20.1)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ) than in patients who achieved state of remission (after 14<sup>th</sup> week) (2.47 (0.9 to 6.9)  $\mu\text{g} / \text{mL}$ ;  $p < 0.001$ ). In conclusion, for reliable interpretation of therapeutic concentrations of infliximab is useful to determine the level after the initial phase, ie after 14<sup>th</sup> weeks when it reaches the equilibrium concentration of the drug

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 42 pages, 10 figures, 10 tables and 52 references. Original is in Croatian language.

Keywords: infliximab, biologic therapy, immunosuppressants, chronic inflammatory diseases, therapeutic drug monitoring

Mentor: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Olga Gornik, Ph.D.** Associate Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** Assistant Professor University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July 2016.