

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

Scienze Medico-Chirurgiche Gastroenterologiche E Dei Trapianti

Ciclo XXII

Settore scientifico-disciplinare di afferenza: MED/09 MEDICINA INTERNA

**Terapia con adalimumab nei pazienti con malattia di Crohn  
steroido-dipendente**

**Presentata dalla dott.ssa Sara Renna**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Ch.mo Prof. Massimo Campieri**

**Ch.mo Prof. Mario Cottone**

**Esame finale anno 2010**

# INDICE

<b>PARTE PRIMA</b> .....	3
Introduzione.....	3
Strategie terapeutiche nella malattia di Crohn .....	6
Gli anti - TNF $\alpha$ nella malattia di Crohn.....	8
Evidenze della letteratura sull'efficacia dell'adalimumab.....	10
Sicurezza nell'utilizzo degli agenti anti-TNF $\alpha$ .....	16
<b>PARTE SECONDA</b> .....	19
Background.....	19
Obiettivo dello studio .....	19
Pazienti e metodi .....	20
Risultati.....	23
Eventi avversi .....	25
Analisi statistica.....	26
Discussione e conclusioni .....	27
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	31

# PARTE PRIMA

## Introduzione

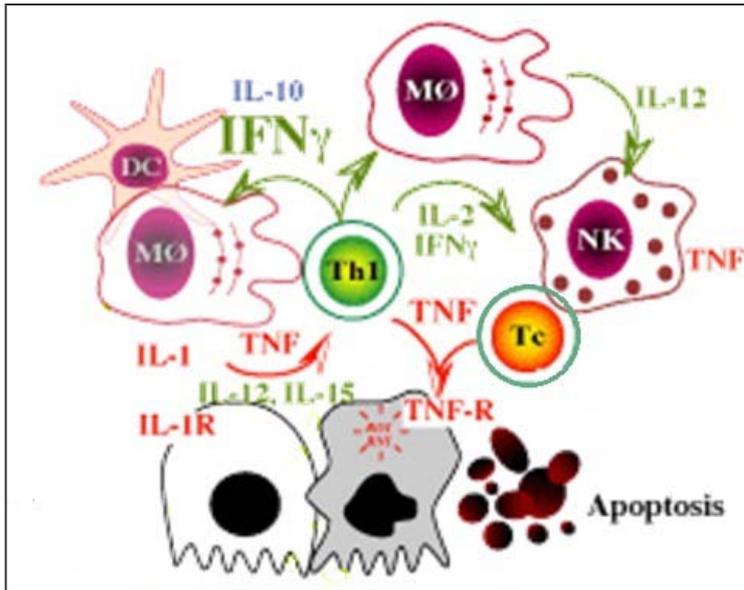
La malattia di Crohn (MC) è una malattia infiammatoria dell'intestino a decorso cronico - recidivante. Vi è ormai ampio consenso sull'ipotesi patogenetica secondo cui, negli individui geneticamente predisposti, fattori esogeni (agenti infettivi, flora batterica luminale, fattori ambientali come il fumo) o fattori propri dell'ospite (funzione di barriera delle cellule epiteliali intestinali) causino uno stato di cronica attivazione della funzione immunitaria mucosale, che si esplica con la produzione di citochine proinfiammatorie (1).

La risposta dell'ospite al microambiente intestinale coinvolge tre componenti (2) :

1. L'epitelio intestinale, parte integrante del sistema immune innato, che svolge un ruolo attivo nel mantenere l'omeostasi mucosale. Le cellule epiteliali costituiscono una barriera altamente selettiva tra l'organismo e fattori ambientali intraluminali. Deficit della funzione di barriera risultano in una flogosi mucosale, conseguenza di una inappropriata esposizione ad antigeni fecali, che conduce all'attivazione stessa del sistema immune mucosale.
2. Il sistema immune innato (monociti, cellule dendritiche, etc.), che rappresenta la prima difesa dell'organismo contro i patogeni.
3. Il sistema immune adattativo, costituito dalla combinazione di popolazioni cellulari (linfociti T e B) sia residenti che reclutate in loco. Si tratta di linfociti B mucosali produttori immunoglobuline e linfociti T helper con fenotipo Th1. La differenziazione verso tale fenotipo è generalmente scatenata da stimoli di natura microbica e determina la produzione di un profilo citochinico peculiare (prevalenza di IL-12, IFN- $\gamma$  , TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-6). Numerose alterazioni immunologiche sono state descritte nelle malattie infiammatorie croniche intestinali (MICI), tra queste: la presenza di difetti di proliferazione e di citotossicità dei linfociti T; le alterazioni nell'attivazione del T-cell receptor, la

resistenza delle cellule T all'apoptosi e l'anormale produzione di citochine. Queste ultime rappresentano il braccio effettore della disregolata risposta immune che si verifica nelle MICI, tanto da rappresentare attualmente i maggiori target terapeutici (Fig. 1). In particolare il TNF- $\alpha$  è una citochina chiave nella patogenesi delle MICI (3), esercitando la propria azione su diverse componenti:

- Macrofagi → stimola la produzione di altre citochine proinfiammatorie;
- Endotelio → richiama le molecole di adesione;
- Fibroblasti → aumenta la produzione di proteine di fase acuta, di metallo proteasi e di collagene favorendo quindi il rimodellamento tissutale;
- Epitelio → aumenta la permeabilità e favorisce il trasporto di ioni, altera la funzione di barriera;
- Ipotalamo → induce innalzamento della temperatura corporea agendo da “pirogeno endogeno”, attraverso l'aumentata produzione di prostaglandine a livello ipotalamico;
- Epatociti → aumenta la sintesi proteica a livello epatico (fibrinogeno, amiloide) sostenendo la risposta di fase acuta agli stimoli infiammatori;
- Metabolismo → una produzione prolungata è responsabile di perdita imponente di tessuto muscolare e adiposo, effetto in parte derivante da un'azione anoressigena della citochina;
- Coagulazione → provoca trombosi intravascolare per perdita delle normali proprietà anticoagulanti dell'endotelio. Il TNF- $\alpha$  stimola l'espressione nelle cellule endoteliali del fattore tissutale, un potente attivatore della coagulazione, e inibisce la produzione della trombomodulina, ad attività anticoagulativa.



**Figura 1:** *Meccanismi immunologici coinvolti nella patogenesi della MC.*

## **Strategie terapeutiche nella malattia di Crohn**

La MC può colpire qualsiasi tratto del tubo gastroenterico con un'inflammatione di tipo transmurale; la localizzazione anatomica unitamente al grado di severità della malattia danno luogo ad un largo spettro di presentazioni cliniche, che condizionano le scelte terapeutiche.

La terapia della MC nel corso degli ultimi 25 anni si è basata sull'utilizzo dei corticosteroidi, della mesalazina, degli antibiotici (metronidazolo e ciprofloxacina) e degli immunosoppressori (azatioprina, 6-mercaptopurina, methotrexate e ciclosporina) da soli o in combinazione tra loro (4).

La terapia medica con corticosteroidi ha rappresentato, per lungo tempo, l'unico approccio terapeutico praticabile in fase di attività, portando ad un rapido miglioramento nella maggior parte dei pazienti. Se è vero però che circa il 48% dei pazienti trattati con prednisone va in remissione completa, e che il 32% ha una risposta parziale, è altrettanto vero che solo il 55 % mantiene la risposta per un tempo prolungato mentre un 36 % sviluppa una steroido-dipendenza, ossia rimane in remissione solo prolungando la durata del trattamento steroideo. Vi è poi un 20 % circa di pazienti che non risponde del tutto ai corticosteroidi e si definisce pertanto steroido-resistente (5).

Nei pazienti steroido-resistenti e steroido-dipendenti l'elevato ricorso alla chirurgia, anche ripetuta, e la comparsa di effetti collaterali propri della terapia steroidea prolungata, ha spinto verso l'utilizzo di opzioni terapeutiche alternative. L'alternativa farmacologica attualmente più praticata è rappresentata dai farmaci immunosoppressori (azatioprina, 6-mercaptopurina, methotrexate) (6), il loro utilizzo è però limitato dalla possibile insorgenza di effetti collaterali ed intolleranza, nonché dal lungo intervallo di tempo (3-4 mesi) necessario perchè l'efficacia risulti evidente, per questo motivo il loro ruolo è da inquadrare più come terapia di mantenimento della remissione che

come terapia di induzione della remissione e in quest'ambito i risultati positivi a lungo termine sono stati evidenziati nel 40 % dei pazienti trattati.

L'ampliamento delle conoscenze sull'etiopatogenesi della malattia e l'evoluzione tecnologica nel campo della biologia molecolare hanno condotto negli ultimi anni allo sviluppo di farmaci detti "biologici" in quanto attivi su specifici target molecolari della cascata infiammatoria, aprendo nuove opportunità terapeutiche (7).

La ricerca di base ha individuato come target e sviluppato molecole indirizzate a bloccare i linfociti T, influenzandone la proliferazione o inducendo l'apoptosi (visulizumab, basiliximab) (8,9), o che ne inibiscono la differenziazione e attivazione (fontolizumab) (10), o che bloccano specifiche citochine ad azione proinfiammatoria (ustekinumab) (11). Ancora, interferendo con le molecole di adesione, è possibile inibire la migrazione dei leucociti nelle sedi di flogosi (natalizumab) (12).

Ad oggi però l'unica strategia terapeutica che si è però dimostrata efficace nella pratica clinica sia nella induzione che nel mantenimento della remissione nella MC è quella che ha come bersaglio il TNF- $\alpha$  ed è la base della terapia biologica attualmente utilizzata.

Il ruolo del TNF- $\alpha$  nella MC è testimoniato dalla sua aumentata espressione nella mucosa intestinale affetta e dalla sua aumentata concentrazione nel siero e nelle feci dei pazienti.

## **Gli anti - TNF $\alpha$ nella malattia di Crohn**

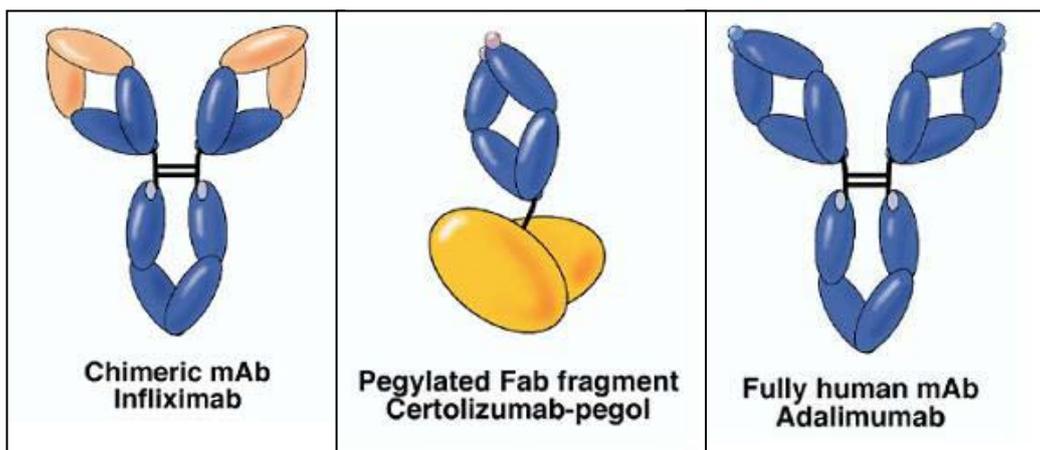
Il TNF- $\alpha$  rappresenta il target dei tre anticorpi monoclonali in commercio e cioè l'infliximab, l'adalimumab e il certolizumab (Fig.2), quest'ultimo disponibile solo negli Stati Uniti e non in Europa.

Il primo anticorpo monoclonale anti- TNF- $\alpha$  ad essere usato con dimostrata efficacia clinica nella MC è stato l'infliximab. E' questo un anticorpo monoclonale chimerico, costituito per il 75% da una componente umana e per il 25% da una componente murina. La sua struttura chimerica è alla base della immunogenicità del farmaco cioè la capacità di indurre anticorpi anti-infliximab responsabili sia della comparsa di reazioni allergiche (acute o ritardate) che della perdita di efficacia del trattamento.

Il primo trial condotto sull' infliximab (13) mostrava nella MC luminale refrattaria allo steroide percentuali di remissione a 8 settimane pari al 48% e di risposta pari al 53%. In seguito è stato condotto un trial atto a valutare l'efficacia dell' infliximab come terapia di mantenimento (14), a 54 settimane dall'inizio del trattamento circa il 60% dei pazienti aveva risposto alla terapia con infliximab; inoltre la terapia di mantenimento ogni 8 settimane alla dose di 5mg/Kg di peso corporeo aveva determinato la remissione clinica nel 28% di pazienti trattati. Anche da un punto di vista endoscopico la remissione o guarigione mucosale (un end-point mai raggiunto nella terapia della MC se non parzialmente dagli immunosoppressori) veniva documentata nel 45% dei pazienti trattati. L'infliximab consentiva anche la sospensione dello steroide e la riduzione delle ospedalizzazioni e degli interventi chirurgici, con conseguente riduzione dei costi sociali della MC.

L'infliximab trova inoltre indicazione nel trattamento della MC fistolizzante: l'evidenza deriva dai risultati del trial ACCENT-II dove è stata osservata la chiusura del 50% delle fistole nel 46% dei casi trattati e la chiusura completa nel 36% (15).

Il certolizumab è invece un frammento Fab' di anticorpo anti- TNF- $\alpha$  umanizzato e peghilato, pertanto meno immunogeno e con una maggiore emivita. Il farmaco è stato oggetto di studio in almeno 3 trial controllati (PRECISE I e II, WELCOME) (16-17-18) che hanno condotto a risultati controversi: il certolizumab non è risultato statisticamente più efficace del placebo nell'induzione della remissione, anche se il sottogruppo di pazienti con livelli di PCR più elevati hanno mostrato una migliore risposta al trattamento. Il farmaco si è invece mostrato efficace nella terapia di mantenimento e nei pazienti che avevano precedentemente praticato terapia con infliximab mostrandosi intolleranti o non-responders. Il farmaco, che ha ottenuto la registrazione negli USA, non è tuttavia in commercio in Europa poiché non ha ottenuto l'approvazione dell'autorità regolatrice europea EMEA in quanto i vantaggi non sono stati ritenuti superiori ai costi e alla sicurezza. L'unico anticorpo monoclonale anti-TNF $\alpha$  alternativo all'infliximab approvato in Europa con indicazione per la MC è rappresentato dall'adalimumab, il primo anti- TNF $\alpha$  interamente umano.

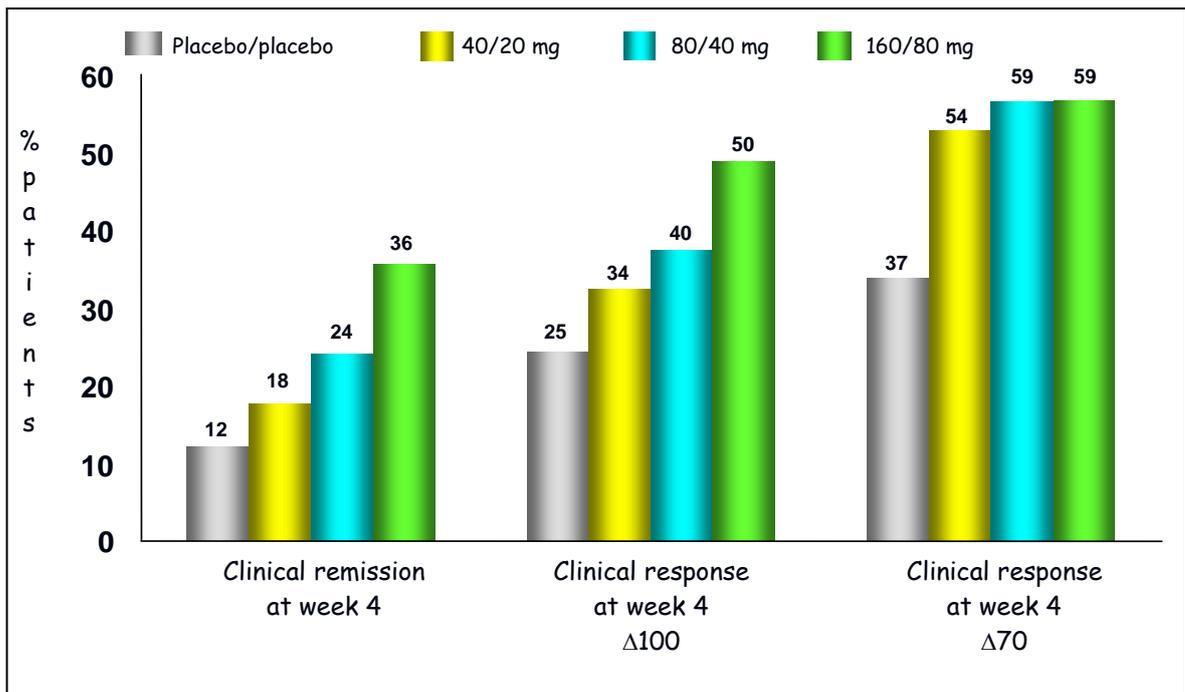


**Figura 2:** *Gli anticorpi monoclonali anti - TNF $\alpha$ .*

## **Evidenze della letteratura sull'efficacia dell'adalimumab**

Le evidenze sull'efficacia dell'adalimumab nella MC derivano soprattutto da 4 studi controllati:

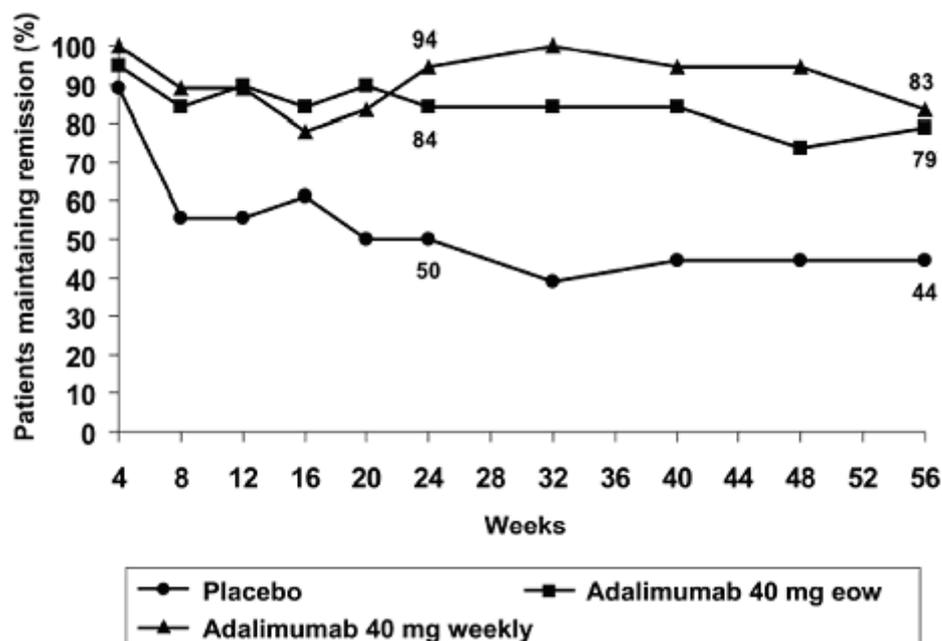
Lo studio CLASSIC I (19) è un trial multicentrico randomizzato controllato in doppio cieco che valuta l'efficacia di tre differenti dosaggi di adalimumab confrontati con il placebo nell'induzione della remissione nella MC moderato-severa (CDAI 220-450). Sono stati reclutati 299 pazienti con malattia moderata-severa, naive alla terapia con anti- TNF $\alpha$ , randomizzati a ricevere adalimumab s.c. alle settimane 0 e 2 ai dosaggi rispettivamente di 40 mg /20 mg, 80 mg /40 mg, 160 mg /80 mg, o placebo. Obiettivo principale dello studio era dimostrare una differenza statisticamente significativa nelle percentuali di remissione (CDAI < 150) tra i gruppi trattati con adalimumab 40/20 mg, 80 mg /40 mg, 160 mg/80 mg ed il gruppo trattato con placebo alla quarta settimana. Lo studio ha dimostrato una curva dose-risposta lineare dal momento che la dose più efficace è risultata la più alta in esame. Le percentuali di remissione sono state rispettivamente: 18% per il gruppo trattato con adalimumab 40 mg /20 mg; 24% per il gruppo trattato con adalimumab 80 mg /40 mg , 36% per il gruppo trattato con adalimumab 160 mg /80 mg, contro il 12% per il gruppo trattato con placebo. Una uguale frequenza di eventi avversi in tutti i gruppi è stata osservata. Lo schema ottimale di induzione della remissione con adalimumab in pazienti naive agli anti-TNF $\alpha$  è risultato pertanto quello che prevede 160 mg al tempo 0 e 80 mg alla settimana 2. Anche le percentuali di risposta clinica in termini di riduzione del CDAI sia di 70 che di 100 punti sono risultati tre volte superiori con questo schema rispetto all'80/40 mentre il terzo schema 40/20 non è risultato superiore al placebo (Fig. 3).



**Figura 3:** Risultati dello studio CLASSIC I: percentuale di pazienti in remissione alla 4<sup>o</sup> settimana (*Gastroenterology* 2006)

Lo studio CLASSIC-II (20) ha invece come obiettivo la valutazione dell'efficacia della terapia di mantenimento con adalimumab e si configura come un proseguimento dello studio CLASSIC I. I pazienti che avevano infatti ottenuto la remissione nello studio CLASSIC-I e che la mantenevano per ulteriori 4 settimane in open-label con adalimumab 40 mg alle settimane 4 e 6 venivano randomizzati a ricevere adalimumab 40 mg ogni 2 settimane, 40 mg ogni settimana o placebo, per 56 settimane. Dei 299 pazienti dello studio CLASSIC I, 276 sono stati arruolati in questo nuovo studio e 55 pazienti, in remissione alla quarta settimana, sono stati ri-randomizzati per i diversi bracci di mantenimento. I pazienti non in remissione alla quarta settimana sono stati arruolati in aperto a ricevere adalimumab 40 mg ogni due settimane e, in caso di mancata risposta, adalimumab 40 mg ogni settimana. Anche i pazienti appartenenti al braccio randomizzato con assenza di risposta sono passati in aperto a 40 mg ogni due settimane o settimanali. Dei 55 pazienti randomizzati

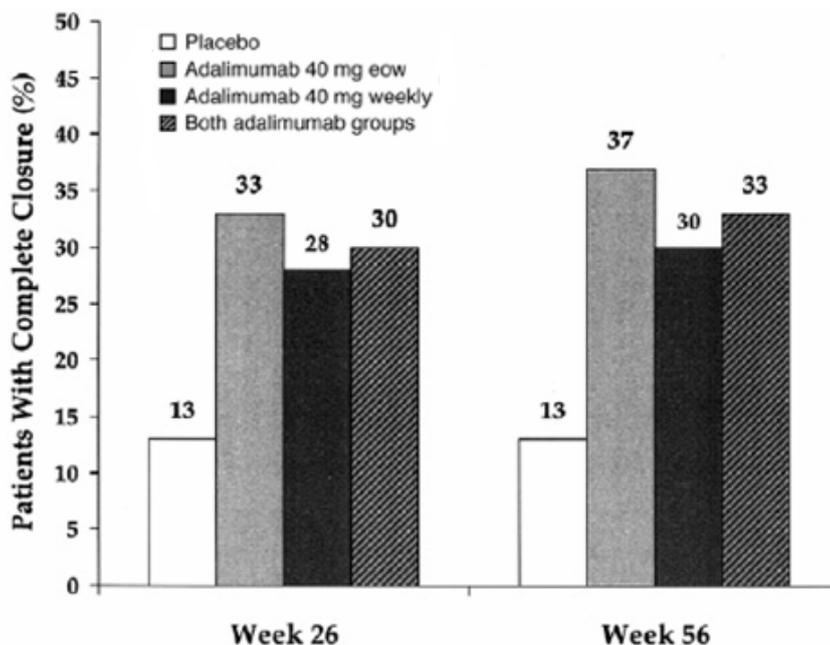
alla quarta settimana, il 79% era ancora in remissione alla cinquantaseiesima settimana nel gruppo trattato con adalimumab 40 mg ogni due settimane, l'83% nel gruppo trattato con adalimumab 40 mg settimanalmente e il 44% nel gruppo trattato con placebo. Un totale di 204 pazienti è entrato nel braccio open-label, di questi circa il 46% ha mantenuto la remissione fino alla cinquantaseiesima settimana (Fig.4). La più bassa percentuale di remissione clinica ottenuta nel braccio di pazienti trattati in aperto piuttosto che in quelli randomizzati implica la assunzione che i pazienti in remissione dopo induzione con adalimumab hanno molte più possibilità di rimanere in remissione dopo un anno. In conclusione, adalimumab si è mostrato efficace nel mantenimento della remissione nella MC. Non si sono osservate differenze statisticamente significative tra la somministrazione ogni due settimane e la somministrazione settimanale (79% vs 83%). Pertanto si considera trattamento ottimale nella terapia di mantenimento la somministrazione ogni due settimane al dosaggio di 40 mg.



**Figura 4:** Risultati dello studio CLASSIC II: variazione del CDAI durante le 56 settimane (Gut 2007)

Lo studio CHARM (21) aveva come obiettivo valutare l'efficacia di adalimumab sempre nel mantenimento della risposta e della remissione clinica in pazienti sia naive agli anti-TNF $\alpha$  che già trattati con infliximab. 854 pazienti sono stati arruolati a ricevere in open-label terapia di induzione con adalimumab alla dose di 80 mg alla settimana 0 e 40 mg alla settimana 2. Alla quarta settimana 778 pazienti (di cui 499 ovvero il 64 % responders) sono stati stratificati in base alla risposta e randomizzati in doppio cieco a ricevere placebo (n=261), adalimumab 40 mg ogni due settimane (n=260), o adalimumab 40 mg ogni settimana (n=257) e seguiti per 56 settimane.

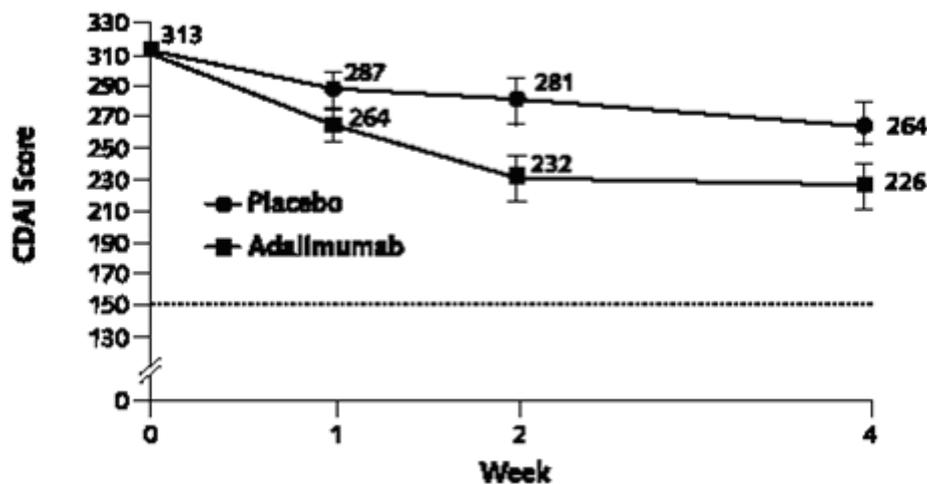
Nella valutazione finale la percentuale di responders è risultata significativamente maggiore rispetto al placebo nei gruppi trattati con adalimumab sia settimanalmente che ogni due settimane, sia alla settimana 26 (trattamento settimanale 47%, trattamento ogni due settimane 40%, placebo 17%), sia alla settimana 56 (percentuali di risposta rispettivamente del 41%, 36% e 12%) (Fig. 5).



**Figura 5:** Risultati dello studio CHARM: percentuale di pazienti in remissione alla 26° e 56° settimana (Gastroenterology 2007)

L'analisi dei sottogruppi ha dimostrato una maggiore efficacia di adalimumab rispetto al placebo anche nei pazienti con PCR elevata al reclutamento, in quelli in trattamento concomitante con immunosoppressori e in quelli già trattati con altri anti- TNF $\alpha$ , sebbene i pazienti naive agli anti- TNF $\alpha$  siano stati quelli con le più alte percentuali di remissione. E' stata inoltre eseguita in questo studio un'analisi dell'efficacia dell'adalimumab nel sottogruppo di pazienti trattati con steroidi osservando che il 29% di questi pazienti riusciva a sospendere lo steroide.

Infine lo studio GAIN (22) ha valutato l'efficacia dell'adalimumab in pazienti con MC che erano stati già trattati con infliximab con buona risposta ma che avevano successivamente sviluppato eventi avversi o perdita di efficacia. Sono stati arruolati 325 pazienti con MC, ad attività moderata-severa (CDAI compreso tra 220 e 450). I pazienti sono stati randomizzati a ricevere adalimumab (n=159) alla dose di 160mg/80mg rispettivamente al tempo 0 e alla seconda settimana o placebo (n=160) e seguiti per 4 settimane. A 4 settimane il 21% dei trattati con adalimumab vs il 7% dei pazienti trattati con placebo era in remissione ( $p < 0.001$ ) mentre il 52% (adalimumab) vs 34% (placebo) aveva ottenuto dal trattamento una risposta clinica (riduzione CDAI di 70 punti). In conclusione l'adalimumab è risultato più efficace del placebo nell'indurre la remissione della malattia anche in pazienti con MC intolleranti o non più responsivi al trattamento con infliximab, anche se, in accordo con i dati forniti dall'analisi di sottogruppo dello studio CHARM, le percentuali di remissione e di risposta sono inferiori (circa 15 %) a quelle ottenute nei pazienti naive alla terapia con anti TNF $\alpha$  (Fig. 6).



**Figura 6:** Risultati dello studio GAIN: variazioni del CDAI durante le 4 settimane (*Annals of Internal Medicine* 2007)

Nel corso del 2008 sono stati pubblicati alcuni studi osservazionali derivati da esperienze non controllate condotte in singoli centri che confermano l'efficacia clinica dell'adalimumab sia nell'induzione che nel mantenimento della remissione nella MC. I risultati ottenuti sono stati positivi sia per pazienti naive agli anti-TNF $\alpha$ , che per pazienti con malattia risultata refrattaria ai precedenti trattamenti (compreso l'infliximab) (23-24-25) Anche alcune esperienze condotte in età pediatrica hanno rivelato un buon profilo di sicurezza e alte percentuali di risposta (complete o parziali), tuttavia si rende ancora necessaria una migliore definizione del dosaggio e della durata complessiva del trattamento specie nella popolazione pediatrica (26).

## **Sicurezza nell'utilizzo degli agenti anti-TNF $\alpha$**

L'utilizzo degli anti-TNF $\alpha$  è sicuramente correlato ad eventi avversi, di cui i più frequenti sono le reazioni infusionali sia a carattere acuto che ritardato, legate alla immunogenicità del farmaco; un aumentato rischio di infezioni da opportunisti, (riattivazione delle tubercolosi latenti, infezioni da pneumocystis carinii, istoplasmosi, ecc.). Anche il rischio di linfoma sembrerebbe leggermente superiore rispetto alla popolazione sana anche se l'entità di tali rischi è realmente difficile da stimare, derivando in prima istanza dalla condizione patologica di base. Particolare risonanza ha avuto tuttavia nel 2007 la descrizione di almeno 13 casi di linfoma epatosplenico a cellule T (27) correlati all'impiego terapeutico dell'infliximab in soggetti in età pediatrica o giovanile e di 3 casi di leucoencefalopatia multifocale progressiva correlati all'impiego del natalizumab (28).

I dati relativi alla sicurezza a lungo termine per l'infliximab derivano dal registro TREAT (The Crohn's Therapy, Resource Evaluation and Assessment Tool), un registro osservazionale, di tipo prospettico e multicentrico, istituito nel Nord America a partire dal 1999 al fine di valutare la sicurezza dei differenti regimi terapeutici, incluso l'infliximab, in pazienti con MC (29).

Fino ad Agosto 2004 sono stati arruolati 6290 pazienti di cui circa il 50% (n=3179) aveva praticato terapia con infliximab. Il tempo medio di follow-up dei pazienti è stato di circa due anni. L'analisi dei risultati riguardo al rischio di mortalità (RR 1.24) e al rischio di sviluppare infezioni serie ha mostrato valori percentuali pressoché sovrapponibili nei pazienti trattati con infliximab, rispetto ai pazienti trattati con gli immunomodulatori tradizionali. Fattori di rischio indipendenti per lo sviluppo di serie infezioni sono risultati essere l'uso del prednisone (OR, 2.21;  $p < .001$ ), di analgesici oppioidi (OR, 2.38  $p = .001$ ) e la presenza di malattia severa (OR, 2.38;  $p = .024$ ).

Questi dati relativi alla sicurezza sono stati ampiamente confermati dall'esperienza italiana, condotta tra il 2006 e il 2007, con l'obiettivo peraltro di individuare i fattori capaci di minimizzare gli effetti collaterali dell'infliximab. E' stato analizzato, similmente al registro TREAT, il rischio relativo dei pazienti trattati con infliximab, rispetto alla popolazione generale, di sviluppare infezioni serie o neoplasie (linfoma), anche in questo caso non risultato significativo (30,31).

Riguardo alla sicurezza sull' utilizzo di adalimumab è stato recentemente pubblicato uno studio di fase 4, con l'obiettivo di valutare la sicurezza del farmaco in sei malattie infiammatorie immuno-mediate. Sono stati comparati i tassi di neoplasie e mortalità nei pazienti esposti ad adalimumab rispetto alla popolazione generale (32).

L'analisi riguarda 19041 pazienti esposti ad adalimumab per il trattamento dell'artrite reumatoide (RA), l'artrite psoriasica (PsA), la psoriasi (Ps), la spondilite anchilosante (AS), l'artrite giovanile idiopatica (JIA), e la MC fino ad Aprile 2007. Per ciascuna malattia le percentuali di eventi avversi sono state riportate come eventi per 100-pazienti-anno (numero di eventi / totale di pazienti esposti-anno x 100).

Gli eventi avversi di più frequente riscontro sono state le infezioni, sia gravi che da patogeni opportunisti. Nel primo caso si è trattato soprattutto di polmoniti e di ascessi addominali (più frequenti rispettivamente nella AR e nella MC). Le infezioni opportuniste, prevalentemente candidiasi, (ma anche istoplasmosi, toxoplasmosi, aspergilloma) si sono presentate con una frequenza di 0.09/100 pazienti-anno sia nell'AR che nella MC. Casi di riattivazione di tubercolosi si sono verificati con uguale frequenza nelle varie patologie con un tasso di 0.13-0.30/100 pazienti-anno. Le malattie demielinizzanti hanno rappresentato una rara complicanza in corso di trattamento con adalimumab. Si è trattato di alcuni casi di sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barrè e neurite ottica, osservati unicamente e con frequenza inferiore allo 0.05/100-

pazienti-anno nei pazienti trattati per artrite reumatoide. Altrettanto infrequente è stato il riscontro di sindrome lupus-like occorsa in una percentuale pari a 0.07/100 pazienti-anno nell' AR e di 0.04/100 pazienti-anno nella MC. La maggior parte dei pazienti che ha manifestato sindrome lupus-like presentava manifestazioni cutanee (MC), o sierositi (AR). Allo stesso modo si è valutato il rischio di sviluppare neoplasie in corso di terapia con adalimumab. I tassi complessivi di incidenza standardizzata per neoplasie sono risultati in totale pari a 0.83. Complessivamente il rischio di neoplasie non è risultato superiore alla popolazione generale, un rischio associato ad un uso a lungo termine dovrebbe essere riesaminato in futuro.

Dai dati ottenuti è emerso che il rischio di linfoma è lievemente aumentato rispetto alla popolazione generale. Sono stati osservati complessivamente 28 casi di linfoma (di cui 2 in pazienti con MC). Riguardo ai tassi di mortalità standardizzata ( $< 1$ ), non si è osservato un incremento rispetto alla popolazione generale, per nessuna delle sei malattie.

## **PARTE SECONDA**

### **Background**

I dati della letteratura hanno dimostrato l'efficacia della terapia con adalimumab sia nell'induzione che nel mantenimento della MC. Un'analisi di sottogruppo effettuata nello studio CHARM ha inoltre evidenziato l'efficacia dell'adalimumab nella induzione della remissione libera da steroidi nei pazienti con MC steroide-dipendenti. Questi risultati sono sicuramente positivi ma risentono delle limitazioni di un'analisi di sottogruppo, ci è sembrato interessante effettuare una valutazione della efficacia dell'adalimumab focalizzando l'attenzione proprio su questo sottogruppo di pazienti.

### **Obiettivo dello studio**

Obiettivo principale del nostro studio è stata la valutazione prospettica, in aperto, dell'efficacia dell'adalimumab nella induzione della risposta e della remissione a breve termine nei pazienti con MC cronicamente attiva steroide-dipendente, all'interno di una popolazione proveniente da 2 centri siciliani.

## **Pazienti e metodi**

Sono stati reclutati da marzo 2007 a febbraio 2010, 60 pazienti affetti da MC steroido-dipendenti afferenti alla U.O.C. di Medicina Interna dell'A.O. "V. Cervello". ed alla U.O.C di Gastroenterologia & Epatologia dell' AOUP "P.Giaccone" di Palermo. La diagnosi di MC è stata formulata sulla base dei classici criteri clinici e di indagini strumentali di tipo sia radiologico che endoscopico (endoscopia/biopsia, rx clisma del tenue).

Dei 60 pazienti trattati, 38 erano di sesso maschile e 22 di sesso femminile, con una età media di 39 anni. L'età media dei pazienti all'esordio della malattia era di 27 anni, la durata media di malattia era di 126 mesi. Ventotto pazienti erano non fumatori, 14 fumatori e 18 ex-fumatori. L'estensione di malattia era: ileo-colica in 36 pazienti, ileale in 16 pazienti e colica in 8 pazienti. Ventisei pazienti erano stati precedentemente sottoposti a resezione ileocecale per il controllo della malattia e/o delle sue complicanze. Ventitre pazienti erano stati precedentemente trattati con infliximab, alla dose di 5 mg/Kg, con una media di 7,4 infusioni, sospeso in 15 casi per comparsa di intolleranza (reazioni di tipo allergico sia acute che ritardate), in 8 casi per inefficacia o perdita di efficacia. Sette di questi pazienti erano stati precedentemente trattati anche con certolizumab pegol, con una media di 12,3 somministrazioni, senza beneficio clinico. Il dosaggio medio di steroide all'inizio del trattamento era inferiore a 15 mg/die in 38 pazienti e superiore a 15 mg/die in 22, per almeno un mese.

Criteri di esclusione dallo studio sono state la documentazione radiologica o endoscopica di stenosi intestinali associata ad anamnesi di episodi subocclusivi, la presenza di ascessi addominali o infezioni attive e infine una storia attuale o pregressa di neoplasia.

In tutti i pazienti è stato eseguito screening per tubercolosi (intradermoreazione di Mantoux, rx torace, anamnesi dettagliata per fattori di

rischio per esposizione a tubercolosi) e ricerca dei markers epatitici (HBsAg e anti-HCV).

I trattamenti farmacologici concomitanti sono stati continuati anche durante la terapia con adalimumab, mantenendone le dosi precedentemente assunte, con il programma di ridurle in caso di risposta positiva.

L'attività di malattia all'inizio della terapia con adalimumab era definita mediante il CDAI (Crohn's Disease Activity Index) (33): il valore medio era 180 (140-360), corrispondente ad attività di malattia lieve.

E' stato somministrato ai nostri pazienti, prima dell'inizio del trattamento, un questionario al fine di valutare la qualità della vita (IBDQ) (34). Il punteggio medio dell' IBDQ è stato di 120 punti (range 60-220).

A tutti i pazienti è stato chiesto il consenso informato.

Il trattamento con adalimumab (Humira, Abbot) è stato praticato secondo due differenti schemi di induzione: il primo, adottato in 20 pazienti, prevedeva una prima dose di 160 mg s.c. seguita da 80 mg dopo 2 settimane, il secondo, adottato nei rimanenti 40 casi, prevedeva una prima somministrazione di 80 mg s.c., seguita da 40 mg dopo 2 settimane. La terza dose era di 40 mg s.c. alla quarta settimana per tutti i pazienti.

La fase di induzione è stata successivamente seguita, nei pazienti responsivi, da una terapia di mantenimento al dosaggio di 40 mg ogni due settimane.

La scelta del protocollo di induzione è stata dettata dalla severità della malattia e a discrezione del gastroenterologo che aveva in cura il paziente.

Come end-points venivano definite rispettivamente la sospensione dello steroide, la risposta clinica, ossia la riduzione del CDAI di 70 punti rispetto al valore basale, e la remissione clinica, ossia la riduzione del valore del CDAI al di sotto di 150 punti, in assenza di steroidi. Tra gli end-points vi era inoltre il miglioramento della qualità di vita valutato con l'IBDQ.

Gli end-points sono stati valutati a 6 settimane.

Sono inoltre state analizzate le seguenti variabili mediante analisi univariata (Egret): fumo, pattern di malattia, localizzazione di malattia, pregresso intervento chirurgico, presenza di manifestazioni extraintestinali, pregressa terapia con infliximab, pregressa terapia con certolizumab, concomitante terapia con azatioprina, tipo di induzione praticata.

Sono stati registrati gli eventi avversi.

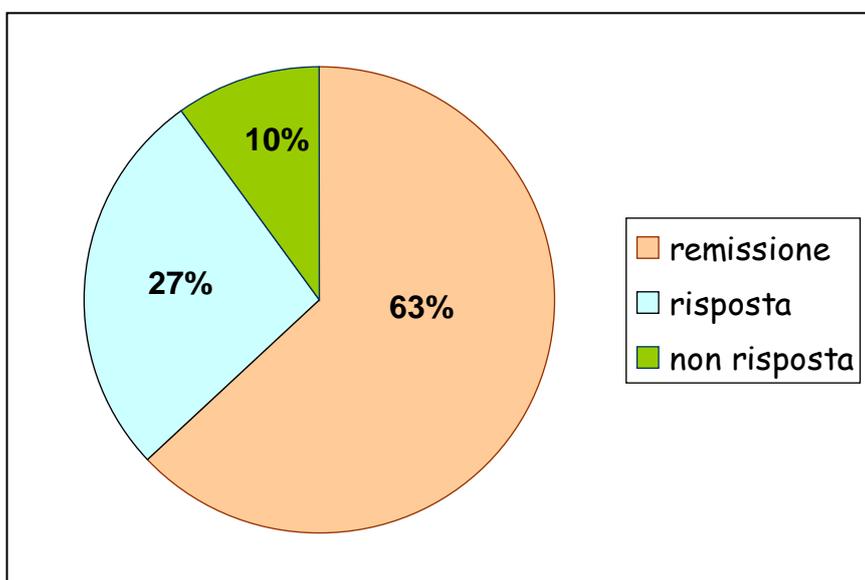
Si tratta di uno studio osservazionale, in aperto, condotto in due centri di riferimento per il trattamento delle MICI. I due centri hanno utilizzato un database dedicato (Excel) elaborato in collaborazione e basato sui precedenti studi clinici sull'uso dell' adalimumab nella MC.

## Risultati

A 6 settimane dall'inizio del trattamento dei 60 pazienti arruolati nello studio:

- 38 (63 %) erano in remissione clinica (CDAI < 150).
- 16 (27 %) avevano risposto al trattamento (riduzione CDAI di 70 punti).
- 6 (10 %) non avevano ottenuto beneficio.

Il tempo di risposta medio era inferiore o uguale a 2 settimane.



**Fig.13:** Risultati della terapia di induzione con adalimumab.

Alla fine delle 6 settimane veniva nuovamente somministrato ai nostri pazienti l'IBDQ per valutare la qualità della vita dopo un periodo di trattamento con adalimumab. Il valore medio è risultato di 165 punti.

Quarantasei pazienti (85% dei responders) sono riusciti a sospendere la terapia steroidea dopo una media di 1,6 settimane.

Dei pazienti precedentemente trattati con infliximab, tutti tranne uno hanno risposto alla terapia con adalimumab e tutti i pazienti precedentemente trattati con certolizumab pegol hanno ottenuto la remissione clinica a 6 settimane.

Si sono valutati inoltre i risultati ottenuti nei due sottogruppi di pazienti sottoposti ai due differenti schemi della terapia di induzione e non è stata osservata una differenza significativa tra i due regimi di induzione.

## **Eventi avversi**

Tutte le reazioni avverse osservate sono state registrate. Nelle prime 6 settimane di trattamento reazioni locali cutanee nel sito di iniezione sono comparse in 3 pazienti; un paziente ha sviluppato una reazione acuta urticarioide che ha indotto alla sospensione del trattamento, questo paziente aveva mostrato intolleranza anche all'infliximab. La comparsa di micosi è stata osservata in 3 pazienti (rispettivamente 1 ungueale e 2 orali), in questi casi il trattamento non è stato sospeso.

## **Analisi statistica**

Nessuna differenza statisticamente significativa in termini di risposta, remissione e sospensione dello steroide a 6 settimane è stata evidenziata analizzando fumo, pattern di malattia, localizzazione di malattia, pregresso intervento chirurgico, presenza di manifestazioni extraintestinali, pregressa terapia con infliximab, concomitante terapia con azatioprina, tipo di induzione praticata.

Solo un pregresso trattamento con certolizumab sembrerebbe determinare una peggiore risposta a 6 settimane ( $p = 0.04$ ).

## **Discussione e conclusioni**

L'utilizzo nella pratica clinica degli anticorpi monoclonali anti-TNF $\alpha$  ha segnato una svolta radicale nel trattamento della MC, consentendo di raggiungere obiettivi prima impensabili nelle forme refrattarie o dipendenti dallo steroide come la sospensione dello stesso, la guarigione mucosale, la riduzione delle ospedalizzazioni e degli interventi chirurgici, la chiusura delle fistole. L'adalimumab rappresenta un passo avanti e una ulteriore conquista nell'armamentario terapeutico della MC per la facilità di somministrazione, che rende applicabile su base ambulatoriale la terapia biologica con riduzione dei costi di gestione e risparmio di risorse. La peculiarità della molecola interamente umana consente infine un progresso nel campo della "safety" evitando gli eventi avversi legati all'immunogenicità, cioè le reazioni infusionali. (35)

L'esperienza riportata in questo studio è in linea con i dati della letteratura confermando l'efficacia di adalimumab nell'induzione della remissione clinica in un campione di pazienti siciliani con MC cronicamente attiva, steroide-dipendente. Le percentuali di remissione (CDAI<150) e di risposta clinica sono risultate elevate a 6 settimane. La percentuale di pazienti che ottiene la remissione in questo studio è superiore rispetto alla percentuale di pazienti che ottiene solo una risposta parziale, dato che sembrerebbe in contrasto con i risultati della letteratura. In realtà, la nostra casistica è costituita da pazienti steroide-dipendenti con una attività di malattia lieve sotto steroide, come dimostra il valore medio di CDAI riportato all'inizio della terapia mentre i trial sono condotti su pazienti che presentano attività moderato-severa e in cui un valore di CDAI < 220 costituisce criterio di esclusione.

Sono state osservate elevate percentuali di remissione e di risposta al trattamento anche nei pazienti precedentemente trattati con agenti anti-TNF $\alpha$  (infliximab e certolizumab). Questi dati sembrerebbero in parte contraddire i

dati presenti in letteratura circa una minore efficacia di un secondo agente anti-TNF $\alpha$  rispetto all'utilizzo in pazienti naive, offrendo ai pazienti "difficili" una ulteriore chance terapeutica.

L'impiego dei due differenti schemi di induzione 160mg/80mg e 80mg/40mg ha mostrato in letteratura differenti percentuali di risposta. Come già dimostrato sia nello studio CLASSIC I (19) che nello studio GAIN (22) la dose più efficace di adalimumab nella MC sembra essere quella più elevata, anche se nel nostro studio non ci sarebbero differenze sulla percentuale di sospensione dello steroide a 6 settimane nei due gruppi. Questo dato merita ulteriori conferme in considerazione del costo della terapia.

La terapia con adalimumab è ad elevato costo, forse maggiore al costo equivalente dell'infliximab e tale aspetto non è trascurabile data la limitatezza delle risorse disponibili in tutti i sistemi sanitari. Considerazioni farmacoeconomiche sulla terapia biologica dovrebbero tuttavia tenere conto anche dell'influenza dei costi sociali della malattia (ad esempio assenze dal lavoro per le infusioni).

Noi abbiamo confermato nel nostro studio l'efficacia di adalimumab in pazienti con MC steroide-dipendenti, in parte refrattari o intolleranti ad un altro biologico. Si è trattato pertanto di un approccio "step-up". Aperto è attualmente il dibattito sulla opportunità dell'utilizzo precoce della terapia biologica: all'approccio step-up, concettualizzato in una piramide terapeutica, all'interno della quale il fallimento della terapia di prima linea conduce progressivamente ai gradini terapeutici superiori e in cui l'apice della piramide è occupato dal ricorso alla terapia chirurgica, si contrappone l'approccio "top-down", che consiste in un uso precoce di farmaci dotati di maggiore attività, con l'obiettivo di intervenire non solo sui sintomi, ma anche di modificare positivamente la storia naturale della malattia (36).

Evidenze in tal senso derivano dalle esperienze condotte con farmaci biologici in età pediatrica in pazienti con MC. In uno studio retrospettivo su 22 bambini

Lionetti et al. (37) dimostrarono che i piccoli pazienti con malattia diagnosticata più recentemente (< 1 anno) mostrano una migliore risposta alla terapia con infliximab, piuttosto che quelli con diagnosi di malattia di maggiore durata. Altre evidenze derivano dallo studio pilota REACH (38): i tassi di risposta e di remissione sono risultati più alti rispetto a quelli riportati negli studi di popolazioni adulte. Un trial randomizzato controllato è stato condotto con lo scopo di valutare “il trattamento medico ideale” nella MC confrontando i risultati derivanti dalle due differenti modalità di approccio al trattamento, step-up versus top down. (39) A tale scopo un totale di 129 pazienti con recente diagnosi di MC sono stati randomizzati a ricevere infliximab al dosaggio di 5 mg/Kg o steroide. I risultati non sono stati del tutto univoci. E' vero infatti che da un lato i pazienti trattati con approccio top-down presentavano un migliore outcome già alla 26<sup>o</sup> settimana, ma d'altro canto è pur vero che i valori di CDAI e IBDQ non risultavano differenti tra i due gruppi. Quest'ultima considerazione avvalorava l'ipotesi di una migliore efficacia dei farmaci biologici non misurabile solo a breve termine (mediante calcolo del CDAI o dell' IBDQ), ma soprattutto a lungo termine, (ad esempio valutando il ricorso alla chirurgia).

L'approccio top-down in maniera indiscriminata fa sorgere tuttavia qualche perplessità in termini di sicurezza in quanto tale aspetto nella terapia biologica a lungo termine non è stato finora sufficientemente dimostrato ed è attualmente non attuabile per gli elevati costi. Una migliore definizione dei markers clinici, strumentali e forse anche molecolari dei pazienti a rischio per un decorso più aggressivo della MC è auspicabile al fine di selezionare i candidati ideali che possano trarre maggiori vantaggi da un trattamento più precoce con farmaci biologici (40).

In conclusione, nella nostra esperienza un trattamento di induzione con adalimumab, indipendentemente dalla dose di induzione, è risultato sicuro e in grado di indurre rapidamente una risposta/remissione libera da steroidi nei

pazienti con MC steroideo-dipendente, sia naive ai biologici che precedentemente trattati con uno o due anti-TNF $\alpha$ . Questo dato è meritevole di approfondimento in ulteriori studi.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Shih DQ, Targan SR. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 390–400.
2. Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF. Crohn disease: Beyond antagonist of Tumor Necrosis Factor. *New Drug Class* 2008; 372:67-80.
3. Van Deventer SJH. Tumor necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997; 40: 443-8.
4. Caprilli R, Angelucci E, Clemente V. Recent advances in the management of Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2008 Sep;40(9):709-16.
5. Munkholm P, Langholz E, Davidsen M, Binder V. Frequency of glucocorticoid resistance and dependency in Crohn's disease. *Gut* 1994;35:360-362.
6. Su C, Lichtenstein GR. Treatment of inflammatory bowel disease with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gastroenterol Clin North Am* 2004;33:209-224.
7. Peyrin-Biroulet L, Desreumaux P, Sandborn WJ, Colombel JF. Crohn disease: Beyond antagonist of Tumor Necrosis Factor. *New Drug Class* 2008; 372:67-80.
8. Plevy S, Salzberg B, Van Assche G, et al. A phase I study of visilizumab, a humanized anti-CD3 monoclonal antibody, in severe steroid-refractory ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;133:1414–1422.
9. Creed TJ, Probert CS, Norman MN, et al. Basiliximab for the treatment of steroid-resistant ulcerative colitis: further experience in moderate and severe disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1435–1442.
10. Hommes DW, Mikhajlova TL, Stoinov S, et al. Fontolizumab, a humanised anti-interferon gamma antibody, demonstrates safety and clinical activity in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gut* 2006;55:1131–1137.

11. Sandborn WJ, Feagan BG, Fedorak RN, et al, for the Ustekinumab Crohn's Disease Study Group. A randomized trial of ustekinumab, a human interleukin-12/23 monoclonal antibody, in patients with moderate to severe Crohn's disease. *Gastroenterology* 2008;135:1130–1141.
12. Sandborn WJ, Colombel JF, Enns R, et al. Natalizumab induction and maintenance therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 2005;353:1912–1925.
13. Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJH, Mayer L, Present DH, Braakman T, et al. A short term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor alpha for Crohn's disease. *N Engl J Med* 1997;337:1029-35.
14. Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR, et al. Maintenance Infliximab for Crohn's disease: The ACCENT I trial. *Lancet* 2002;359:1541-1549.
15. Sands BE, Anderson FH, Bernstein CN, Chey WY, Feagan BG, et al. Infliximab maintenance therapy for fistulizing Crohn's disease. *N England J Med* 2004;350(9):877-885.
16. Sandborn WJ, Feagan BG, Stoinov S, Honiball PJ, Rutgeerts P, et al. PRECISE I Study Investigators. Certolizumab pegol for the treatment of Crohn's Disease. *New England J Med* 2007;357:228-38.
17. Schreiber S, Khaliq-Kareemi M, Lawrance IC, Thomsen , Hanauer SB, McColm J, Bloomfield R, Sandborn WJ. Maintenance therapy with certolizumab pegol for Crohn's disease. PRECISE 2 Study Investigators. *N Engl J Med*. 2007 Jul 19;357(3):239-5.
18. Vermeire S, et al. Assessment of certolizumab pegol in the treatment of Crohn's disease in patients for whom infliximab treatment was not successful: open-label induction results from the WELCOME Study. In: Congress of European Crohn's and Colitis Organisation; 28 February–1 March 2008; Lyon, France.
19. Hanauer SB, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Fedorak RN, Lukas M, Macintosh D, Panaccione R, et al. Human anti-Tumor Necrosis Factor monoclonal

- antibody (Adalimumab) in Crohn's Disease: The CLASSIC I trial. *Gastroenterology* 2006; 130:323-333.
20. Sandborn WJ, Hanauer SB, Rutgeerts P, et al. Adalimumab for maintenance treatment of Crohn's disease: results of the CLASSIC II trial. *Gut* 2007;56:1232–1239.
21. Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Panaccione R, Schreiber S, Byczkowski D, Li J et al. Adalimumab for maintenance of clinical Response and Remission in Patients with Crohn Disease: The CHARME trial. *Gastroenterology* 2007;132:52
22. Sandborn WJ, MD , Rutgeerts P, Enns R, Hanauer SB, Colombel JF, Panaccione R, D'Haens G, Li J, et al. Adalimumab Induction therapy for Crohn Disease previously treated with Infliximab a randomized trial (GAIN). *Annals of Internal Medicine* 2007; 146:829-838.
23. Wynesky MJ, Green A, Kay M, Wyllie R, Mahajan L. Safety and efficacy of adalimumab in pediatric patients with Crohn disease. *Journal pediatric Gastroenterol Nutr.* 2008 Jul;47(1):19-25.
24. Feagan BG, Panaccione R, Sandborn WJ, D'Haens GR, Schreiber S, Rutgeerts PJ, et al. Effects of adalimumab therapy on incidence of hospitalization and surgery in Crohn's disease: results from the CHARM study. *Am J Gastroenterology.* 2008;135(5):1493-9.
25. Loftus EV, Feagan BG, Colombel JF, Rubin DT, Wu EQ, Yu AP, et al. Effects of adalimumab maintenance therapy on health-related quality of life of patients with Crohn's disease: patient-reported outcomes of the CHARM trial. *Am J Gastroenterology* 2008;103(12):3132-3141.
26. Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R. Induction and maintenance nfliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology* 2007;132:863-873.

27. Rosh JR, Gross T, Mamula P, Griffiths A, Hyams J. Hepatosplenic Tcell Lymphoma in adolescents and young with Crohn's disease: A cautionary tale? *Inflammatory Bowel Disease* 2007;13:1024 –1030.
28. Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *New England Journal Medicine* 2005;353:362-8.
29. Lichtenstein GR, Feagan BG, Cohen RD, Salzberg BA, Diamond RH, et al. Serious infections and mortality in association with therapies for Crohn's disease: TREAT registry. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2006;4:621-630.
30. A. Orlando, F. Mocciaro, G. Civitavecchia, D. Scimeca, M. Cottone. Minimizing infliximab toxicity in the treatment of inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease* 40S (2008)S236 .S246.
31. L Biancone, A Orlando, A Kohn, E Colombo, Sostegni R, Angelucci E, et al. Infliximab and newly diagnosed neoplasia in Crohn's disease: a multicentre matched pair study. *Gut* 2006;55:228–233.
32. GR Burmester, P Mease, BAC Dijkmans, K Gordon, D Lovell, R Panaccione, J Perez. Adalimumab safety and mortality rates from global clinical trials of six immune-mediated inflammatory diseases. *ARD Online* First, published on January 15, 2009 as 10.1136/ard.2008.102103.
33. Best WR, Beckett JM, Singleton JW, Kern F Jr. Development of a Crohn's disease activity index: National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-44.
34. Irvine EJ, Feagan B, Rochon J, et al. Quality of life: a valid and reliable measure of therapeutic efficacy in the treatment of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;106:287-96.
35. Baert F, Noman M, Vermeire S, Van Assche G, D'Haens G, Carbonez A, Rutgeerts P. Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of

infliximab in Crohn's disease. *New England Journal of Medicine* 2003; 348:601-608.

36. Sandborn W, Rutgeerts P, Reinisch W, Mantzaris G, et al. A Randomized, Double- Blind, Controlled Trial Comparing Infliximab and Infliximab plus Azathioprine to Azathioprine in Patients with Crohn's Disease Naive to Immunomodulators and Biologic Therapy: The SONIC Trial. *Am J Gastroenterol.* 2008; 103 ( Suppl 1): Abstract 1117.

37. Lionetti P, Bronzini F, Salvestrini C, Bascietto C, Canani RB, De angelis GL et al. Response to infliximab is related to disease duration in pediatric Crohn disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 18:425-31.

38. Hyams J, Crandall W, Kugathasan S, Griffiths A, Olson A, Johanss J, Liu G, Travers S, Heuschkel R, Markowitz J, Cohen S, Winter H, Veereman-Wauters G, Ferry G, Baldassano R. Induction and maintenance infliximab therapy for the treatment of moderate-to-severe Crohn's disease in children. *Gastroenterology* 2007;132:863-873.

39. Hommes DW, Baert f, van Assche G, Caenepeel P, Vergauwe P, Tuynman H et al.: A randomized controlled trial evaluating the ideal medical management for Crohn Disease. Top down versus step up strategies. *Gastroenterology* 2006, 130:A108-A109.

40. Beaugerie L, Seksik P, Nion-Larmurier I, Gendre JP, Cosnes. Predictors of Crohn's disease. *J.Gastroenterology.* 2006 Mar;130(3):650-6.