

## Terapias emergentes en artritis reumatoide

Juan C Aguillón G<sup>1,a</sup>, Andrea Cruzat C<sup>1,b</sup>,  
Juan Contreras-Levicoy<sup>1,b</sup>, Andrés Dotte G<sup>1,b</sup>,  
Bárbara Pesce R<sup>1,c</sup>, Octavio Aravena M<sup>1,c</sup>,  
Lorena Salazar A<sup>1,d</sup>, Diego Catalán M<sup>1,d</sup>, Paula Abello C<sup>1,e</sup>,  
Adam Aguirre D<sup>1,f</sup>, Carolina Llanos M<sup>1,2,g</sup>,  
Miguel Cuchacovich T<sup>2</sup>.

### *Emergent therapies for rheumatoid arthritis*

*The use of biological agents such as etanercept, infliximab, adalimumab and anakinra has been recently approved for the treatment of rheumatoid arthritis. All are effective controlling signs and symptoms and inhibiting disease progression. To overcome the problems generated by their high costs and possible participation in reactivating latent infections, other therapeutic tools are being developed. Gene therapy using expression vectors carrying genes coding for specific proteins, may interfere in key points involved in the pathogenesis of the disease. Intra-articular administration of cDNA coding for soluble TNF receptors, IL-1, or IL-1Ra decreases signs of the disease in animal models. Vectors, expressing inhibitors of signal transduction pathways involving to NF-κB and JAK-STAT-3, are effective in modulating joint inflammation in mice. The use of antigen-pulsed antigen presenting cells or dendritic cells (DC) bound to apoptosis-inducing molecules, specifically eliminates autoreactive T cells. Other novel approach attempts the development of T regulatory-inducing tolerogenic DC-based vaccines that inhibit autoreactive T cells, through the secretion of suppressing cytokines or by other mechanisms to be elucidated. Oral tolerance induction to auto-antigens is also a successful experimental strategy under study. Current research aims to control peripheral tolerance in rheumatoid arthritis patients (Rev Méd Chile 2005; 133: 969-76).*

**(Key Words:** Arthritis, rheumatoid; Biological therapy; Gene therapy)

Recibido el 6 de octubre, 2004. Aceptado el 18 de enero, 2005.

Trabajo financiado por Proyectos: FONDEF DO311055 y FONDECYT 1040439 y 1040860.

<sup>1</sup>Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. <sup>2</sup>Sección de Reumatología, Departamento de Medicina, Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santiago de Chile. <sup>a</sup>Ph.D.

<sup>b</sup>Estudiante de VII año de Medicina, Universidad de Chile. <sup>c</sup>Licenciado en Bioquímica.

<sup>d</sup>Estudiante de Doctorado en Ciencias Biomédicas. <sup>e</sup>Licenciado en Medicina Veterinaria.

<sup>f</sup>Estudiante de Doctorado en Bioquímica. <sup>g</sup>Estudiante de Doctorado en Ciencias Médicas.

*Correspondencia a:* Juan C Aguillón, Ph.D. Programa Disciplinario de Inmunología, Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia 1027, Santiago, Chile. Tel: (56-2) 9786724. Fax: 56 2 735.3346. E mail: jaguillo@med.uchile.cl

Durante los últimos años, se ha alcanzado un progreso substancial en el entendimiento de la inmunopatogénesis de diferentes enfermedades inflamatorias. Además, el progreso en biotecnología ha permitido el desarrollo de agentes biológicos que apuntan a moléculas y mecanismos específicos. Aun cuando es un hecho establecido, la participación de citoquinas proinflamatorias, tales como, interleuquina (IL)-1 e IL-6 en enfermedades reumatológicas y otros estados inflamatorios, el factor de necrosis tumoral (TNF) sería el principal efector regulador, teniendo una posición preponderante en la patogénesis de éstas. Por este motivo, en recientes estudios, se apunta a la neutralización específica de dichas citoquinas proinflamatorias, enfoque que ha tenido un éxito comprobado en enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide<sup>1,2</sup>, enfermedad de Crohn<sup>3</sup> y pelviespondilopatías<sup>4</sup>, entre otras.

#### ARTRITIS REUMATOIDE

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune que afecta primariamente a la membrana sinovial y conduce a la destrucción de las articulaciones con degeneración del cartilago y erosión del hueso yuxta-articular como consecuencia de un proceso inflamatorio crónico.

*Patogénesis y terapias biológicas.* A partir de estudios en modelos animales<sup>5</sup> y clínicos en pacientes con AR<sup>6</sup>, se descubrió que el TNF e IL-1 están directamente involucrados en la patogénesis de esta enfermedad. Gracias a un mejor entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos que actúan en la AR, han aparecido nuevas armas terapéuticas que han modificado enormemente el enfrentamiento y abordaje de la enfermedad<sup>7</sup>. Estas nuevas terapias, conocidas como biológicas, antagonizan la acción del TNF e IL-1, las citoquinas iniciadoras de la cascada, que mantienen la inflamación sinovial y lideran la destrucción articular, cumpliendo un rol regulador sobre las otras citoquinas proinflamatorias, quimioquinas y factores de crecimiento expresados en las articulaciones afectadas. Han sido extensamente investigadas dos formas de inhibir el TNF como terapias en AR: anticuerpos monoclonales anti-TNF tanto quiméricos (Infliximab)<sup>1,8</sup> como completamente humanos

(Adalimumab)<sup>2</sup> y el receptor de TNF fusionado a un fragmento Fc de inmunoglobulina (Etanercept)<sup>9</sup>. Mientras que para IL-1 se ha desarrollado el antagonista de su receptor (IL-1Ra) de tipo recombinante (Anakinra)<sup>10</sup>.

Ensayos multicéntricos, randomizados, controlados con placebo, se han publicado recientemente, confirmando que el uso prolongado de agentes biológicos contra TNF como terapia en la AR es seguro, incrementa la mejoría en forma sostenida en los síntomas y signos de la enfermedad y la calidad de vida en 60-70%<sup>11</sup>. Por lo anterior, los tres principales agentes anti-TNF: etanercept, infliximab y adalimumab, además de anakinra, han sido recientemente aprobados por la *Food and Drugs Administration* (FDA) de USA y la *European Drug Authorities* (EDA) en Europa<sup>12</sup>.

*Mecanismo de acción.* Al TNF se le atribuye un rol central en el inicio y perpetuación del daño crónico y la destrucción última, característica de la AR, al controlar la cascada y promover la liberación de citoquinas proinflamatorias como IL-1, factor estimulante de colonias monocíticas-granulocíticas (GM-CSF) e IL-8. También induce la expresión de altos niveles de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I, la síntesis y liberación de proteasas y prostaglandina E2 por fibroblastos sinoviales (lo que es importante en la erosión del cartilago y hueso), la neoangiogénesis sinovial<sup>13</sup> y eleva la cantidad de otros péptidos y mediadores lipídicos inflamatorios producidos en los órganos enfermos. El TNF también estimula varias otras células, incluyendo neutrófilos, fibroblastos sinoviales y condrocitos.

Los niveles de esta citoquina se encuentran elevados en el suero, el tejido y fluido sinovial de pacientes con AR<sup>14</sup>. Algunos trabajos sugieren que los monocitos de pacientes con AR temprana, sobreproducen TNF cuando están activados<sup>15</sup>. Ensayos clínicos en AR, han demostrado que el mecanismo de acción de los antagonistas de TNF incluyen una retroalimentación negativa de diversos agentes proinflamatorios, como IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1 y la producción de VEGF, disminuye el reclutamiento de células inmunes e inflamatorias a las articulaciones, viéndose un efecto más general en los linfocitos T<sup>16</sup>, se regula la angiogénesis y se reducen los niveles séricos de metaloproteinasas de la matriz<sup>6</sup>. Se postula que la disminución sérica

de moléculas de adhesión refleja la menor activación de células endoteliales en la microvasculatura sinovial, llevando a una reducción de la migración de los leucocitos a las articulaciones sinoviales y prolongando el efecto terapéutico de los bloqueadores de TNF en la AR<sup>17</sup>.

Otros estudios han demostrado claramente que bloqueando la actividad de TNF, se disminuye la reacción de fase aguda y hay menores niveles sistémicos y locales de moléculas de adhesión en pacientes con AR<sup>18</sup>.

La IL-1 constituye la segunda principal citoquina proinflamatoria en AR. IL-1Ra, su antagonista natural a nivel de su receptor, actúa de forma competitiva y permite bloquear la activación del receptor impidiendo la transducción de señales a nivel intracelular. Se ha demostrado que los pacientes con AR poseen niveles disminuidos de IL-1Ra en las articulaciones afectadas<sup>19</sup>.

*Comparación con drogas modificadoras de la actividad reumática (DMARDS).* La medición de la efectividad terapéutica de las nuevas drogas se realiza según los criterios definidos por la *American College of Rheumatology* (ACR) que incluyen: el número de articulaciones inflamadas y dolorosas, más una mejoría similar en al menos tres de los siguientes: dolor, evaluación general definida por el médico o el paciente, autoevaluación de inhabilidad física y niveles de reactantes de fase aguda. ACR20 se define como una reducción de 20% en los criterios mencionados, ACR50 como 50% o más, y ACR 70 como 70% o más<sup>20</sup>.

La terapia establecida actualmente con drogas antirreumáticas, como el metotrexato (MTX), sulfasalazina, hidroxicloroquina y leflunomida, que son aceptadas como la terapia «*gold standard*», llevan a cierta mejoría de los síntomas, pero son incapaces de detener la destrucción articular<sup>21</sup>. Son de acción lenta, ocasionalmente tóxicas y poco eficaces en casos severos. En estudios comparativos entre el tratamiento con etanercept y MTX en pacientes con AR, el primero actúa más rápidamente en la disminución de síntomas y retarda el daño articular; además presenta menores efectos adversos e infecciones que MTX<sup>22</sup>. La terapia convencional para la AR, sin ser antagonista específico del TNF, podría trabajar en parte, a través de la reducción, en algún grado, de los niveles de TNF. Así por ejemplo, los inhibidores de la ciclooxigenasa pueden atenuar

muchos de los efectos agudos del TNF<sup>23</sup> y los corticoesteroides, a través de su acción antiinflamatoria, en que inhiben parcialmente la producción de diversas citoquinas, incluyendo TNF<sup>24</sup>. Las distintas drogas anti-TNF y anti-IL-1, asociadas a MTX, tienen efecto beneficioso al ser comparadas contra placebo.

La combinación de etanercept y MTX fue significativamente mejor en reducir la actividad de la enfermedad, mejorar las limitaciones funcionales, y retardar la progresión radiológica de las lesiones óseas, al ser comparadas contra cada medicamento solo<sup>25</sup>.

En aquellos pacientes que mostraban respuesta incompleta al tratamiento con MTX solo, al agregar infliximab lograban una mejoría clínica significativa en su función física y calidad de vida, acompañado de inhibición de la progresión radiológica del daño articular, además, de una mejoría sustancial en los síntomas y signos de enfermedad (ACR20 de 48%) al ser comparado con MTX solo (ACR20 de 16%)<sup>26,27</sup>.

Resultados similares se han observado en el uso de adalimumab<sup>28</sup>, el cual tiene efecto aditivo en las distintas dosis usadas, lográndose hasta 18% en ACR70<sup>29</sup>. En tanto, anakinra, al igual que los anti-TNF, al ser asociada con MTX es más eficaz que MTX solo, logrando hasta 6% de respuesta en ACR70 versus 2% con MTX solo<sup>10</sup>.

Por otra parte, todos los medicamentos anti-TNF, al inhibir de algún modo la inmunidad celular, poseen el riesgo de tuberculosis u otra infección latente. Anakinra también ha mostrado conferir riesgo aumentado de infección, mayor si se combina con anti-TNF, además de producir neutropenia<sup>12</sup>. Pero claramente ésta constituiría una inmunodepresión mucho más selectiva en comparación a la masiva inhibición sobre el sistema inmunológico dada por las drogas de rutina, incrementándose de manera significativa el riesgo a infecciones oportunistas.

#### NUEVAS ARMAS BIOLÓGICAS

A pesar del beneficio aportado por los agentes biológicos antes mencionados, éstos poseen limitantes tales como: efectos secundarios sistémicos, reactivación de infecciones latentes, requerimiento de dosis repetidas para mantener su efecto y finalmente, lo exorbitante de su precio (aproximadamente US\$ 10.000/año/paciente).

Lo antes enunciado, ha generado la necesidad del desarrollo de terapias alternativas basadas en enfoques diferentes e innovadores.

**Terapia génica.** Estudios en modelos animales han demostrado que la aplicación de la terapia génica es eficaz en el tratamiento de diversas patologías autoinmunes. Las potenciales ventajas de esta nueva terapia se basan en que los productos génicos pueden ser liberados localmente en el área afectada, mediante inyección intra-articular y transfección de células sinoviales. Lo anterior puede tener impacto en disminuir los efectos adversos, aumentar la selectividad, producto de transporte órgano-específico (mediante el uso de células-T, células presentadoras de antígeno o dendríticas, que luego de la inyección sistémica se localizan en el área de inflamación), y aumentar y mantener los niveles circulantes en el tiempo. Relevante a este último aspecto es el caso de la transfección de células musculares o hepáticas, cuyo producto se distribuye en forma sistémica.

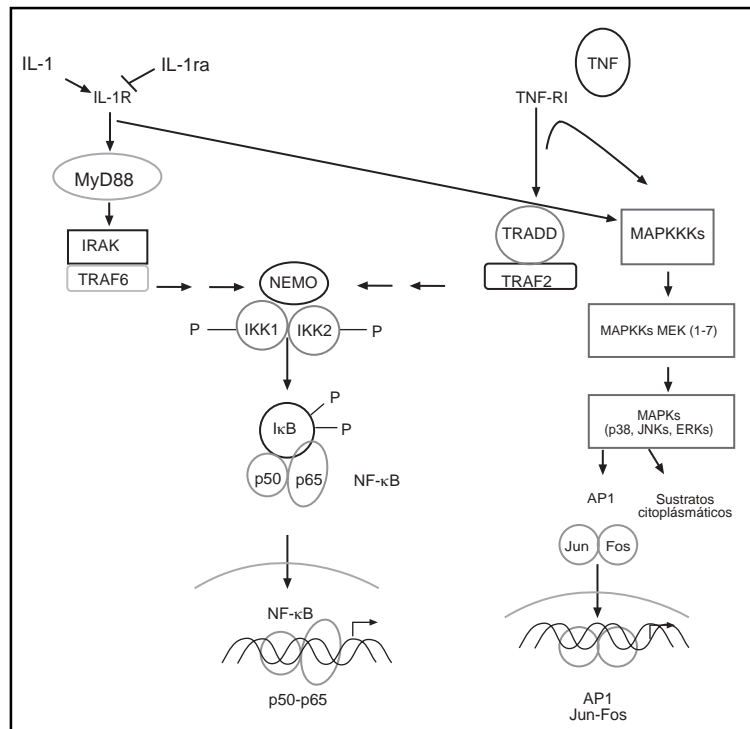
Con el fin de dosificar la terapia, existen dos enfoques metodológicos: el primero, considera la extracción de las células blanco y luego de su manipulación en medios de cultivos, inyectarlas al

sitio de interés (técnica *ex vivo*). En el segundo enfoque, se contempla la inyección directa de un vector, ya sea viral, plasmidial, o célula modificada genéticamente, que transporta ADN de interés, directamente al sitio en donde se requiere la expresión (técnica *in vivo*)<sup>30</sup>. Mediante el uso de esta tecnología, se puede expresar por varios meses en forma local (al transfectar sinoviocitos) o sistémica (al transfectar células musculares o hepáticas) distintos productos génicos que van a alterar diferentes puntos claves en la patogénesis de esta enfermedad.

De manera similar a lo que ocurre con la terapia antagonista de TNF, se ha observado que la administración intra-articular de cADNs codificantes de receptores solubles de TNF, de IL-1 e IL-1Ra, disminuyen la intensidad de la enfermedad en modelos animales<sup>31</sup>.

Es un hecho demostrado que NF-κB y JAK-STAT-3, son las principales vías de transducción de señales intracelulares involucradas en la expresión de genes asociados con la inflamación y la destrucción tisular en AR. El uso de vectores con inhibidores de esta vía han mostrado eficacia en modelos animales, disminuyendo la severidad de la artritis y la inflamación articular (Figura 1)<sup>32,33</sup>.

Figura 1. Las vías de transducción NF-κB y MAPK son las principales activadas por citoquinas proinflamatorias tales como factor de necrosis tumoral (TNF) e interleuquina-1 (IL-1). La acción de moléculas antagonistas de TNF o IL-1 impiden la unión a sus receptores y como consecuencia la inducción de las cascadas de transducción de señales y subsiguiente activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB. La actividad de las distintas quinasas y de los factores de transcripción constituye blancos terapéuticos que están siendo estudiados. AP-1, *activator protein-1*; IRAK, *IL-1 receptor associated kinase*; MAPK, *mitogen-activated protein kinase*; MyD88, *myeloid differentiation protein 88*; NEMO, *NF-κB essential modulator*; NF-κB, *nuclear factor-κB*; TRADD, *TNF receptor-associated death domain protein*; TRAF, *TNF receptor-associated factor*.



El *pannus* de las articulaciones contribuye a la destrucción articular, comportándose como una neoplasia. Se han diseñado estrategias para contrarrestarlo, destruyendo directamente células sinoviales, inhibiendo su división, induciendo apoptosis o interfiriendo con la circulación sanguínea de suministro. Mediante la inyección intra-articular de plásmidos de ADN codificantes de timidina quinasa del virus herpes simplex asociado a ganciclovir, se ha logrado en modelos animales una sinovectomía genética<sup>34</sup>. La inducción de apoptosis mediante el uso de p53 ha mostrado un efecto antiinflamatorio<sup>35</sup>. La inhibición de proliferación celular y los inhibidores angiogénicos también han tenido resultados satisfactorios en modelos animales.

Se ha descrito que a nivel de la articulación, las células T autorreactivas, tienen la propiedad de desplazarse hacia los sitios que poseen actividad inflamatoria, poseen una vida media prolongada y entran en proliferación una vez que se encuentran con el auto-antígeno específico. Por lo anterior, a estas células T se las puede considerar como buenos blancos de la terapia génica. Especialmente, por tratarse de una respuesta antígeno específica, no afectaría la respuesta inmunológica contra otras eventuales agresiones, como ha sido observado con la terapia anti-TNF.

Usando células T específicas de antígenos articulares y transfectadas con genes codificantes del receptor soluble de TNF, se ha logrado inhibir la enfermedad en las articulaciones ya afectadas, prevenir el avance de la enfermedad hacia nuevas articulaciones, y disminuir la actividad de las células B, efecto no logrado con las otras terapias anti-TNF<sup>30</sup>.

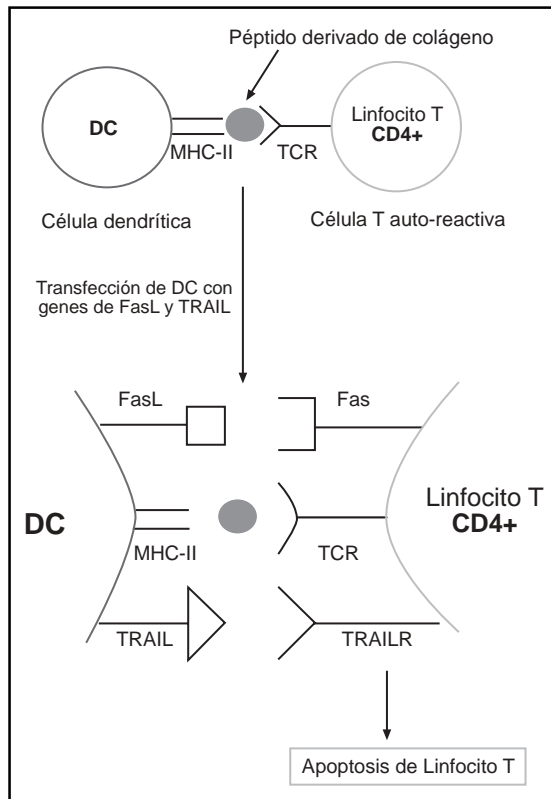


Figura 2. Inducción de apoptosis en células T CD4<sup>+</sup> auto-reactivas, mediada por la expresión de FasL y TRAIL en células dendríticas (DC). MHC II, *major histocompatibility complex class II*; TCR, *antigen T cell receptor*; TRAIL, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*; TRAILR, *TRAIL receptor protein*.

**Terapia celular adoptiva: uso de células dendríticas.** Dentro de la patogénesis de la AR, se ha establecido la participación de células T autorreactivas contra una variedad de autoantígenos no bien definidos. Dichos antígenos son presentados a la célula T por una célula presentadora de antígeno, dentro de las cuales, las más importantes están constituidas por las células dendríticas, que interactúan en forma específica con la célula T autorreactiva (Figura 2).

Recientemente se ha logrado inducir la apoptosis de dichas células autorreactivas, mediante la interacción con un inductor de apoptosis. Dentro de éstos se encuentran Fas ligando (FasL) y el ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL). Los receptores para ambas moléculas se encuentran en los linfocitos T. El vehículo utilizado para transportar estas señales es la célula dendrítica. En modelos murinos de artritis inducida por colágeno, se ha observado supresión de la enfermedad, al usar células dendríticas genéticamente modificadas para expresar FasL y TRAIL y pulsadas con colágeno, sin que se vean afectados los linfocitos T no autorreactivos, por tanto sin afectar el resto de la inmunidad (Figura 2).

Como se describe, las células dendríticas modificadas sólo inducen apoptosis en los linfocitos T que reconocen específicamente al colágeno desplegado en las moléculas MHC clase II presentes en la superficie de las células dendríticas. Este nuevo

enfrentamiento, más específico, ha generado gran entusiasmo no solo en AR, sino que en muchas enfermedades autoinmunes y cáncer. En el caso de AR se enfrenta la limitación que el antígeno contra el cual el sistema inmune se hace autorreactivo, aún es desconocido, y probablemente sean varios<sup>36,37</sup>. En caso de identificarse tal autoantígeno es posible pensar en una cura para la AR.

*Células dendríticas tolerogénicas.* Las células dendríticas en el timo son responsables de la tolerancia central, mientras en los tejidos inducirían tolerancia periférica. Esta última, sería mediada por células dendríticas inmaduras o semimaduras, que en ausencia de estímulo de maduración, presentarían antígenos tisulares a linfocitos T, en un contexto subestimulatorio<sup>38</sup>. Uno de los mecanismos propuestos para ello, sería la generación de células T reguladoras (Tr) que impiden la función de las células T, a través de la secreción de citoquinas supresoras, además de otros mecanismos aún no dilucidados. Este mecanismo, ha sido recientemente aplicado al modelo de encefalitis experimental autoinmune, induciendo células Tr CD4+ productoras de IL-10 y demostrando su rol en la modulación de esta patología<sup>39</sup>.

Nuestro grupo de investigación, usando el modelo de artritis murina inducida por colágeno, se encuentra explorando el desarrollo de una terapia inmunorreguladora de la función de las células T autorreactivas. Así, se espera que la inoculación de células dendríticas murinas inmaduras o semimaduras, pulsadas con colágeno tipo II, induzca subpoblaciones de linfocitos T CD4+ antígeno-específicos, productores de IL-10, que modifiquen tanto el curso de la artritis murina inducida por colágeno, como también el patrón de respuesta T «helper» 1, responsable de la perpetuación de la enfermedad y progresión del daño en la misma.

*Inducción de tolerancia oral con péptidos antigénicos.* Son varios los estudios orientados al tratamiento de AR, a través de la inducción de tolerancia oral, con diferentes auto-antígenos. Probablemente, el más utilizado ha sido el colágeno tipo II de distintos orígenes, obteniéndose respuestas clínicas de moderada magnitud<sup>40</sup>. Sin embargo, recientemente se ha informado de resultados bastante alentadores, mediante el uso de un péptido derivado de la proteína de «shock» térmico bacteriana, la cual presenta homología con cinco aminoácidos de la secuencia

del «epitopo compartido», correspondiente a los residuos de la posición 70-74 de la cadena β de la molécula MHC II, que conforman la hendidura de unión peptídica de la molécula MHC y compartida esta especificidad alélica por un importante porcentaje de enfermos con AR. Los pacientes fueron tratados oralmente con este péptido, durante seis meses, observándose un quiebre de la respuesta T «helper» 1 de las células T, expresado en un aumento de los niveles de producción de IL-4 e IL-10 y una disminución de los niveles de IFNγ, IL-2 y TNF, responsables estas últimas de la perpetuidad de la respuesta inflamatoria<sup>41</sup>.

#### CONSIDERACIONES FINALES

A pesar de lo reciente de la introducción al mercado de fármacos antagonistas de la actividad de citoquinas proinflamatorias, parece ser que éstos han mostrado ser relativamente seguros y efectivos, por lo menos en el corto y mediano plazo en el tratamiento de la AR. Por otra parte, ya son varias las aplicaciones de la terapia antagonista de TNF en el tratamiento de otras enfermedades, tales como espondilitis anquilosante, artritis juvenil, psoriasis, enfermedad de Still, uveítis y vasculitis<sup>7</sup>, mientras que otros usos se encuentran en investigación.

Cabe señalar, que durante las últimas dos décadas, el desarrollo de nuevas terapias para la AR, ha sido un acontecimiento no frecuentemente observado en otras áreas. Hoy, la AR puede ser controlada adecuadamente en muchos pacientes de países desarrollados, siendo las manifestaciones extra-articulares como la vasculitis, situaciones más bien esporádicas. Esto ha sido posible con la incorporación de dosis más eficientes de metotrexato y sulfasalazina, o el uso de leflunomida, y especialmente, la introducción de los antagonistas de citoquinas, pero además, el consenso que existe en iniciar el tratamiento con drogas modificantes de la enfermedad reumática (DMARD), apenas se haya realizado el diagnóstico de la enfermedad.

Un hecho importante a destacar, es la disponibilidad de alternativas terapéuticas cuyo mecanismo de acción opera a distinto nivel, permitiendo probar más de una estrategia en un individuo y evitando llegar a las dosis máximas de las drogas habituales, ahorrándose la inmensa gama de efectos colaterales y adversos. Otro elemento interesante, es que varios de

los enfoques hoy en estudio, apuntan a entender y solucionar el problema de la autoinmunidad, en términos mecanísticos, más que interferir en vías intermedias que no dan cuenta del origen del

problema. Tal es el caso de los estudios que se realizan a nivel del restablecimiento de la regulación de la función de los linfocitos T CD4+ autorreactivos, basado en el uso de células dendríticas tolerogénicas.

REFERENCIAS

1. ELLIOT MJ, MAINI RN, FELDMANN M, LONG-FOX A, CHARLES P, KATSIKIS P ET AL. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Arthritis Rheum* 1993; 36: 1681-90.
2. RANKIN EC, CHOY EH, KASSIMOS D, KINGSLEY GH, SOPWITH AM, ISENBERG DA ET AL. The therapeutic effects of an engineered human anti-tumour necrosis factor alpha antibody (CDP571) in rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34: 334-42.
3. PRESENT DH, RUTGEERTS P, TARGAN SR, HANAUER SB, MAYER L, VAN HOGEZAND RA ET AL. Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N England J Med* 1999; 340: 1398-405.
4. BRAUN J, DE KEYSER F, BRANDT J, MIELANTS H, SIEPER J, VEYS E. New treatment options in spondyloarthropathies: increasing evidence for significant efficacy of anti-tumor necrosis factor therapy. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 245-9.
5. JOOSTEN LA, HELSEN MM, VAN DE LOO FA, VAN DE BERG WB. Anticytokine treatment of established type II collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 797-809.
6. FELDMANN M, MAINI RN. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (Oxford) 1999; 38 Suppl 2: 3-7.
7. AGUILLÓN JC, CONTRERAS J, DOTTE A, CRUZAT A, CATALÁN D, SALAZAR L ET AL. New immunological weapons for medicine in the 21<sup>st</sup> century: Biological therapy based on the use of the latest generation monoclonal antibodies. *Rev Méd Chile* 2003; 131: 1445-53.
8. ELLIOT MJ, MAINI RN, FELDMANN M, KALDEN JR, ANTONI C, SMOLEN JS ET AL. Randomized double-blind comparison of chimeric monoclonal antibody to tumour necrosis factor alpha (cA2) versus placebo in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1994; 344: 1105-10.
9. MORELAND LW, SCHIFF MH, BAUMGARTNER SW, TINDALL EA, FLEISCHMANN RM, BULPITT KJ ET AL. Etanercept therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Intern Med* 1999; 130: 478-86.
10. COHEN SB, MORELAND LW, CUSH JJ, GREENWALD MW, BLOCK S, SHERGY WJ ET AL. A multicentre, double blind, randomized, placebo controlled trial of anakinra (Kineret), a recombinant interleukin 1 receptor antagonist, in patients with rheumatoid arthritis treated with background methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1062-8.
11. KEMPENI J. Preliminary results of early clinical trials with the fully human anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody D2E7. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 (suppl I): 170-2.
12. OLSEN NJ, STEIN CM. New drugs for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2004; 350: 2167-79.
13. LUPA E, MONTRUCCHIO G, BATTAGLIA E, MODENA V, CAMUSSI G. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  and platelet-activating factor in neoangiogenesis induced by sinovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1690-4.
14. BRENNAN FM, MAINI RN, FELDMANN M. TNF $\alpha$ -pivotal role in rheumatoid arthritis? *Br J Rheumatol* 1992; 31: 293-8.
15. LEIRISALO-REPO M, PAIMELA L, JAATTELA M, KOSKIMIES S, REPO H. Production of TNF by monocytes of patients with early rheumatoid arthritis is increased. *Scand J Rheumatol* 1995; 24: 366-71.
16. RAZA A. Anti-TNF therapies in rheumatoid arthritis, Crohn's disease, sepsis, and myelodysplastic syndromes. *Microsc Res Tech* 2000; 50: 229-35.
17. TAK PP, TAYLOR PC, BREEDVELD FC, SMEETS TJ, DAHA MR, KLUIN PM ET AL. Decrease in cellularity and expression of adhesion molecules by anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  monoclonal antibody treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996; 39: 1077-81.
18. BRENNAN FM, CHANTRY D, JACKSON A, MAINI R, FELDMANN M. Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1989; 2: 244-7.
19. AREND WP, MALYAK M, GUTHRIDGE CJ, GABAY C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol* 1998; 16: 27-55.
20. FELSON DT, ANDERSON JJ, BOERS M, BOMBARDIER C, FURST D, GOLDSMITH C ET AL. American College of Rheumatology. Preliminary definition of improvement in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1995; 38: 727-35.
21. HARAOUI B, STRAND V, KEYSTONE E. Biologic agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Pharm Biotechnol* 2000; 1: 217-33.
22. BATHON JM, MARTIN RW, FLEISCHMANN RM, TESSER JR, SCHIFF MH, KEYSTONE EC. A comparison of etaner-

- cept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N England J Med* 2000; 343: 1586-93.
23. KETTELHUT IC, FIERS W, GOLDBERG AL. The toxic effects of tumor necrosis factor *in vivo* and their prevention by ciclooxigenase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4273-7.
  24. BARRERA P, BOERBOOMS AMT, VAN DE PUTTE, VAN DER MEER JWM. Effects of antirheumatic agents on cytokines. *Semin Arthritis Rheum* 1996; 25: 234-53.
  25. KLARESKOG L, VAN DER HEIJD D, DE JAGER JP, GOUGH A, KALDEN J, MALAISE M ET AL. TEMPO (Trial of Etanercept and Methotrexate with Radiographic Patient Outcomes) study investigators. Therapeutic effect of the combination of etanercept and methotrexate compared with each treatment alone in patients with rheumatoid arthritis: double-blind randomized controlled trial. *Lancet* 2004; 363: 675-81.
  26. MAINI RN, BREEDVELD FC, KALDEN JR, SMOLEN JS, FURST D, WEISMAN MH ET AL. Anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. Sustained improvement over two years in physical function, structural damage, and signs and symptoms among patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab and methotrexate. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1051-65.
  27. CUCHACOVICH M, FERREIRA L, ALISTE M, SOTO L, CUENCA J, CRUZAT A ET AL. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels and influence of -308 TNF- $\alpha$  promoter polymorphism on the responsiveness to infliximab in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Rheumatol* 2004; 33: 228-32.
  28. KEYSTONE EC, KAVANAUGH AF, SHARP JT, TANNENBAUM H, HUA Y, TEOH LS ET AL. Radiographic, clinical and functional outcomes of treatment with adalimumab (a human anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody) in patients with active rheumatoid arthritis receiving concomitant methotrexate therapy: a randomized, placebo-controlled, 52-week trial. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 1400-11.
  29. VAN DE PUTTE LB, ATKINS C, MALAISE M, SANY J, RUSSELL AS, VAN RIEL PL ET AL. Efficacy and safety of adalimumab as monotherapy in patients with rheumatoid arthritis for whom previous disease modifying antirheumatic drug treatment has failed. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 508-16.
  30. ROBBINS PD, EVANS CH, CHERNAJOVSKY Y. Gene therapy for arthritis. *Gene Therapy* 2003; 10: 902-11.
  31. GOULD DJ, BRIGHT C, CHERNAJOVSKY Y. Inhibition of established collagen-induced arthritis with a tumor necrosis factor- $\alpha$  inhibitor expressed from a self-contained doxycycline regulated plasmid. *Arthritis Res Ther* 2004; 6: R103-13.
  32. ZHANG HG, HUANG N, LIU D, BILBAO L, ZHANG X, YANG P ET AL. Gene therapy that inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappaB results in tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis of human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1094-105.
  33. SHOUDA T, YOSHIDA T, HANADA T, WAKIOKA T, OISHI M, MIYOSHI K ET AL. Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 2001; 108: 1781-8.
  34. SANT SM, SUÁREZ TM, MOALLI MR, WU BY, BLAIVAS M, LAING TJ ET AL. Molecular lysis of synovial lining cells by *in vivo* herpes simplex virus-thymidine kinase gene transfer. *Hum Gene Ther* 1998; 9: 2735-43.
  35. LU X, FAIRBAIRN DW, BRADSHAW WS, O'NEILL KL, EWERT DL, SIMMONS DL. NSAID-induced apoptosis in Rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts is dependent on v-src and c-myc and is inhibited by bcl-2. *Prostaglandins* 1997; 54: 549-68.
  36. EVANS CH. On the TRAIL of an arthritis cure. *Gene Therapy* 2004; 11: 735-6.
  37. KIM SH, KIM S, OLIGINO TJ, ROBBINS PD. Effective treatment of established mouse collagen-induced arthritis by systemic administration of dendritic cells genetically modified to express FasL. *Mol Ther* 2002; 6: 584-90.
  38. STEINMAN RM, HAWIGER D, NUSSENZWEIG MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 685-711.
  39. MENGES M, ROSSNER S, VOIGTLANDER C, SCHINDLER H, KUKUTSCH NA, BOGDAN C ET AL. Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med* 2002; 195: 15-21.
  40. TOUSSIROT EA. Oral tolerance in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002; 1: 45-2.
  41. PRAKKEN BJ, SAMODAL R, LE TD, GIANNONI F, YUNG GP, SCAVULLI J ET AL. Epitope-specific immunotherapy induces immune deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 4228-33.