




**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Tesi doctoral**

**ESTUDIS FARMACOGENÈTICS DELS FÀRMACS  
INHIBIDORS D'INTERLEUCINA-6 EN EL TRACTAMENT  
DE L'ARTRITIS REUMATOIDE**

**Luis Sainz Comas**

Directors de tesi Patricia Moya Alvarado / Héctor Corominas Macias  
Tutor de tesi Jordi Casademont i Pou

Barcelona, 2024





# **ESTUDIS FARMACOGENÈTICS DELS FÀRMACS INHIBIDORS D'INTERLEUCINA-6 EN EL TRACTAMENT DE L'ARTRITIS REUMATOIDE**

**Tesi doctoral presentada per optar al grau de doctor  
per la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)**

Programa de Doctorat en Medicina, Departament de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

Doctorand  
**Luis Sainz Comas**

Directors de tesi  
**Patricia Moya Alvarado**  
**Héctor Corominas Macias**

Tutor de tesi  
**Jordi Casademont i Pou**

Barcelona, 2024

**UAB**  
**Universitat Autònoma  
de Barcelona**



# Agraïments

En primer lloc, voldria agrair a Hèctor Corominas i Patricia Moya. Hèctor, moltes gràcies per haver-me acompanyat i guiat des d'inclús abans d'haver escollit Reumatologia a Sant Pau fins al moment actual, fent possible seguir formant part d'aquest equip i completant aquest projecte. Gràcies per la teva capacitat de fer brillar la gent del teu voltant. Patri, gràcies per la teva direcció i suport constant, però sobretot per ensenyar-me tant cada dia i obrir-me camí. Et considero una de les meves referents i voldria agrair-te els teus valuosos consells.

Aquest treball no hagués estat possible sense la col·laboració sinèrgica del servei de Genètica. Gràcies Adriana Lasa i Sara Bernal per aportar la vostra expertesa en les nostres reunions d'equip. Voldria agrair principalment a Pau Riera. Per acompanyar-me i per ensenyar-me, no només les bases de la farmacogenètica, sinó què és realment investigar. Per últim, agrair la Dra. Montserrat Baiget, sense la qual no s'hagués iniciat aquesta apassionant línia d'investigació.

Gràcies també a Jordi Casademont, per ser un referent acadèmic i donar un cop de mà sempre que ha sigut necessari.

Als meus companys de Reumatologia de Sant Pau, gràcies pel vostre suport científic, però sobretot per fer-me sentir part d'aquesta família. En especial, vull agrair el paper d'Ana Laiz que va ser clau per iniciar-me en aquest projecte. La teva guia ha estat i serà fonamental, sempre seràs la meva tutora. Gràcies a la meva amiga Milena, per tot el que m'has ensenyat i pel teu suport al llarg d'aquests anys.

Als meus pares, Roser i Sergio, per l'amor, l'educació rebuda i totes les facilitats que m'han permès créixer i estudiar el que he volgut. A les meves germanes, Marina i Alicia, per ensenyar-me amb l'exemple que es pot brillar en qualsevol camp sense deixar de ser "normal".

Evidentment, també a tu Nora, companya de vida. Ets el motiu principal per tornar feliç a casa cada dia.

Per últim, no podria acabar sense donar les gràcies a la Societat Catalana de Reumatologia per el seu suport a aquest projecte i a tots els pacients amb Artritis Reumatoide que han col·laborat de forma altruista en pro de l'avenç científic.

# Abreviatures i Acrònims

ACPA:	anticossos contra les proteïnes citrul·linades
ACR:	<i>American College of Rheumatology</i>
ADA:	adalimumab
ADN:	àcid desoxiribonucleic
Anti-TNF:	anticossos contra el factor de necrosis tumoral
Anti-IL-6R:	anticossos contra interleucina-6
AR:	artritis reumatoide
ARN:	àcid ribonucleic
CDAI:	<i>Clinical Disease Activity Index</i>
DAS28:	<i>Disease Activity Score 28</i>
EA:	efectes adversos
EULAR:	<i>European Alliance of Associations for Rheumatology</i>
EVA:	escala visual analògica
FAMM:	fàrmac antireumàtic modificador de la malaltia
FAMMb:	fàrmac antireumàtic modificador de la malaltia biològic
FAMMc:	fàrmac antireumàtic modificador de la malaltia convencional
FAMMsd:	fàrmac antireumàtic modificador de la malaltia sintètic dirigit
FR:	factor reumatoide
GWAS:	<i>Genome Wide Association Studies</i>
HLA:	<i>Human Leukocyte Antigens</i>
IFX:	infliximab
Ig:	immunoglobulina
iJAK:	inhibidor de JAK
IL:	interleucina
IL6R:	gen del receptor d'interleucina 6
IL-6R:	receptor d'interleucina-6
IMC:	índex de massa corporal
LDA:	<i>Low Disease Activity</i>
MTX:	metotrexat
NAD:	nombre articulacions doloroses
NAT:	nombre articulacions tumefactes
OR:	<i>Odds Ratio</i>
PCR:	proteïna C reactiva
rtPCR:	<i>real time Polymerase Chain Reaction</i>
RTX:	rituximab

SDAI:	<i>Simplified Disease Activity Index</i>
SNP:	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCZ:	tocilizumab
Th:	limfòcit T <i>helper</i>
TNF:	factor de necrosi tumoral
TNFR:	receptor de factor de necrosi tumoral
T2T:	<i>Treat to Target</i>
UGT1A1:	glucoronosil transferasa difosfat 1A1
VSG:	velocitat de sedimentació globular



# Índex

<b>RESUM</b>	10
<b>SUMMARY</b>	11
<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	12
<b>1.1. Artritis reumatoide</b>	13
1.1.1. Epidemiologia	13
1.1.2. Etiologia: factors genètics i ambientals	13
1.1.3. Fisiopatologia	16
1.1.3.1. Vies i cèl·lules immunitàries	16
1.1.3.2. Autoanticossos	16
1.1.4. Manifestacions clíniques	19
1.1.4.1. Fases de l'artritis reumatoide	19
1.1.4.2. Manifestacions articulars	20
1.1.4.3. Manifestacions extra articulars	21
1.1.4.4. Comorbiditats	22
1.1.5. Diagnòstic	22
1.1.6. Tractament	24
1.1.6.1. Mesures d'avaluació d'activitat	24
1.1.6.2. Estratègies de tractament	27
1.1.6.3. Recomanacions de tractament	27
1.1.6.4. Tractament no farmacològic	30
<b>1.2. Fàrmacs disponibles en artritis reumatoide</b>	31
1.2.1. Fàrmacs antireumàtics modificadors de la malaltia convencionals	31
1.2.2. Fàrmacs antireumàtics modificadors de la malaltia biològics o sintètics dirigits	31
<b>1.3. Genètica i farmacogenètica</b>	35
1.3.1. Principis generals de la genètica	35
1.3.2. Variacions genètiques	36
1.3.3. Genotipatge	37
1.3.4. Farmacogenètica	38
1.3.4.1. Farmacogenètica en artritis reumatoide	38
<b>2. HIPÒTESI</b>	42

<b>3. OBJECTIUS</b>	44
<b>4. COMPENDI DE PUBLICACIONS</b>	46
<b>4.1. Article 1</b>	47
ROLE OF IL6R GENETIC VARIANTS IN PREDICTING RESPONSE TO TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITI	
<b>4.2. Article 2</b>	58
CLINICAL VALUE OF IL6R GENE VARIANTS AS PREDICTIVE BIOMARKERS FOR TOXICITY TO TOCILIZUMAB IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS	
<b>4.3. Article 3</b>	68
IMPACT OF IL6R GENETIC VARIANTS ON TREATMENT EFFICACY AND TOXICITY RESPONSE TO SARILUMAB IN RHEUMATOID ARTHRITIS	
<b>5. RESUM GLOBAL DE RESULTATS</b>	80
<b>5.1. Característiques basals dels pacients</b>	81
<b>5.2. Associacions entre variants genètiques i variables de resposta al tractament</b>	82
<b>5.3. Associacions entre variants genètiques i aparició d'efectes adversos</b>	83
<b>6. RESUM GLOBAL DE LA DISCUSSIÓ</b>	86
<b>6.1. Associació entre variables de resposta al tractament i variants genètiques</b>	87
6.1.1. rs4845625	87
6.1.2. rs11265618 i rs4329505	89
<b>6.2. Associació entre aparició d'efectes adversos i variants genètiques</b>	91
6.2.1. Dislipèmia	91
6.2.2. Efectes adversos hematològics	92
6.2.3. Hepatotoxicitat	92
<b>6.3. Limitacions</b>	93
<b>7. CONCLUSIONS</b>	94
<b>8. LÍNIES DE FUTUR</b>	96
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	98
<b>10. ANNEXES</b>	112
<b>10.1 Annex 1</b>	113
<b>10.2 Annex 2</b>	113

# Resum

L'artritis reumatoide (AR) és una malaltia autoimmunitària prevalent que es caracteritza per l'afectació inflamatòria articular crònica que pot portar a danys articulars irreversibles i disfunció. En les últimes dècades el seu tractament i evolució han canviat dràsticament amb la irrupció de les teràpies avançades. Tot i així, encara no existeixen biomarcadors aplicats en pràctica clínica que permetin oferir una teràpia personalitzada. La farmacogenètica en l'AR és un camp prometedor explorat principalment en l'estudi de fàrmacs modificadors de la malaltia convencionals (FAMMc) o biològics (FAMMb) de la família anti-TNF, però menys estudiada en els fàrmacs antagonistes del receptor d'interleucina-6 (anti-IL-6R).

En la present tesi es planteja la hipòtesi que variacions genètiques en el gen del receptor de la interleucina-6 (*IL6R*) poden influir en la resposta al tractament o l'aparició de toxicitat en pacients amb AR tractats amb fàrmacs anti-IL-6R.

Per a provar-ho, s'han dut a terme estudis retrospectius amb cohorts de pacients tractats amb dos fàrmacs anti-IL-6R: tocilizumab (TCZ) i sarilumab. Es van analitzar sis polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNP, en anglès: *Single Nucleotide Polymorphism*) del gen *IL6R* i es van realitzar associacions estadístiques amb variables de resposta al tractament i d'aparició d'efectes adversos (EA).

Les principals troballes mostren que el SNP rs4845625 s'associa a diferències clínicament significatives en variables de resposta al tractament en la cohort de pacients tractats amb TCZ i sarilumab. Les variants genètiques rs4329505 i rs11265618 mostren associació amb canvis de resposta al tractament únicament en la cohort de sarilumab. Tot i que la majoria de SNPs estudiats (rs2228145, rs4329505, rs11265618, rs4537545 i rs4845625) mostren alguna associació amb l'aparició dels EA estudiats, aquests no es tradueixen en EA clínicament significatius.

Considerant el conjunt de troballes, el seu anàlisi i la discussió dels resultats amb la bibliografia actual, es proposa rs4845625 com un potencial biomarcador farmacogenètic per a predir la resposta al tractament amb fàrmacs anti-IL-6R en pacients amb AR.

# Summary

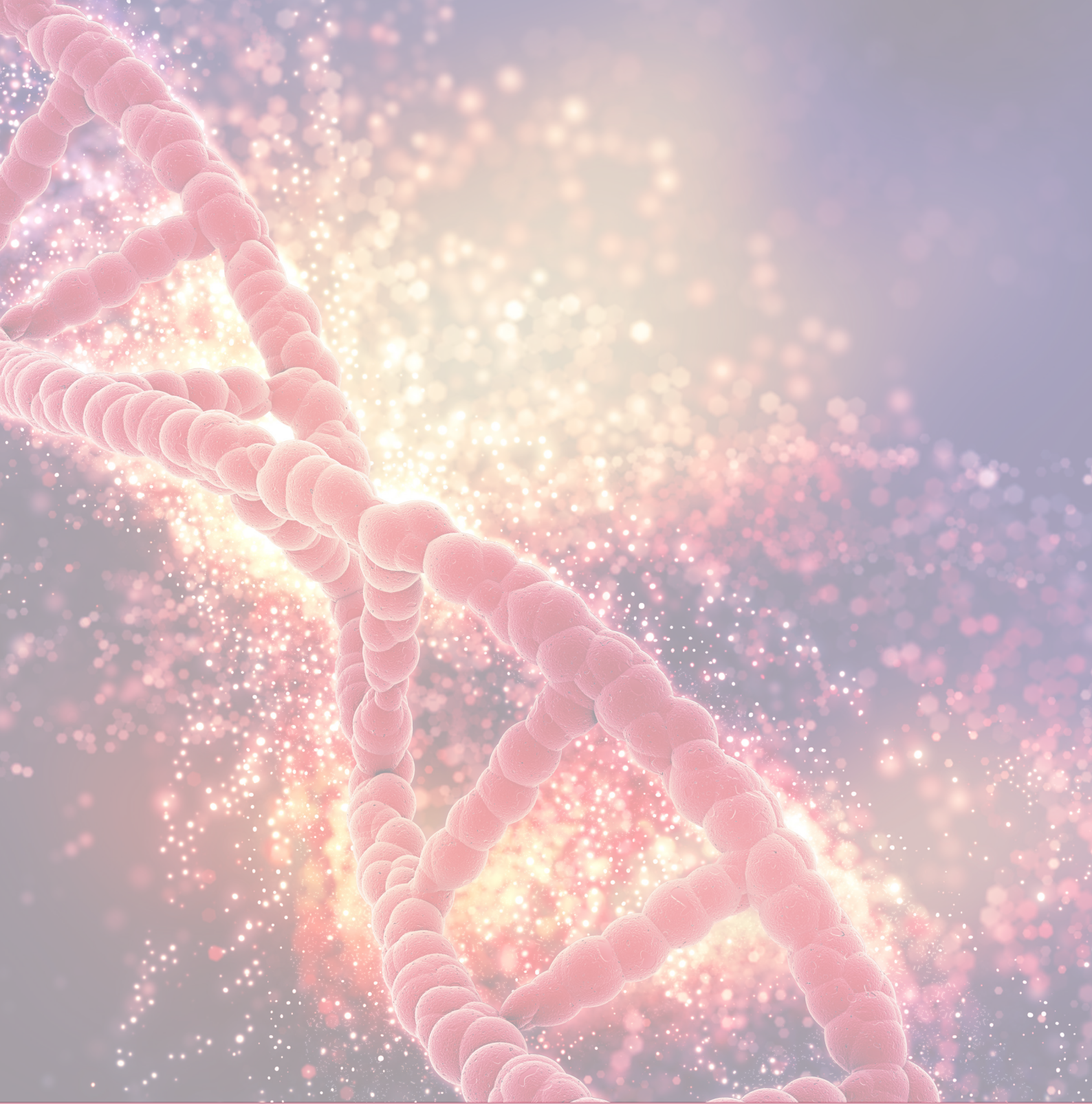
Rheumatoid arthritis (RA) is a prevalent autoimmune disease characterized by chronic inflammatory joint involvement that can lead to irreversible joint damage and dysfunction. In recent decades, its treatment and evolution have drastically changed with the emergence of advanced therapies. However, there are still no clinically useful biomarkers that allow for personalized therapy. Pharmacogenetics in RA is a promising field primarily explored in the study of conventional disease-modifying drugs (DMARDs) or biological DMARDs of the anti-TNF family but less studied in interleukin-6 inhibitors (anti-IL-6R).

This thesis proposes the hypothesis that genetic variations in the interleukin-6 receptor gene (*IL6R*) may influence treatment response or the occurrence of toxicity in RA patients treated with anti-IL-6R drugs.

To test this, retrospective studies were conducted with cohorts of patients treated with two anti-IL-6R: tocilizumab (TCZ) and sarilumab. The study of 6 single nucleotide polymorphisms (SNPs) of *IL6R* were carried out, and statistical associations with treatment response variables and adverse effects (AEs) were performed.

The main findings show that the SNP rs4845625 is associated with clinically significant differences in treatment response variables in the cohort of patients treated with TCZ and sarilumab. The genetic variants rs4329505 and rs11265618 show an association with treatment response changes only in the sarilumab cohort. Although most of the studied SNPs (rs2228145, rs4329505, rs11265618, rs4537545, and rs4845625) show some association with the occurrence of the studied AEs, these do not translate into clinically significant AEs.

Considering the set of findings, their analysis, and the discussion of the results with the current literature, rs4845625 is proposed as a potential pharmacogenetic biomarker to predict treatment response to anti-IL-6R drugs in RA patients.



# 1. Introducció



## 1.1. Artritis reumatoide

L'AR és una malaltia autoimmune inflamatòria que afecta predominantment articulacions mitjançant la inflamació de la membrana sinovial, però que és considerada una malaltia sistèmica ja que presenta importants manifestacions extra-articulars i comorbiditats associades (1,2). Clínicament, cursa com una poliartritis crònica amb especial afinitat per les articulacions diartrodials i un patró de presentació típicament simètric i additiu. La inflamació articular persistent pot portar a l'erosió i disfunció articular, mentre que la inflamació sistèmica i les comorbiditats comporten una disminució de l'esperança de vida dels pacients afectes. L'estudi de les vies inflamatòries i els seus mediadors ha estat clau per comprendre millor la fisiopatologia de la malaltia i el desenvolupament de nous fàrmacs antireumàtics modificadors de la malaltia (FAMM) que permeten estratègies terapèutiques que han suposat un millor pronòstic de l'AR en els últims 20 anys (3-9).

### 1.1.1. Epidemiologia

L'AR és la malaltia inflamatòria autoimmune més freqüent a nivell mundial, amb una prevalença mundial estimada entre el 0,2 i 1% (10). Per altra banda, la incidència, basant-se en els criteris diagnòstics del *American College of Rheumatology* (ACR), s'ha reportat en 25 casos per 100000 habitants. Cal destacar que s'ha documentat un gradient altitudinal, amb incidències majors a Nord-Amèrica (38/100000) i països del nord d'Europa (29/100000) que als del sud d'Europa (16.5/100000) (11).

A nivell nacional, l'estimació més recent de la prevalença de l'AR en adults és de 2016, amb una prevalença reportada del 0,82% (95% IC, 0.59-1.15). El pic d'incidència es troba entre els 50 i 60 anys i afecta més freqüentment a dones, amb una raó de 3:1 (12).

### 1.1.2. Etiologia: factors genètics i ambientals

L'AR és una malaltia multifactorial, d'etiologia molt complexa producte de la interacció entre una base poligènica i factors ambientals, no del tot coneguts, que poden actuar com a desencadenants d'una alteració de la resposta immunitària amb pèrdua d'auto-tolerància que acaba desembocant en l'inici de la malaltia (13).

#### Factors genètics

L'AR presenta un fort substrat genètic tal i com s'observa en els estudis amb bessons, que mostren una taxa de concordança del 15% en bessons monozigòtics i amb una heretabilitat que es situa en el 60% aproximadament (14, 15). De la mateixa manera que aquestes dades suporten el fort component genètic de la malaltia, ens indica que hi ha importants factors no genètics que determinen també l'aparició de la malaltia.

Amb estudis de *Genome Wide Association Studies* (GWAS), s'han identificat més de 100 loci genòmics relacionats amb el risc de desenvolupar AR. Entre els principals es troben els diversos al·lels de *Human Leukocyte Antigens* (HLA) classe II i varis gens no-HLA com *STAT4*, *PTPN22*, *CTLA4*, *TRAF1*, *FCRL3*, *TNFIP3*, *TNF-alfa* i *IL6R*. Tot i que moltes d'aquestes variants només tenen un petit efecte en la susceptibilitat, s'han descrit efectes additius i interaccions amb factors ambientals (16). La influència genètica més important ve determinada pels gens que es troben en la regió del HLA de classe II, en especial al locus HLA-DRB1 i els seus al·lels DR4 i DR1. Diverses d'aquestes molècules HLA-DRB1 comparteixen una seqüència d'aminoàcids comuna que s'ha associat al risc de desenvolupar AR i s'anomena "epítot compartit". La presència d'aquests gens s'associen amb la susceptibilitat a desenvolupar AR així com amb la seva severitat. També s'ha postulat que podrien ser el factor de risc principal per al desenvolupament d'anticossos contra les proteïnes citrul·linades (ACPA), cabdals en la patogènia de l'AR (17–20).

### Factors ambientals

Entre els factors ambientals, el tabaquisme és el millor caracteritzat, ja que s'ha associat a la citrul·linació de proteïnes en el pulmó i al desenvolupament d'ACPA. En individus amb susceptibilitat genètica (portadors de l'epítot compartit), el tabaquisme pot arribar a suposar 20 vegades més risc de desenvolupar la malaltia (21). Múltiples estudis han corroborat la relació epidemiològica entre el tabaquisme i el desenvolupament d'AR (22–25), en major mesura en homes, però també present en dones. Tot i que alguns estudis han mostrat relació amb la magnitud de l'hàbit tabàquic (26), també s'ha observat un augment del risc d'AR amb menor exposició al tabac (27).

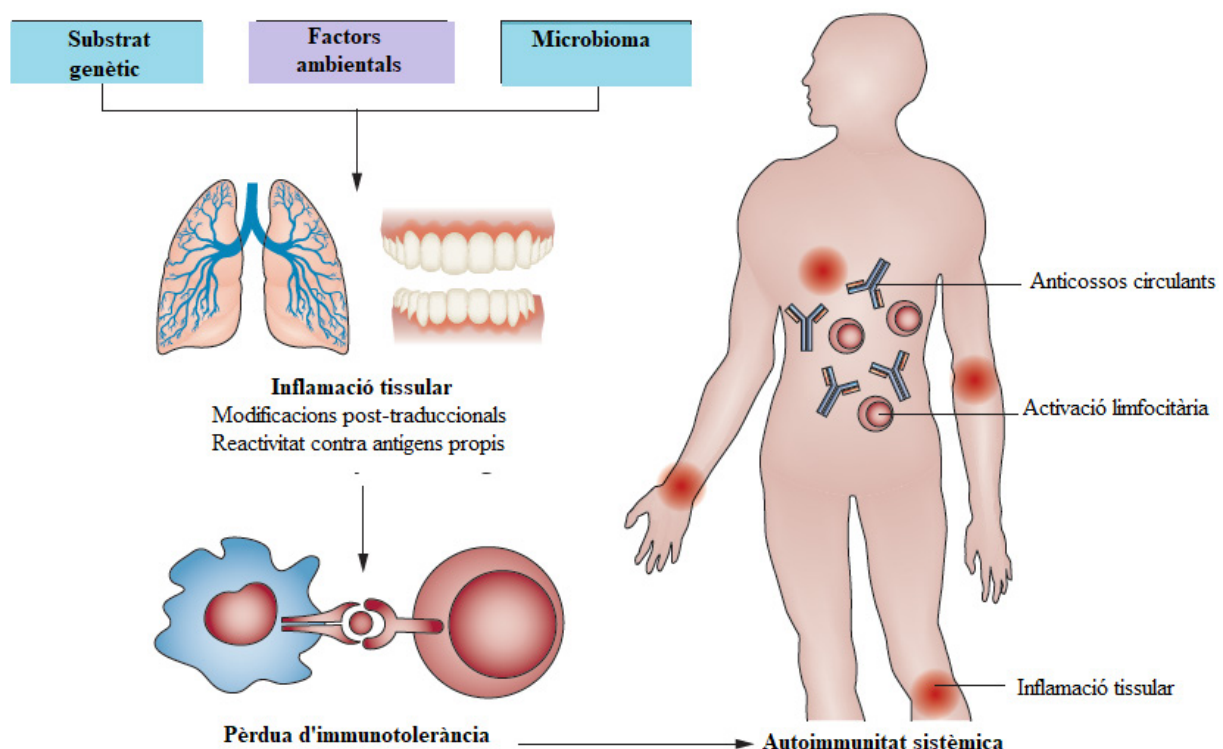
Els factors hormonals es poden considerar com un factor de susceptibilitat pel desenvolupament d'AR degut a una major prevalença en dones, especialment durant l'etapa fèrtil, i a la milloria de l'activitat de la malaltia durant la gestació (28). S'ha observat que el risc d'aparició d'AR es redueix durant l'embaràs (29) però s'incrementa en el post-part (30, 31). En la mateixa línia, les dones que fan lactància materna tenen un menor risc a desenvolupar AR i, fins i tot, s'ha observat una relació entre la durada de lactància i la "protecció" vers el desenvolupament d'AR (32). Mentrestant altres estudis indiquen que la lactància materna es podria associar a un major risc de debut en el post-part (33). En estudis de cohorts més recents també s'ha observat una menor gravetat de l'AR en pacients nul·líparas (32). Actualment el paper concret dels factors hormonals en l'AR preclínica no es del tot conegut, però el conjunt de dades indiquen que hi ha un rol important de les hormones sexuals femenines associat al desenvolupament de l'AR (34).

S'ha intentat relacionar la infecció per diversos agents infecciosos en la patogènia de l'AR com a activadors de la immunitat en pacients amb predisposició genètica prèvia o altres factors de risc associats. Tot i que s'han intentat relacionar múltiples agents infecciosos com els virus, són

les infeccions bacterianes les que han estat més recentment estudiades com a possibles factors etiopatogènics. Entre elles, les disbiosis en la microbiota intestinal, però sobretot destaquen els estudis amb infeccions tipus periodontitis per *Porphyromonas gingivalis*, que també s'ha relacionat amb la formació d'ACPA, donant major base etiopatogènica a aquesta hipòtesi (35-37). Tot i la variabilitat en les troballes d'estudis epidemiològics previs, en un meta-anàlisi recent s'ha observat que la infecció per *Porphyromonas gingivalis* es comporta com un factor de risc per AR amb un *Odds Ratio* (OR) de 1.86 (95% IC: 1.43-2.43) (38).

Destaca que la majoria de factors ambientals estudiats impliquen que l'origen de la malaltia no es troba en la sinovial sinó en diverses mucoses corporals, on es produeixen les alteracions immunològiques inicials que acaben comportant el desenvolupament d'autoanticossos en la fase preclínica de la malaltia (39).

Considerant el prèviament exposat, es podria concloure que l'etiologia de l'AR ve determinada per factors ambientals que actuen com desencadenants de respostes autoimmunitàries en individus genèticament predisposats (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema bàsic de la fisiopatologia en l'AR. La inflamació tissular induïda per la combinació d'un substrat genètic i factors ambientals pot portar a canvis post-traduccionals com la citrul·linació o carbamil·lació. La generació d'autoanticossos pot acabar comportant la pèrdua d'immunotolerància i el desenvolupament de l'AR. Adaptació de Klareskog L et al. (40)



## 1.1.3. Fisiopatologia

### 1.1.3.1. Vies i cèl·lules immunitàries

La patogènia de l'AR implica una intricada interacció entre les cèl·lules de la immunitat innata i adaptativa. Un dels fenòmens inicial és la captació de neoantígens o antígens propis per part de les cèl·lules presentadores d'antígens que les presenten als limfòcits T CD4+ en els nòduls limfàtics. Aquests limfòcits T *naive* es diferencien llavors en limfòcits T efectors o *helper* (Th) que produeixen diferents citocines i activen als limfòcits B que produeixen autoanticossos. Aquests autoanticossos formen immunocomplexes que es depositen en les articulacions i activen el complement, i junt amb l'estimulació i producció de citocines dels limfòcits Th, promouen el reclutament de cèl·lules efectores de la resposta innata com macròfags i neutròfils. Les cèl·lules efectores de la resposta innata també secreten interleucines (IL) pro inflamatòries i quimiocines que activen l'osteoclastogènesi responsable de l'erosió articular.

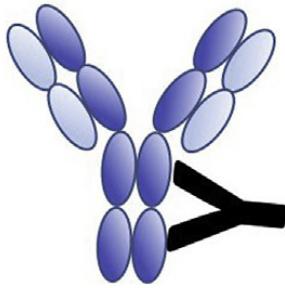
Les interaccions entre les diferents poblacions cel·lulars es perpetuen mitjançant la producció de diferents citocines, que formen bucles de retroalimentació positiva. Entre les citocines principalment implicades es troben: factor de necrosi tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 i IL-6.

El TNF- $\alpha$  està implicat en l'augment de la proliferació de limfòcits Th, limfòcits B, macròfags i proliferació de cèl·lules sinovials, activació de l'osteoclastogènesi i en el manteniment de la inflamació, interferint en els mecanismes dels limfòcits T reguladors. Respecte el paper d'IL-1, és clau en la inflamació i la destrucció articular, promovent l'activació de cèl·lules efectores com macròfags i osteoclasts. La IL-6 té un important paper pro inflamatori a nivell sistèmic i local, activant leucòcits en la sinovial i contribuint en la maduració osteoclàstica, així com contribuint en la inducció i manteniment de la resposta autoimmunitària a través de la maduració de limfòcits B i la diferenciació a limfòcits Th17 (20, 41, 42).

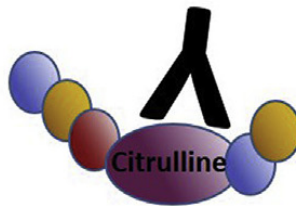
### 1.1.3.2. Autoanticossos

Els autoanticossos tenen una important rellevància en la fisiopatogènia i són claus per al diagnòstic i pronòstic de la malaltia establerta, així com en els estadis preclínics de l'AR.

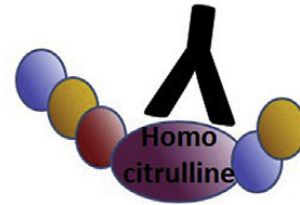
## FACTOR REUMATOIDE



## ACPA



## ANTI-CARBAMILAT



**Figura 2.**

*Autoanticossos més freqüents en AR. El factor reumatoide és una immunoglobulina que es dirigeix contra la fracció constant de les IgG. Els ACPA i anti-carbamilat són immunoglobulines que tenen com a diana els pèptids citrul·lina i homocitrul·lina. Adaptat de Van Delft M et al.(43)*

### Factor reumatoide

El factor reumatoide (FR) consisteix en anticossos, generalment immunoglobulines M (IgM), dirigits contra la fracció constant de la immunoglobulina G (IgG) humana i es pot detectar entre el 60 i 80% dels pacients amb AR. Actua formant complexos immunològics que activen el complement en l'articulació, augmentant la permeabilitat vascular i exercint un efecte quimiotàctic que recluta cèl·lules del sistema immunitari efectores (44).

Tot i que forma part dels criteris classificatoris de 1987 i també d'ACR/EULAR 2010 (11, 45), el FR no és un autoanticòs específic i no es considera suficient per al desenvolupament de malaltia. Es pot detectar en altres malalties reumàtiques, trastorns inflamatoris crònics, infeccions i fins i tot en població sana, descrivint-se fins en un 15% de població general, sobretot en població anciana (46). Tot i que la seva especificitat és menor que els ACPA, si s'eleva el punt de tall a 50 unitats internacionals s'aconsegueix un bon rendiment del test amb valor predictiu positiu en AR d'inici major al 90% (47, 48). És per aquest motiu que en els criteris d'ACR/EULAR 2010 es considera puntuació addicional si es troben títols elevats de FR.

A la pràctica clínica s'utilitza per al diagnòstic i també per a valorar el pronòstic de l'AR ja que s'ha relacionat amb malaltia més activa i major afectació radiogràfica amb desenvolupament d'erosions (49, 50).

### Anticossos contra les proteïnes citrul·linades

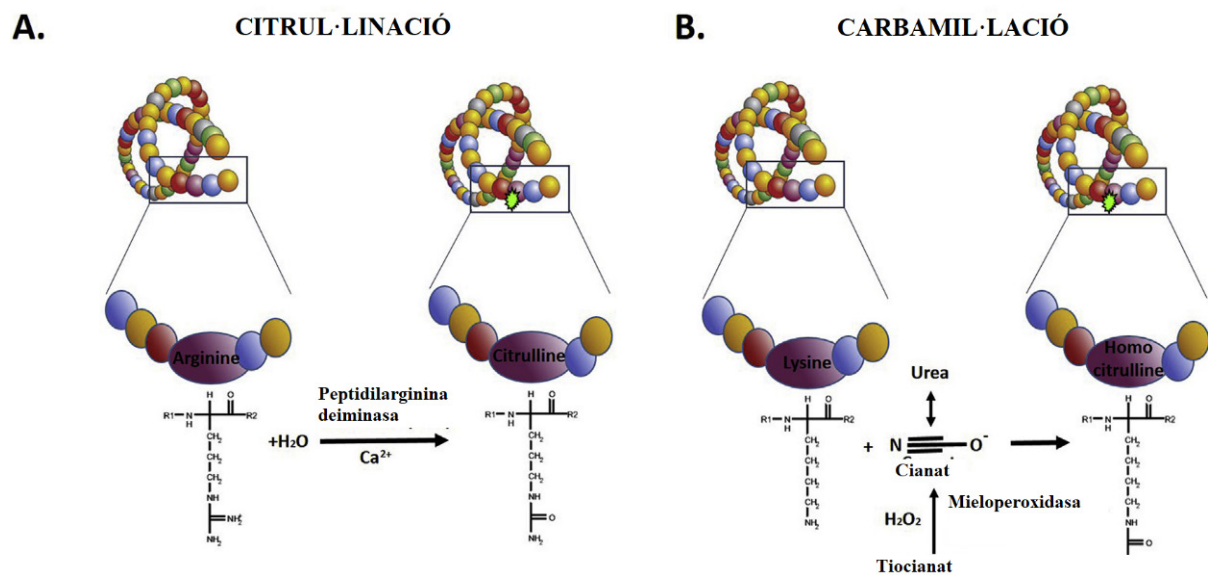
Els factors ambientals associats a una susceptibilitat genètica adequada pot conduir a la modificació post-traducciona de diferents proteïnes, com en el procés de citrul·linació (20). La citrul·linació es caracteritza per la conversió d'un residu arginina a citrul·lina per l'enzim peptidilarginina deiminasa. Es tracta d'un procés fisiològic, que es creu important en el procés de degradació intracel·lular de proteïnes durant l'apoptosi.

La detecció d'anticossos contra diversos pèptids citrul·linats va portar al desenvolupament de nous tests que utilitzen pèptids cíclics citrul·linats com antígens i permeten la detecció d'ACPA. Es troben en el 60-70% dels pacients amb AR i presenten una alta especificitat (51). Es poden trobar des d'anys previs a l'inici de la malaltia clínica (52), la seva presència prediu la progressió des d'una artritis indiferenciada a AR establerta (53) i també s'han associat a un pronòstic més sever de la malaltia (54).

### Anticossos anti-carbamilat

Tot i l'alta prevalença de positivitat per FR i ACPA en l'AR, encara existeix un 20-30% de pacients que són negatius per ambdós. Altres anticossos han estat descrits que poden explicar part d'aquesta "seronegativitat". Els més estudiats són els anticossos anti-carbamilat.

La carbamil·lació és un altre procés de modificació post-traducciona que s'ha descrit en excés associat a inflamació, tabac i urèmia (55). Han estat reportats fins en el 40% dels pacients amb AR, generalment sobreposats a la positivitat per ACPA, tot i que fins a un 20-30% dels pacients negatius per FR i ACPA, són positius per anti-carbamilat. Aquest fet, permet reduir l'espectre de "verdaders seronegatius". Per altra banda, a nivell pronòstic, es comporten similarment als ACPA (56-58).



**Figura 3.** Modificacions post-traduccionals associades a la generació d'anticossos en AR. (A) La citrul·linació és la conversió d'arginina en citrul·lina per una reacció enzimàtica mediada per peptidilarginina deiminasa. Aquest enzim és alliberat per neutròfils o per bacteries com *Porphyromonas gingivalis*. (B) La carbamil·lació és la conversió de lisina a homocitrulina per una reacció química amb cianat. El cianat pot veure's augmentat en diverses condicions com la malaltia renal crònica i l'hàbit tabàquic. Adaptat de Van Delft M et al. (43)

### 1.1.3.3. Anatomia patològica

La membrana sinovial de les articulacions està formada fisiològicament per teixit connectiu constituït per adipòcits, fibroblasts i capil·lars aïllats. Esporàdicament s'hi poden trobar infiltrats algun macròfag o limfòcits, però el seu nombre és molt baix. La cara interna de la membrana sinovial, la que contacta amb la cavitat, està formada per una petita capa avascular de cèl·lules anomenades sinoviòcits. Aquests es poden classificar sinoviòcits de tipus A, amb característiques semblants als macròfags, i de tipus B, amb característiques semblants als fibroblasts (59).

En pacients amb AR, el teixit sinovial té una estructura i característiques molt diferents a la del teixit sa. Destaca l'edema i la proliferació del teixit sinovial que forma nombrosos plects i vellositats produïts per la hiperplàsia dels sinoviòcits, l'angiogènesi i la migració de cèl·lules inflamatòries a la membrana sinovial (60). La infiltració local és deguda principalment als limfòcits T CD4+ (fins al 50% de les cèl·lules presents), limfòcits B i macròfags, produint el *pannus* sinovial i l'activació local de fibroblasts i osteoclasts, que acaben desencadenant l'erosió articular via activació de RANKL (20, 61).

Les característiques de la membrana sinovial poden modificar-se segons el temps d'evolució de la malaltia ja que, inicialment, predomina l'edema intersticial i l'angiogènesi amb una infiltració leucocitària i hiperplàsia sinovial menys marcades. Al llarg del temps, augmenta la hiperplàsia de sinoviòcits, podent estar formada per fins a més de 10 capes, així com també augmenta l'infiltrat de cèl·lules inflamatòries.

## 1.1.4. Manifestacions clíniques

### 1.1.4.1. Fases de l'artritis reumatoide

El desenvolupament de l'AR no té lloc de forma aguda sinó que forma part d'un continu que inclou des de la presència de factors de risc de malaltia, fins al desenvolupament d'anticossos, els primers símptomes i la malaltia establerta.

El 2012, es va proposar una nomenclatura per part de la *European Alliance of Associations for Rheumatology* (EULAR) que definia sis fases en el desenvolupament de la malaltia (62):

- Fase A: l'individu és portador de factors genètics associats amb el desenvolupament d'AR.
- Fase B: l'individu s'exposa a factors de risc ambientals associats amb l'AR.
- Fase C: es detecta autoimmunitat sistèmica en sèrum de l'individu.
- Fase D: apareixen símptomes però no es detecta artritis. A partir d'aquesta fase, ens trobem en la fase clínica.
- Fase E: es detecta artritis, però no es pot realitzar el diagnòstic d'AR.
- Fase F: es pot arribar al diagnòstic d'AR. Es tracta d'una malaltia establerta.

#### 1.1.4.2. Manifestacions articulars

La presentació clínica típica a nivell articular es caracteritza pel dolor inflamatori associat a rigidesa matutina i tumefacció articular. El patró d'afectació és additiu, bilateral, simètric i erosiu, amb compromís principal de les petites articulacions en mans i peus, respectant les articulacions interfalàngiques distals i les articulacions no sinovials com en l'esquelet axial. Es tracta d'una malaltia amb inflamació crònica, però que cursa típicament en forma de brots. En la majoria de casos, també es veuen afectades les articulacions carpianes i no és infreqüent l'afectació tendinosa en les mans amb afectació dels tendons flexors o extensors dels dits. També es veuen afectades amb freqüència les articulacions grans com els genolls, colzes, espatlles i malucs. Per la seva importància, cal esmentar la potencial afectació en l'articulació temporomandibular i, en el cas de la columna, es pot danyar l'articulació de la primera i segona vèrtebra cervical (C1-C2) ja que compta amb sinovial. La seva afectació es pot complicar severament produint una luxació atloaxoidea.



**Figura 4.**

*Imatges de radiografia simple de carps que mostra l'evolució erosiva de l'AR. Imatge extreta del Fondo de Imágenes de la Sociedad Española de Reumatología aportada pel Dr Naranjo de l'Hospital Universitari de Gran Canaria Dr Negrin.*

A l'inici de la malaltia, en la fase D, ens podem trobar amb simptomatologia inflamatòria sense arribar a desenvolupar artritis pel que EULAR va definir l'any 2017 unes característiques clíniques per identificar una artràlgia "sospitosa" de poder evolucionar a AR (**Taula 1**) (63). En la fase E de la malaltia, també anomenada artritis precoç o artritis indiferenciada, ja s'ha produït inflamació articular però aquesta encara no presenta les característiques suficients que permeten arribar al diagnòstic d'AR. Tot i així, poder iniciar un tractament durant aquesta finestra d'oportunitat, permetrà aconseguir millors taxes de resposta i de menor afectació articular i funcional a llarg termini (64, 65).

### Taula 1.

Característiques definides per EULAR per descriure l'artràlgia amb alt risc d'AR. Cal considerar que es produeix una artràlgia sense artritis clínica i absència d'altres diagnòstics o causes que ens expliquin la simptomatologia.

#### Artràlgia amb risc de desenvolupar artritis reumatoide

##### Història clínica

- Síntomes articulars de recent inici (<1 any)
- Síntomes localitzats en articulacions metacarpofalàngiques
- Duració de la rigidesa matutina > 60 minuts
- Síntomes més severa a primera hora del matí
- Antecedent de familiar de primer grau

##### Exploració física

- Dificultat per tancar el puny
- Prova de compressió positiva en articulacions metacarpofalàngiques

En fases avançades de la malaltia, per altra banda, ens podem trobar amb un dany articular avançat amb erosions i deformitats típiques com la ràfega cubital, la deformitat en *boutonniere*, la deformitat en coll de cigne o el polze en Z.

#### 1.1.4.3. Manifestacions extra articulars

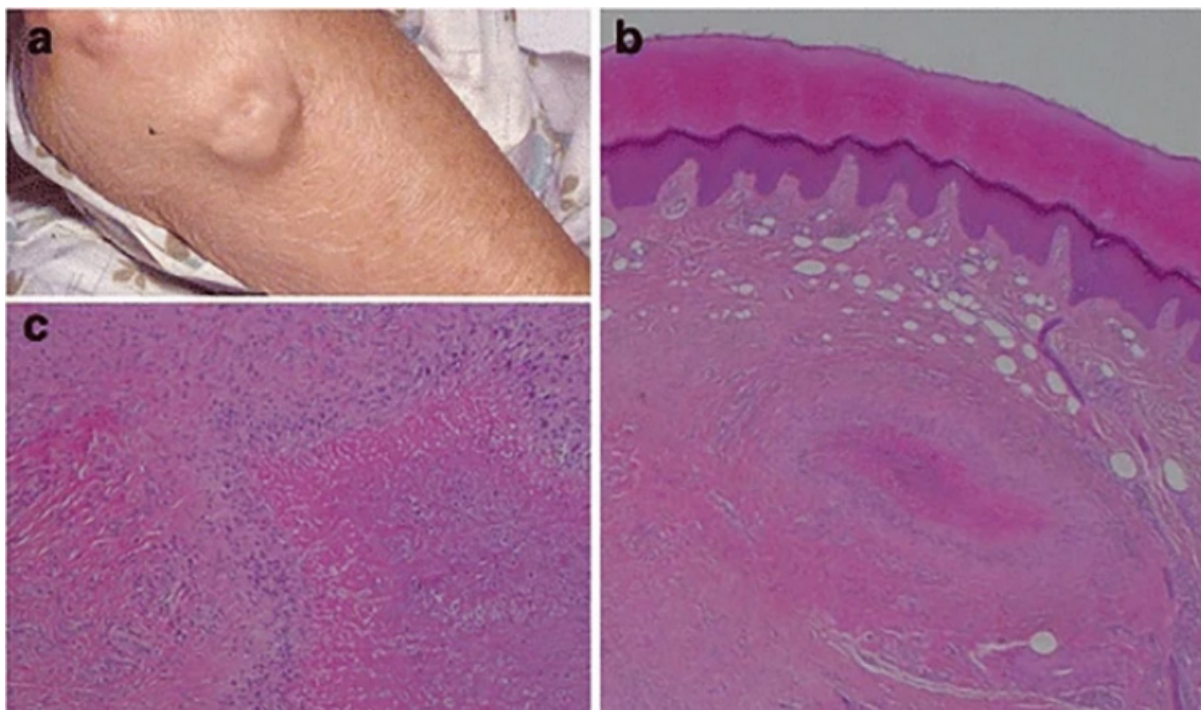
Fins a un 40% dels pacients presenten manifestacions extra articulars. Aquestes són generalment més freqüents en pacients que presenten seropositivitat per FR o ACPA i suposen, en molts casos, un empitjorament pronòstic i d'augment de mortalitat. Les principals manifestacions extra articulars es descriuen en la Taula 2 (66).

### Taula 2.

Principals manifestacions extra articulars de l'AR.

Cutànies	Nòduls reumatoides Vasculitis cutània
Pulmonars	Pleuritis o vessament pleural Nòduls reumatoides (Síndrome de Caplan) Malaltia pulmonar intersticial difusa: Pneumònia intersticial usual més freqüent que la pneumònia intersticial no específica
Afectacions oculars	Queratoconjuntivitis seca (Síndrome de Sjögren secundari) Epiescleritis i escleritis. Queratitis ulcerativa perifèrica
Cardiovasculars	Pericarditis
Hematològiques	Anèmia i trombocitosi per inflamació Síndrome de Felty (neutropènia + esplenomegàlia +/- trombocitopènia)
Altres	Fatiga Amiloïdosis secundària





**Figura 5.**

*Nòduls reumatoides (a) Nòduls reumatoides en zona extensora del colze. (b) (c) Histologia dels nòduls reumatoides: una àrea central necròtica, una zona intermitja amb macròfags en pallissada i una zona circumdant amb teixit de granulació perivascular amb infiltrat de cèl·lules inflamatòries. Imatge extreta de l'article de Chua-Aguilera C et al. (67)*

#### 1.1.4.4. Comorbiditats

Les comorbiditats més freqüents de l'AR, així com les principals causes de mortalitat, són les cardiovasculars, les infeccions i les neoplàsies. Els pacients amb AR de llarga evolució presenten amb major freqüència arterioesclerosi i tenen un major risc de malaltia coronària, fins i tot quan els factors de risc cardiovasculars clàssics es controlen. Per aquest motiu, es considera l'AR com un factor de risc independent de malaltia cardiovascular i cal tenir-lo en compte al avaluar el risc cardiovascular dels pacients.

El risc d'infecció es considera el doble respecte la població sense AR i encara s'incrementa més quan considerem l'ús de corticoides o FAMM. Respecte el càncer, aquest es veu lleugerament augmentat, especialment en el cas del limfoma Hodgkin i no Hodgkin. L'osteoporosi és una altra comorbiditat molt freqüent, ja que a part dels factors de risc habituals, cal sumar-hi l'efecte deleteri en la massa òssia de la inflamació i de l'ús crònic de glucocorticoides.

#### 1.1.5. Diagnòstic

El diagnòstic de l'AR es fonamentalment clínic i es basa en la impressió clínica, recolzada per proves analítiques i d'imatge. Per això, a partir d'una simptomatologia suggestiva, es realitzarà un estudi analític amb reactants de fase aguda i autoanticossos i proves d'imatge amb radiografies de mans i peus per a la detecció d'erosions. Les radiografies simples poden proporcionar dades

per recolzar el diagnòstic (sobretot si presenten alteracions en localitzacions típiques com en la cinquena metatarsfalàngica o estiloides cubital) o per ponderar el risc de malaltia de pitjor pronòstic. En l'avaluació per imatge, tant la ressonància magnètica com l'ecografia poden aportar una major sensibilitat que les radiografies convencionals. L'ecografia, per la seva accessibilitat, pot ser utilitzada com un complement a l'exploració física per detectar sinovitis, ajudant així al diagnòstic i a l'avaluació de l'activitat durant el seguiment dels pacients (64, 68).

Tot i que l'ecografia està present en el maneig habitual dels pacients amb AR en el nostre medi, no es troba recollit el seu ús en les guies EULAR de tractament (69). Per altra banda, sí es cita en les guies d'AR difícil de tractar, ressaltant la seva utilitat en discernir la presència d'activitat inflamatòria en casos complexos (70). En els últims anys s'han realitzat múltiples estudis que avaluen la incorporació de l'ecografia en la valoració habitual dels objectius de tractament, completant l'abordatge clàssic clínic i analític (71-73). En un assaig clínic recent, es va demostrar que incloure l'ecografia en la valoració de la remissió estava associat a un major control de la malaltia, reducció de rebrots així com major probabilitat de reducció del tractament (74). L'ecografia té un impacte important en les decisions terapèutiques, influint en l'escalada o reducció de tractaments, sent més determinant en aquells casos d'activitat inflamatòria baixa o moderada (75).

Per tal d'homogeneïtzar el diagnòstic i especialment orientat per a projectes d'investigació, les organitzacions internacionals han desenvolupat criteris classificatoris d'AR. Els actualment vigents són els criteris EULAR/ACR de 2010 (45), que van aportar una major sensibilitat als criteris previs de 1987 d'ACR (76), fent èmfasi en la importància de la detecció precoç d'aquells pacients amb sinovitis indiferenciada amb major risc de presentar malaltia persistent. S'exposa la comparativa de les característiques principals d'ambdós criteris de forma simplificada en la Taula 3.



### Taula 3.

Comparativa entre criteris classificatoris d'artritis reumatoide

Criteris ACR 1987	Criteris ACR/EULAR 2010
<ol style="list-style-type: none"><li>1. Rigidesa matutina <math>\geq 1</math> hora</li><li>2. Artritis de <math>\geq 3</math> articulacions</li><li>3. Artritis en mans (<math>\geq 1</math> tumefacta)</li><li>4. Artritis simètrica</li><li>5. Nòduls reumatoides</li><li>6. Factor reumatoide positiu</li><li>7. Canvis radiològics (erosions o descalcificacions òssies en l'articulació afecta)</li></ol>	<ol style="list-style-type: none"><li>1. Afectació articular (0-5)<ol style="list-style-type: none"><li>a) 1 articulació gran (0)</li><li>b) 2-10 articulacions grans (1)</li><li>c) 1-3 articulacions petites (2)</li><li>d) 4-10 articulacions petites (3)</li><li>e) <math>\geq 10</math> articulacions (almenys 1 petita) (5)</li></ol></li><li>2. Serologia (0-3)<ol style="list-style-type: none"><li>a) FR i ACPA negatius (0)</li><li>b) FR i/o ACPA positius a títols baixos (<math>&lt;3</math>VN) (2)</li><li>c) FR i/o ACPA positius a títols alts (<math>&gt;3</math>VN) (3)</li></ol></li><li>3. Reactants de fase aguda (0-1)<ol style="list-style-type: none"><li>a) PCR i VSG normals (0)</li><li>b) PCR o VSG elevades (1)</li></ol></li><li>4. Duració simptomatologia (0-1)<ol style="list-style-type: none"><li>a) Menys de 6 setmanes (0)</li><li>b) Igual o més de 6 setmanes (1)</li></ol></li></ol>
Cal tenir en compte que els criteris 1 a 4 han d'estar present com a mínim 6 setmanes.	Criteris d'entrada: $\geq 1$ articulació tumefacta i que la sinovitis no s'expliqui per una altra malaltia.
Es necessari $\geq 4/7$ per complir criteris	Es necessari $\geq 6/10$ per complir criteris

## 1.1.6. Tractament

El tractament de l'AR ha canviat considerablement en les últimes dècades, en part per l'aparició de teràpies avançades, però també per l'adopció de noves estratègies terapèutiques. En conjunt, han permès una important milloria en el control de la malaltia en els pacients amb AR.

Cal tenir en compte la gran heterogeneïtat de la malaltia en la seva presentació i evolució, així com les diferències en pacients i comorbiditats associades, pel que aplicar una única estratègia de tractament de la malaltia no és adequat i cal individualització.

Un altre concepte fonamental en l'abordatge terapèutic actual és l'apoderament del pacient en la seva patologia. El pacient ha d'estar informat de les diferents opcions de tractament amb els seus possibles beneficis i riscos associats. Per tant, allunyant-se de la medicina paternalista, el tractament ha de ser guiat per decisions terapèutiques compartides entre pacient i reumatòleg.

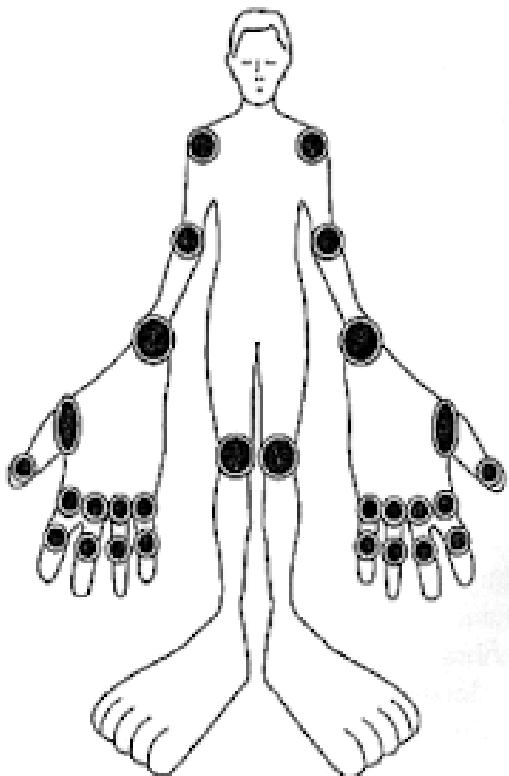
### 1.1.6.1. Mesures d'avaluació d'activitat

Per tal de poder avaluar l'estat d'activitat de la malaltia i poder aplicar els principis de l'estratègia de tractament *treat to target* (T2T), es necessària una avaluació periòdica i estandarditzada dels nivells d'activitat de la malaltia. Idealment, aquesta avaluació s'ha de realitzar amb índexs compostos validats que han de valorar, com a mínim, els recomptes d'articulacions doloroses

i tumefactes, els reactants de fase aguda analítics i les valoracions del pacient, del metge o ambdues.

Els índexs d'activitat més utilitzats en pràctica clínica i recomanats en les guies terapèutiques són el *Disease Activity Score 28* (DAS28), el *Clinical Disease Activity Index* (CDAI) i el *Simplified Disease Activity Index* (SDAI) (69, 77-79):

- DAS28: conté el comptatge d'articulacions doloroses (NAD) i inflamades (NAT) de 28 articulacions avaluades, la valoració global del pacient (mesurada per escala visual analògica (EVA) 0-100), EVAg) i un marcador d'inflamació analític. Típicament la velocitat de sedimentació globular (VSG), però hi ha una variant amb la proteïna C reactiva (PCR), el DAS28-PCR.
  - $DAS28 = 0,56 \times NAD28 + 0,28 \times NAT28 + 0,7 \times \ln(VSG) + 0,014 \times EVAg$
- SDAI: indicador amb una fórmula de càlcul senzilla ja que és una suma aritmètica del nombre d'articulacions doloroses i inflamades (també respecte 28), la valoració de l'activitat mesurada pel pacient i pel metge (mesurats amb EVA de 0 a 10, EVAg i EVAm) i la PCR en mg/dL.
  - $SDAI = NAD28 + NAT28 + EVAg + EVAm + PCR$
- CDAI: es tracta d'una simplificació del SDAI en que simplement no s'afegeix el valor de la PCR. Al no tenir en compte reactants de fase aguda, pot ser útil en pràctica clínica i amb l'ús de fàrmacs que alteren els reactants.
  - $CDAI = NAD28 + NAT28 + EVAg + EVAm$



**Figura 6.** Homuncle on es mostren les articulacions avaluades en l'índex d'activitat DAS28. No es tenen en compte en aquest comptatge les articulacions de membres inferiors, a excepció dels genolls.

Cadascun d'aquests marcadors permeten categoritzar en graus d'activitat al pacient tal i com s'exposa en la Taula 4.

També existeixen uns criteris ACR de remissió clínica en que cal complir 5 de 6 criteris al llarg de 2 mesos amb bona sensibilitat (72-80%) i especificitat (96-100%) (80, 81). Els criteris són els següents: rigidesa matutina absent o no superior a 15 minuts, absència de cansament, absència de dolor articular en l'anamnesi, absència de dolor articular a la pressió, absència de tumefacció sinovial i tenosinovial i VSG. Algunes de les crítiques a aquests criteris apunten a que són principalment dicotòmics, l'absència d'especificacions de com medir-los i que la fatiga i la rigidesa matutina no formen part dels paràmetres recomanats per avaluar els pacients (77, 82-84). A la pràctica clínica s'avalua principalment els graus d'activitat de malaltia segons els índexs compostos esmentats prèviament.

A més, existeixen uns criteris de resposta al tractament d'EULAR que tenen en compte la disminució absoluta de DAS28 i el valor de DAS28 en el moment de l'avaluació de resposta al tractament, generalment als 6 mesos. Amb aquests criteris, es considera una resposta EULAR satisfactòria si s'aconsegueix una milloria major a 1.2 en DAS28 quan l'actual DAS28 es troba per sota de 3.2, és a dir, en valors de baixa activitat de malaltia (LDA, en anglès: *Low Disease Activity*) (85, 86).

Cal també esmentar que en els assajos clínics que porten a l'aprovació dels nous fàrmacs s'utilitzen criteris de resposta o milloria al tractament establerts per l'ACR: ACR20, ACR50 i ACR70. Per a complir-los cal presentar una millora major al 20, 50 o 70% respectivament en el comptatge de NAD i NAT i també en la milloria en tres de les següents categories: avaluació del dolor pel pacient, avaluació global de la malaltia per part del pacient, avaluació global de la malaltia per part del metge, autoavaluació de l'incapacitat pel pacient i en reactants de fase aguda.

**Taula 4.**  
Índexs d'activitat i graus d'activitat.

Índex d'activitat	Categoria	Rang
<b>DAS28</b>	Activitat alta	≥5.1
	Activitat moderada	3.2-5.1
	Activitat baixa	2.6-3.2
	Remissió	<2.6
<b>SDAI</b>	Activitat alta	≥26
	Activitat moderada	11-26
	Activitat baixa	3.3-11
	Remissió	<3.3
<b>CDAI</b>	Activitat alta	≥22
	Activitat moderada	>10-22
	Activitat baixa	2.8-10
	Remissió	<2.8

### 1.1.6.2. Estratègies de tractament

El tractament actual es basa en el principi T2T que té com a objectiu principal aconseguir la remissió o baixa activitat de la malaltia. Aquesta estratègia terapèutica ha demostrat per si mateixa eficàcia en el tractament de l'AR (87) i implica un control estret del pacient amb mesura de marcadors d'activitat per tal d'avaluar si es compleixen els objectius terapèutics establerts. En cas de no aconseguir-se, cal ajustar el tractament en conseqüència, fet que implica en moltes ocasions canviar de FAMM. Generalment, l'objectiu terapèutic que s'utilitza per considerar una bona resposta és la consecució de valors de LDA o remissió (3).

En els últims anys, i en la mateixa línia que el T2T, s'han desenvolupat el concepte d'artritis precoç i uns criteris classificatoris més amplis, amb la idea d'identificar els pacients en estadis menys evolucionats i poder iniciar tractaments precoçment en la que és coneguda com la "finestra d'oportunitat". L'evidència actual recolza el principi que el tractament precoç aconsegueix millors respostes de tractament, evitant el dany articular i la conseqüent disfunció física.

### 1.1.6.3. Recomanacions de tractament

Actualment disposem de recomanacions i guies de tractament per l'AR a nivell nacional (Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Española de Reumatología) i a nivell europeu (Guies EULAR), amb les quals s'intenta estandarditzar el tractament de pacients amb AR basades en l'evidència actual. En la taula 5 i 6 s'esmenten els principis general i les principals recomanacions de tractament de les últimes guies EULAR publicades el 2023, amb un addenda sobre la valoració del risc al prescriure un inhibidor de JAK (iJAK) que es detalla en el peu de taula (69).

**Taula 5.***Principis generals de les recomanacions del maneig de l'artritis reumatoide d'EULAR 2022.*

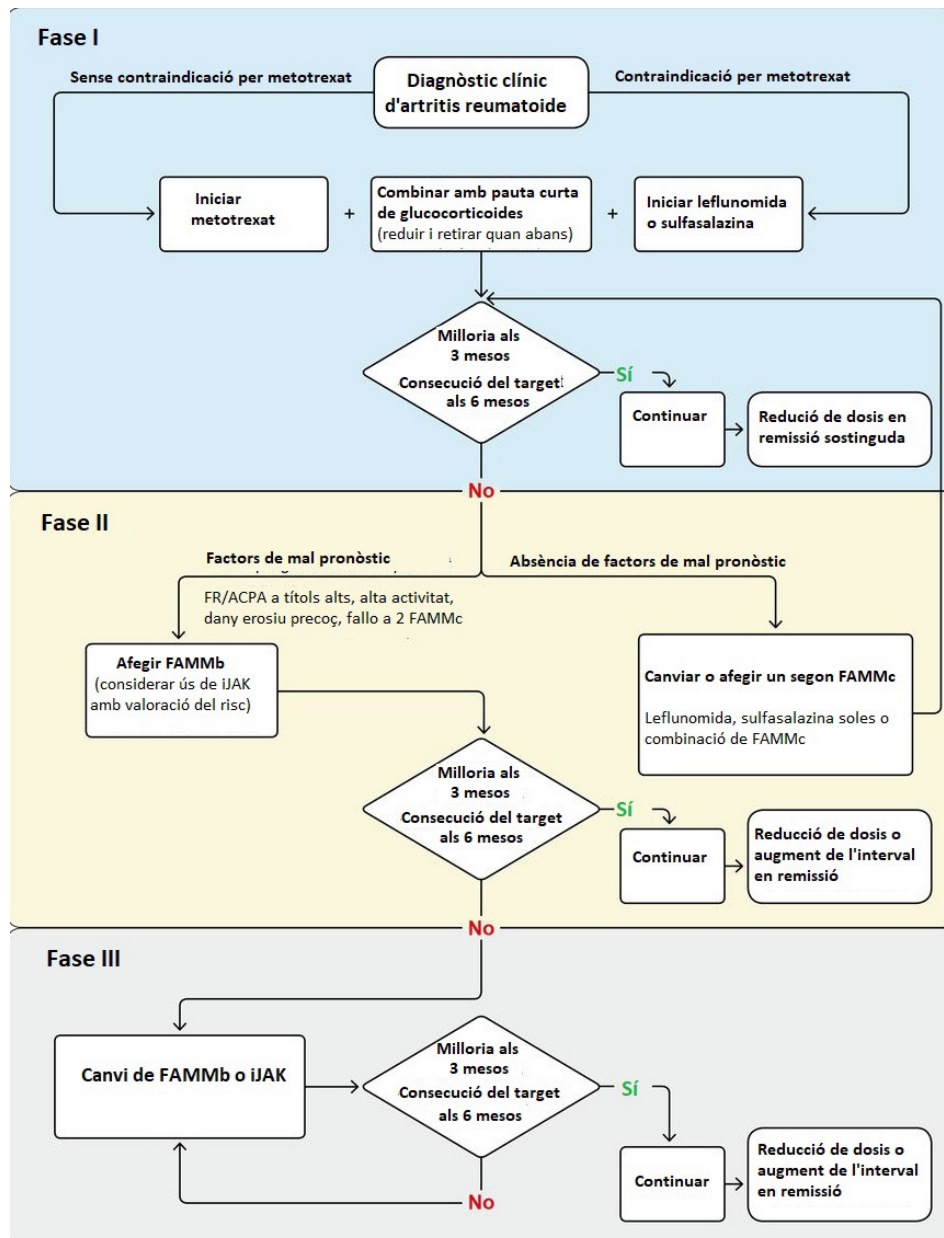
Principis generals	
A	El tractament dels pacients amb AR ha de buscar la millor atenció i ha de basar-se en una decisió compartida entre el pacient i el reumatòleg.
B	Les decisions de tractament es basen en l'activitat de la malaltia, la valoració de seguretat i altres factors del pacient, comorbidityats i progressió dels danys estructurals.
C	Els reumatòlegs són els especialistes que haurien de cuidar principalment els pacients amb AR.
D	Els pacients necessiten accés a diversos medicaments amb diferents mecanismes d'acció per abordar la heterogeneïtat de l'AR; ja que poden requerir múltiples teràpies successives al llarg de la vida.
E	L'AR comporta costos individuals, mèdics i socials elevats, tots els quals s'han de tenir en compte en la seva gestió pel reumatòleg que realitza el tractament.

**Taula 6.***Principis generals de les recomanacions del maneig de l'artritis reumatoide d'EULAR 2022.*

Recomanacions	
1	La teràpia amb FAMM hauria de començar tan aviat com es faci el diagnòstic de l'AR.
2	El tractament hauria de tenir com a objectiu assolir una remissió sostinguda o una LDA.
3	La monitorització hauria de ser freqüent en casos de malaltia activa (cada 1-3 mesos); si no hi ha millora com a molt als 3 mesos després de començar el tractament o no s'ha assolit l'objectiu als 6 mesos, s'hauria d'ajustar la teràpia.
4	El metotrexat (MTX) hauria de ser part de la primera estratègia de tractament.
5	En pacients amb contraindicació al MTX (o intolerància primària), es pot considerar leflunomida o sulfasalazina com a part de la primera estratègia de tractament.
6	S'ha de considerar l'ús de glucocorticoides a curt termini en iniciar o canviar un FAMMc, amb diferents esquemes de dosificació i vies d'administració, però s'han d'anar reduint i suprimir tan ràpidament com sigui clínicament possible.
7	Si no s'assoleix l'objectiu de tractament amb la primera estratègia de FAMMc, en absència de factors pronòstics negatius, es poden considerar altres FAMMc.
8	Si no s'assoleix l'objectiu de tractament amb la primera estratègia de FAMMc, quan hi ha factors pronòstics negatius, s'hauria d'afegir un FAMMb o es podria considerar un iJAK/FAMM sintètic dirigit (FAMMSd), però s'han de tenir en compte els factors de risc pertinents.*
9	FAMMb i FAMMSd haurien de combinar-se amb un FAMMc. En pacients que no poden utilitzar FAMMc com a co-medicació, els inhibidors de la via IL-6 i FAMMSd poden tenir avantatges comparatius amb altres FAMMb.
10	Si un FAMMb o un FAMMSd ha fallat, es podria considerar el tractament amb un altre FAMMb o un FAMMSd. Si una teràpia amb inhibidors de TNF (anti-TNF) o del receptor IL-6 ha fallat, els pacients podrien rebre un agent amb un altre mode d'acció o un segon anti-TNF/anti-IL-6R.
11	Si un pacient es troba en remissió sostinguda després de deixar de prendre glucocorticoides, es podria considerar la reducció de la dosi de FAMM.

\*Al prescriure un iJAK s'han de considerar els següents factors de risc cardiovascular o de malignitat: edat > 65 anys, hàbit tabàquic actiu o passat, altres factors de risc cardiovascular (com diabetis, hipertensió, obesitat), altres factors de risc de malignitat (antecedent de càncer), factors de risc de tromboembolisme (antecedent d'infart de miocardi, insuficiència cardíaca, càncer, coagulopaties, anticonceptius hormonal o tractament hormonal substitutiu, cirurgia major o immobilitat).

En les recomanacions EULAR queda molt ben definida la indicació de tractament precoç, els objectius de tractament, la monitorització del pacient i el tractament inicial amb FAMMc com el metotrexat. L'algoritme de tractament es mostra en la Figura 7. En canvi, no existeixen recomanacions específiques que ens indiquin quin FAMMb o FAMMsd utilitzar en cas de precisar inici d'una teràpia avançada. Únicament s'esmenta que, en cas de precisar monoteràpia, podrien ser preferibles els anti-IL-6R i els iJAK donat la seva eficàcia en aquest escenari i les noves advertències per tal de considerar el risc benefici amb els iJAK.



**Figura 7.**

*Adaptat de les recomanacions EULAR actualitzades el 2022(69). Fase I. Al diagnòstic de la malaltia està sempre indicat iniciar MTX excepte si hi ha contraindicacions. Els objectius de tractament seran sempre la milloria als 3 mesos i la consecució del target de tractament als 6 mesos. Fase II. En cas de conseguir-se amb FAMMc, està recomanat iniciar un FAMMb en presència de factors de mal pronòstic (o iJAK després de valorar el risc). Fase III. Si a la reavaluacions no s'aconsegueix el target es recomana canviar de FAMMb o iJAK. En cas de conseguir objectius, es pot plantejar la reducció progressiva del tractament.*

Com indica el principi general “E” de les recomanacions EULAR, els costos associats a l’AR poden ser molt elevats, en concret, per la despesa farmacològica associada als nous FAMMb o FAMMsD. L’aparició de fàrmacs biosimilars en els últims anys ha permès abaratir costos amb l’objectiu de mantenir un sistema sanitari sostenible i garantir l’accessibilitat a noves teràpies avançades. Aquest fet ha posicionat els fàrmacs biosimilars, pràcticament només anti-TNF en els últims anys, com a primera línia de tractament en els pacients que requereixen inici de FAMMb o FAMMsD. L’aparició de TCZ com a fàrmac biosimilar el 2023 i altres biosimilars o genèrics en els pròxims anys, permetrà probablement una elecció farmacològica de primera elecció menys condicionada.

Actualment en el nostre medi, l’elecció del primer fàrmac de teràpia avançada és habitualment anti-TNF biosimilar pels determinants farmacoecònomicos, però no és així en les recomanacions de les guies europees o nacionals, que no indiquen ninguna preferència d’un FAMMb o FAMMsD sobre l’altre. Per tant, l’elecció de posteriors línies de tractament es basen en una decisió compartida amb el pacient, considerant el perfil de risc/benefici segons comorbiditats i possibles EA o contraindicacions, preferències en posologia i experiència clínica del reumatòleg. Tot i que totes les teràpies actuals tenen alta eficàcia, existeixen pacients no responedors que no som capaços d’identificar a priori, fet que, en ocasions, implica trobar el tractament més adequat mitjançant un procés de prova-error. Actualment no es disposen de biomarcadors clínics, serològics o genètics que permetin una tria individualitzada del tractaments, que podrien evitar fracassos de tractament amb els conseqüents temps d’afectació de qualitat de vida i possibles seqüeles funcionals.

En les recomanacions actuals, tampoc s’indica que el canvi de línia d’acció després de fracàs de tractament (*switching*) sigui superior a mantenir-se en el mateix mecanisme d’acció farmacològic (*cycling*), tot i que cada cop hi ha evidència creixent a favor d’una major eficàcia i supervivència de fàrmac al fer *switching* (88–90).

#### **1.1.6.4. Tractament no farmacològic**

Les infiltracions intraarticulars amb corticoides d’alliberació lenta és el tractament local recomanat de primera elecció. S’utilitzen àmpliament en la pràctica clínica com a tractament coadjuvant per la seva alta eficàcia i rapidesa d’acció. En cas de múltiples infiltracions amb corticoesteroides fallides, es poden plantejar altres tractaments locals més agressius com poden ser la sinoviólisi isotòpica o química.

El tractament rehabilitador i l’exercici físic es recomanen des del moment del diagnòstic, adaptats al grau d’afectació i forma física del pacients i altres comorbiditats.



Per últim, la cirurgia té un paper reduït però pot ser útil en certes ocasions. Acostuma a estar indicada en aquells casos en que la malaltia ha provocat un gran grau de destrucció articular o òssia amb afectació funcional i dolor crònic. En articulacions greument afectades es pot plantejar la pròtesi quirúrgica per tal d'intentar millorar la funció articular i la clínica del pacient.

## **1.2. Fàrmacs disponibles en artritis reumatoide**

### **1.2.1. Fàrmacs antireumàtics modificadors de la malaltia convencionals**

El principal FAMMc és el MTX, considerat la pedra angular del tractament de l'AR durant dècades i es manté encara com a primer tractament d'elecció en les guies terapèutiques en l'era dels tractaments biològics. El MTX és un antimetabòlit que actua inhibint competitivament l'enzim dihidrofolat reductasa, que participa en la formació de tetrahidrofolat que és necessari per la formació del nucleòsid timidina que es requereix per la síntesi d'àcid desoxiribonucleic (ADN), àcid ribonucleic (ARN), timidilats i proteïnes.

Tot i que es tracta d'un fàrmac que ha demostrat àmpliament la seva eficàcia en pràctica clínica, assajos clínics i estudis observacionals, no es coneix exactament el mecanisme d'acció del MTX degut a la seva complexitat. El MTX està relacionat amb la disminució de producció de citocines pro-inflamatòries com IL-12a i IFN- $\gamma$  i augment d'expressió de gens codificadors de proteïnes antiinflamatòries com IL-4 i IL-10 (91) així com també s'ha descrit la seva inhibició sobre NF- $\kappa$ B (92). La hipòtesi que explica com aconsegueix aquests efectes inflamatoris més acceptada és la que el relaciona amb l'augment de nivells extracel·lulars d'adenosina (93, 94).

El MTX és un tractament àmpliament utilitzat, no només a l'inici de la malaltia, sinó que s'utilitza també en combinació amb FAMMb per aportar més resposta al tractament i per allargar-ne la supervivència. L'experiència clínica acumulada en el seu maneig, la disponibilitat de presentacions orals i subcutànies permet que s'utilitzi de forma eficaç i generalment es puguin controlar els EA més habituals. Tot i així, no és infreqüent la discontinuació del fàrmac per intolerància intestinal, hepatotoxicitat o altres EA tipus fatiga i cefalea.

En cas de contraindicació o intolerància a MTX, les guies recomanen el tractament amb un altre FAMMc principalment amb leflunomida i sulfasalazina, tot i que la hidroxicloroquina també pot tenir un paper (69).

### **1.2.2. Fàrmacs antireumàtics modificadors de la malaltia biològics o sintètics dirigits**

Les teràpies avançades han suposat un gran avanç en el tractament de l'AR en les últimes dècades ja que han permès un millor control de l'activitat de la malaltia, menor progressió radiològica i una millor qualitat de vida.



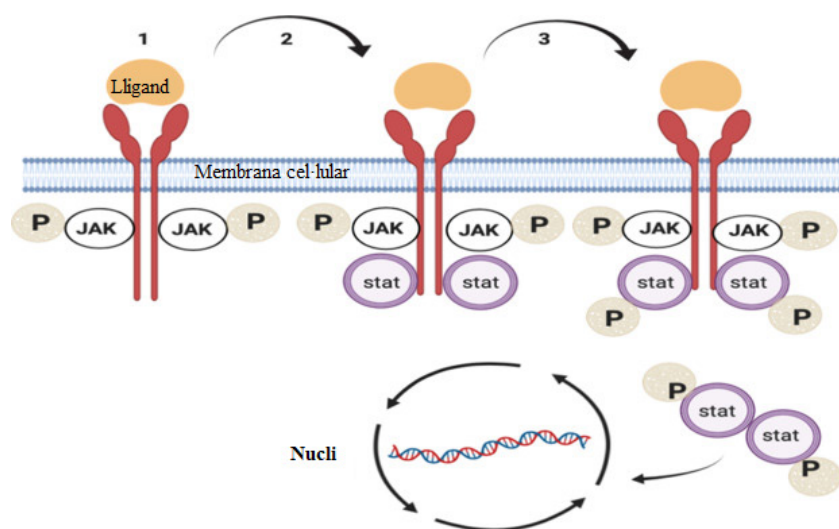
Actualment tenim disponibles per al tractament diversos FAMMb, que generalment es tracten d'anticossos humans, humanitzats o quimèrics o proteïnes de fusió que actuen en diverses dianes terapèutiques de forma específica. Estan indicats per al tractament de l'AR moderada a greu en que ha fracassat el tractament amb FAMMc o estan contraindicats. Disposem de 5 grups farmacològics segons el mecanisme d'acció: anti-TNF, anti-CD20, anti-IL-6R, abatacept i anti-IL-1.

- Anti-TNF: Infliximab (IFX) (anticòs quimèric), etanercept (proteïna de fusió que consta de la fracció constant d'una immunoglobulina unida a un receptor de TNF), adalimumab (ADA) (anticòs monoclonal humà), certolizumab pegilat (format per la fracció variable d'un anticòs monoclonal murí humanitzat unit a dues molècules de polietilenglicol) i golimumab (anticòs monoclonal IgG1 humanitzat recombinant).
- Anti-CD20: Rituximab (RTX) (anticòs monoclonal quimèric que actúa contra la molècula CD20 que s'expressa en la superfície dels limfòcits B).
- Abatacept: Proteïna de fusió formada pel domini extracel·lular del CTLA-4 humà i el fragment constant (Fc) de la IgG1 humana. S'uneix de forma competitiva i amb gran afinitat a CD80/86 i evita la seva unió amb CD28, impeding així l'activació del limfòcit T.
- Anti-IL-6R: Tocilizumab (TCZ) (anticòs monoclonal humanitzat dirigit contra l'IL-6R soluble i de membrana) i sarilumab (anticòs monoclonal humà dirigit contra l'IL-6R soluble i de membrana).
- Anti-IL-1: Anakinra (forma recombinant no glicosilada de l'antagonista del receptor de IL-1 humà).

Per altra banda, han sorgit en els últims anys diversos tractaments FAMMs, tots ells de la família farmacològica d'iJAK. Es tracta de petites molècules que actuen inhibint la via de senyalització intracel·lular JAK/STAT, relacionada amb la regulació de les vies inflamàtores i hematopoètiques. Són la primera opció de teràpia avançada per via oral i els iJAK aprovats pel tractament de l'AR a Europa són: tofacitinib, baricitinib, upadacitinib i filgotinib.

Tot i que el mecanisme d'acció és similar, existeixen diferències en eficàcia i perfil de seguretat ja que presenten diferents selectivitats per la inhibició dels quatre subtipus principals de JAK (JAK1, JAK2, JAK3 i TYK2) (95). El funcionament general de les vies de senyalització JAK/STAT es representen en la figura 8.

Tenen indicació en el tractament de l'AR moderada a greu amb fracàs a tractament amb FAMMb i es posicionen segons les últimes guies al mateix nivell que els FAMMb, considerant però diversos factors de risc com s'ha esmentat en l'anterior punt.



**Figura 8.**

Representació simplificada de la via de senyalització JAK/STAT. (1) El lligand s'uneix al domini extracel·lular del receptor de citoquines, s'activa i provoca l'autofosforilació de les JAK, que es troben com homodímers o heterodímers. (2) Les proteïnes STAT s'uneixen al receptor activat. (3) Les proteïnes STAT es fosforilen i es transloquen al nucli, on activaran la transcripció gènica i, consegüentment, la síntesi proteica. Adaptat de Harrington R et al (95).

### Fàrmacs inhibidors dels receptors d'IL-6

TCZ és un anticòs monoclonal antagonista de l'IL-6R en forma soluble i en membrana, pel que inhibeix la senyalització de la via de IL-6 amb els conseqüents efectes en la resposta immunològica: augment de limfòcits B reguladors, disminució de l'activació de limfòcits T, disminució de les citocines pro inflammatòries i disminució de la síntesi hepàtica de reactants de fase aguda. Es mostra el bloqueig de la senyalització IL-6 en els receptors solubles i de membrana en la figura 9.

A nivell d'estudis preclítics s'han observat efectes beneficiosos en os (augment de biomarcadors de formació òssia) i articulació (disminució de biomarcadors de sinovitis i dany del cartílag), mentre que a nivell analític destaca la ràpida disminució de reactants de fase aguda com PCR i VSG (96).

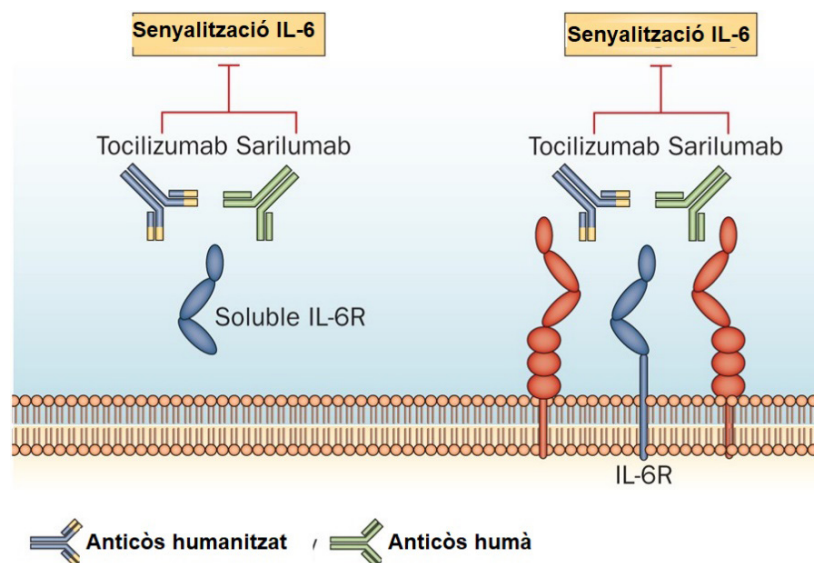
Existeix una àmplia experiència clínica de l'eficàcia i seguretat del tractament amb TCZ a curt i llarg termini, en monoteràpia o en combinació amb FAMMc i en pacients amb AR en estadis inicials o establerts. S'ha demostrat la milloria a nivell clínic, radiogràfic i en qualitat de vida en múltiples assajos clínics de gran mida mostral, multicèntrics, randomitzats i doble-cec. S'ha demostrat superioritat en monoteràpia en comparació amb ADA després de resposta insuficient a MTX (97), superioritat respecte a monoteràpia amb MTX en pacients *naïve* (98) i també després d'insuficient resposta al tractament amb FAMM en pacients amb AR d'alt risc (99), aconseguint indicadors de resposta ACR20 entre 65-78%, ACR50 entre 44-64% i ACR70 entre 28-59%. També existeix evidència sòlida de l'eficàcia i seguretat tant en teràpia combinada (MTX+TCZ) com en monoteràpia amb majors valors de remissió, resposta ACR, dany estructural i funció física (6, 100, 101).

TCZ es tracta d'un fàrmac amb bona tolerància i perfil de seguretat similar als altres agents immunomoduladors usats en AR, sent els EA més freqüents i rellevants els infecciosos (sobretot del tracte respiratori alt), hipercolesterolèmia, toxicitat hepàtica, leuco i neutropènia, perforació gastrointestinal (molt infreqüent i principalment en relació a diverticulitis) i les reaccions locals en el punt d'injecció en la forma subcutània. A part dels resultats d'eficàcia i seguretat, destaquen altres avantatges com són el risc baix de desenvolupar immunogenicitat i la flexibilitat entre les vies d'administració endovenosa i subcutània (102).

Sarilumab és un anticòs monoclonal humà que actua contra l'IL-6R soluble i de membrana, interrompent la senyalització i les vies pro inflamatòries que activa IL-6. Al ser un anticòs totalment humà tindria el potencial de generar un menor nombre d'anticossos neutralitzants i de reaccions al·lèrgiques que TCZ. Disposa d'una via d'administració subcutània amb una posologia de 200mg o 150mg cada dues setmanes.

Existeixen dades d'assajos clínics que demostren que la teràpia combinada amb MTX és més eficaç que el MTX en monoteràpia quan s'avalua resposta ACR, taxa de remissió per DAS28-PCR, progressió radiogràfica i funció física (103, 104). També disposa de dades de superioritat vers ADA en monoteràpia (105). A més, destaca que en estudis *in vitro* sarilumab ha demostrat una afinitat 10 vegades major per IL-6R que TCZ i una inhibició de les vies cel·lulars mediades per IL-6 amb menors concentracions que TCZ (106). A nivell clínic però no s'han trobat diferències significatives en eficàcia, sent recomanat el seu ús al mateix nivell que TCZ i la resta de teràpies avançades, en pacients amb AR moderada-severa que no han respòs al tractament inicial amb FAMMc (69).

En quant a dades de seguretat, no s'han detectat diferències significatives respecte altres FAMMb, presentant un perfil de seguretat similar a TCZ.



**Figura 9.** Anticossos disponibles per al bloqueig de la via IL-6 en AR. Tocilizumab i sarilumab són anticossos dirigits contra els receptors transmembrana i solubles d'IL-6, que bloquegen la unió de IL-6 i la seva senyalització per la via clàssica, de trans-senyalització o per clústers. La cadena representada com vermella en la figura és la glicoproteïna 130, necessària per desencadenar la senyalització i l'expressió gènica descendent. Adaptat de Ruderman E (107)

## 1.3. Genètica i farmacogenètica

### 1.3.1. Principis generals de la genètica

Els cromosomes estan formats per ADN i proteïnes. L'ADN és la molècula que emmagatzema la informació genètica essencial per al desenvolupament i funcionament dels éssers vius. Aquesta molècula consisteix en dues cadenes llargues de nucleòtids, amb polaritat oposada, que formen una doble hèlix, com va ser descobert per Watson i Crick el 1953. Cada nucleòtid consta de desoxiribosa, una base nitrogenada i grups de fosfat. Les bases nitrogenades (adenina, guanina, timina i citosina) formen parells complementaris (A-T i G-C) mantenint la integritat de la molècula.

La informació genètica està codificada en la seqüència de nucleòtids de l'ADN. Aquesta complementarietat és crucial per a la replicació cel·lular i els processos de transcripció a ARN missatger (ARNm), que posteriorment es tradueix per formar proteïnes.

Els gens, definits com a seqüències d'ADN, estan compostos per exons (regions codificants) i introns (regions no codificants).

En les proteïnes, les unitats estructurals fonamentals són els aminoàcids. Cada aminoàcid està codificat per un grup de tres bases en l'ARNm, conegut com a codó o triplet. Donada la restricció de només quatre bases nitrogenades (adenina, guanina, citosina i timina), existeix un nombre limitat de combinacions possibles, que és de 64 (Figura 10). Aquest conjunt de 64 codons no només es tradueix a 20 aminoàcids diferents, sinó que també inclou codons que serveixen com a senyals d'inici i terminació del procés de transcripció. Aquest fenomen es coneix com la degeneració del codi genètic, que implica que diversos codons poden codificar pel mateix aminoàcid. Això reflecteix una certa flexibilitat en la interpretació del codi genètic i pot proporcionar una certa resistència a les mutacions puntuals.

		Segona lletra				
		U	C	A	G	
Primera lletra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Alto UAG } Alto	UGU } Cys UGC } UGA } Alto UGG } Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } AUC } Ile AUA } <b>AUG Met</b>	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } GUC } Val GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

**Figura 10.**

Codons del codi genètic i igualències amb els aminoàcids. A: Adenina; Ala: Alanina; Arg: Arginina; Asn: Asparagina; Asp: Àcid aspàrtic; C: Citosina; Cys: Cisteïna; G: Guanina; Gln: Glutamina; Glu: Àcid glutàmic; Gly: Glicina; His: Histidina; Ile: Isoleucina; Leu: Leucina; Lys: Lisina; Met: Metionina; Phe: Fenilalanina; Pro: Prolina; Ser: Serina; Thr: Treonina; Trp: Triptòfan; Tyr: Tirosina; U: Uracil; Val: Valina

### 1.3.2. Variacions genètiques

La variació genètica interindividual en la població és essencial per garantir l'adaptabilitat al medi de les espècies, però en ocasions aquestes variacions o mutacions poden suposar un major risc per desenvolupar o, directament, provocar l'aparició de malaltia.

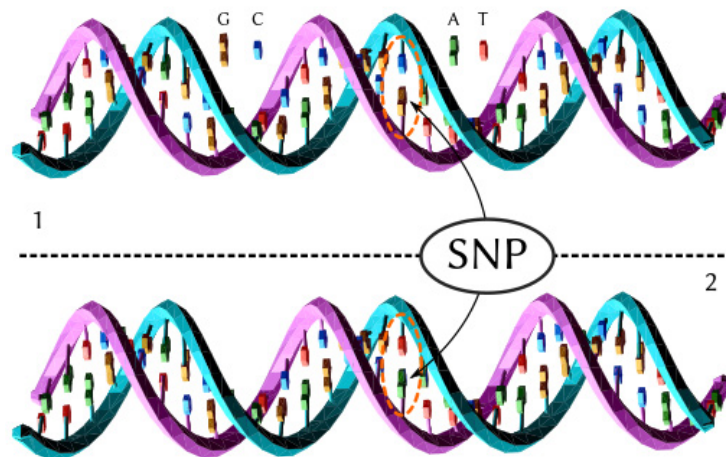
Es denomina locus a la localització específica d'una regió del genoma en un cromosoma. Les diferents formes d'una seqüència d'ADN en un locus particular s'anomena variant genètica o al·lel. Per cada al·lel tenim dues còpies cromosòmiques que determinen tres possibles genotips diferenciats: homozigot natural o *wild-type* si es tenen dues còpies del gen normal, homozigot mutat si es presenten dues còpies del gen mutat o heterozigot si es té una còpia de cada.

La freqüència al·lèlica és el percentatge de certa variant genètica o al·lel en una població determinada. Podem diferenciar diferents tipus de variants genètiques. Les mutacions poden afectar a un sol nucleòtid o afectar a fragments més grans d'ADN i poden tenir un impacte significatiu en la funció del gen. Generalment tenen freqüències inferiors a 1%. Per altra banda, els SNP són una variació en un sol nucleòtid en la seqüència d'ADN que és comuna (>1% de la població). Generalment no tenen un impacte negatiu directe en la funció del gen però poden trobar-se associacions amb diverses malalties.

Els SNP constitueixen fins al 90% de la variabilitat del genoma humà i apareixen en promig, cada 300 nucleòtids. S'anomena al·lel major al més freqüent en una certa població i al·lel menor al menys freqüent. S'han establert i publicat en bases de dades públiques les freqüències poblacionals en diferents poblacions en l'*Allele Frequency Aggregator dataset* (ALFA). D'aquesta manera es poden consultar les freqüències al·lèliques dels SNPs per poblacions.

Un SNP no té perquè acabar suposant un canvi d'aminoàcid i de la proteïna final ja que pot trobar-se en zones intròniques o, degut a la degeneració del codi genètic, codificar un triplet que no suposi un canvi d'aminoàcid. Quan sí que produeix un canvi d'aminoàcid pot representar un canvi en la funció proteica i s'anomenen SNP funcionals. Tot i així, els SNP en regions no codificants sí que poden tenir conseqüències en el procés de traducció ja que poden afectar regions reguladores o modificar la seqüència d'ARNm en el procés de *splicing*.





**Figura 11.**

Representació d'una variació d'un sol nuclèotid (SNP) en el genoma. La mol·lecule d'ADN superior canvia respecte la inferior per un polimorfisme d'una sola base (polimorfisme G/A). Model realitzat per David Eccles (gringer), CC BY 4.0 <<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>>, via Wikimedia Commons

### 1.3.3. Genotipatge

Per tal de poder determinar un determinat genotip en un locus específic es pot realitzar una reacció en cadena de la polimerasa reacció en cadena de la polimerasa a temps real (rtPCR) utilitzant sondes Taq-Man comercials o personalitzades. Tot seguit, s'exposen els passos necessaris per realitzar un genotipatge per rtPCR.

1. Extracció i purificació de la mostra d'ADN. Es pot obtenir de forma automatitzada d'una mostra de sang perifèrica.
2. Disseny de *primers* o sondes. Per tal de detectar una zona concreta de l'ADN i amplificar-la s'han d'utilitzar sondes que s'uneixen en regions específiques del ADN que flanqueja un SNP i sondes de detecció que emetin fluorescència per tal de poder quantificar-lo. Les sondes Taq-Man són sondes de hidròlisi que es van dissenyar per augmentar l'especificitat de la PCR quantitativa i que incorporen un marcador fluorescent que s'activa només quan s'ha replicat la zona d'interès.
3. Amplificació del ADN. La rtPCR utilitza una reacció de PCR estàndard amb cicles tèrmics que produeixen la desnaturalització de l'ADN amb l'augment de temperatura i permeten la hibridació amb el descens. D'aquesta manera, les seqüències d'interès marcades per les sondes s'amplifiquen en cada cicle.
4. Monitoratge de la fluorescència. En cada cicle d'amplificació es mesura la fluorescència emesa. A mesura que es va replicant la seqüència d'ADN, les sondes de detecció emeten fluorescència, que serà proporcional a la quantitat de producte generat
5. Anàlisi de dades. Les dades de fluorescència es representen gràficament mostrant una corba de creixement que reflexa l'augment exponencial del producte d'amplificació. Així es pot discriminar quin al·lel es troba per cada mostra en un locus específic.

### 1.3.4. Farmacogenètica

La farmacogenètica és la disciplina científica que investiga la variabilitat interindividual en la resposta als fàrmacs, tant en termes d'efectivitat com d'EA, basant-se en els genotips dels individus (108). Aquest camp té com a objectiu fonamental la predicció i prevenció del risc de fracàs terapèutic i/o toxicitat en pacients sotmesos a tractaments farmacològics. Tot i que inicialment es va centrar en els gens relacionats amb el metabolisme dels fàrmacs, actualment també s'aplica a altres factors involucrats en la farmacocinètica i farmacodinàmica com, per exemple, receptors, transportadors, enzims, entre d'altres.

L'objectiu final de la farmacogenètica és optimitzar el tractament dels pacients mitjançant una estratificació basada en la resposta i/o toxicitat a un fàrmac específic, amb la finalitat de guiar cap a una teràpia personalitzada més segura i eficient. Aquesta aproximació contribueix a l'avenç de la medicina personalitzada, permetent als professionals de la salut seleccionar la medicació i la dosi més adequades per a cada pacient.

Existeixen diversos exemples de la importància de la farmacogenètica en diferents àmbits de la medicina en el que s'utilitza de forma rutinària per aportar una teràpia de precisió. En oncologia, s'utilitza l'anàlisi de mutacions en el gen de la dihidropirimidina dehidrogenasa abans d'administrar quimioteràpics com el 5-fluorouracil o la capecitabina per a evitar casos de toxicitats greus (109). En el cas del tractament amb irinotecan, els portadors en homozigosi de la variant *UGT1A1\*28* realitzen una menor excreció dels seus metabòlits i presenten un augment del risc de neutropènia (110). També existeixen biomarcadors genètics de toxicitat com l'al·lel *CYP2D6\*10* usat en el tractament amb tamoxifè (111). En el cas de dels immunosupressors, s'utilitza l'estudi dels gens de l'enzim tiopurin metiltransferasa i de l'enzim nudix hidrolasa 15 per prevenir efectes adversos com la mielosupressió amb el tractament amb azatioprina (112).

#### 1.3.4.1. Farmacogenètica en artritis reumatoide

Les principals guies terapèutiques no recomanen un FAMMb sobre d'altres degut a l'absència d'evidència que suporti la superioritat. Per aquest motiu el tractament és en moltes ocasions un procés de prova-error ja que no disposem de biomarcadors que ens permetin guiar l'estratègia terapèutica.

El paper de la farmacogenètica podria ser clau per entendre la gran variabilitat en la resposta interindividual al tractament amb FAMMb. Avenços en aquest camp permetrien optimitzar el tractament de l'AR millorant les taxes de resposta i reduint la possibilitat d'EA, triant el FAMMb més adequat de forma personalitzada per cada pacient. Per aquest motiu, l'estudi dels SNP ha guanyat interès en els últims anys. La recerca en farmacogenètica en AR s'ha centrat principalment en biomarcadors relacionats amb el MTX i en els FAMMb, especialment en els anti-TNF.

En l'estudi del MTX s'han estudiat principalment aquells polimorfismes genètics implicats en les vies metabòliques del MTX, com són SNPs en els gens de la timidilat sintetasa, metilentrehidrofolat reductasa (C677T i A1298C) i la 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleòtid formil transferasa, entre d'altres. També s'han estudiat polimorfismes en els transportadors del MTX. En conjunt, les dades actuals sobre la influència de SNPs en el metabolisme del MTX són controvertides i no són suficients per haver suposat canvis en el maneig farmacològic de l'AR. (113–116)

Entre els FAMMb, on existeix més literatura és en l'estudi de la farmacogenètica dels anti-TNF. En l'estudi de la farmacogenètica d'ADA i IFX s'han trobat diversos SNPs associats amb canvis en la resposta al tractament. Entre els més destacables, s'han descrit en el gens de la fracció constant del receptor de immunoglobulines IgG 2A (*FCGR2A*) i 3A (*FCGR3A*) que es troben predominantment en macròfags i cèl·lules dendrítiques. Canvis en aquest gen podria afectar l'afinitat d'unió amb la fracció IgG1 capaç d'unir-se als receptors dels fàrmacs anti-TNF (111, 117, 118). Algunes d'aquestes mateixes variants genètiques en *FCGR2A* i *FCGR3A* també s'han descrit associades a canvis en la resposta al tractament amb RTX (119–121).

Múltiples estudis han avaluat polimorfismes en el gen *TNF*, sent el més estudiat el rs1800629. En estudis amb ADA, l'al·lel G/G s'ha associat amb millors respostes que el A/G i A/A. En el mateix sentit, en un metanàlisi de O'Rielly et al. es va concloure que el genotip G/A era predictor de pitjor resposta en diferents anti-TNF, no només en ADA i IFX (122, 123). Aquests mateixos resultats van ser replicats en una altra metanàlisi, pel que es pot concloure que es podria individualitzar el tractament basant-nos en el SNP rs1800629 en pacients tractats amb anti-TNF (124). Destaca un estudi que, tot i no trobar associació entre les variants genètiques i la resposta al tractament, si va detectar que els genotips A/A i A/G tenien una major bioactivitat de TNF comparat amb el grup G/G (125).

També s'han trobat associacions entre el gens del receptor de TNF 1 i 2 (*TNFR 1* i *2*). Especialment la variant genètica 676 T/G del *TNFR2* es va trobar associada amb pitjor resposta a ADA, mentre que amb IFX només es va trobar aquesta associació en combinació amb una altra variant 857C/T en el gen de *TNF* (126, 127).

Tot i el gran nombre d'associacions establertes, l'evidència actual és inconsistent entre estudis, poc rellevant clínicament o no ha estat validada posteriorment per tal de valorar el benefici clínic en pràctica clínica. A destacar també la gran complexitat en les vies immunològiques, la variabilitat genètica interpersonal, així com factors ambientals que poden modificar les respostes clíniques i que dificulten la interpretació dels resultats dels estudis. A més, aquests estudis són generalment observacionals i avaluen SNP aïllats (111, 128).



## Fàrmacs anti-IL-6R

El primer estudi sobre farmacogenètica en TCZ i AR va ser el 2013 per part del grup de Wang et al., que va realitzar un estudi de GWAS en una gran població (n=1683) amb el qual es van detectar 8 possibles locus que podrien influir en la resposta a TCZ, encara que cap d'ells presentava una connexió directa amb la via de l'IL-6. Dels 8 SNPs trobats, rs1560011 (gen *CLEC2D*) i rs11052877 (gen *CLEC2C/CD69*) podrien tenir alguna relació indirecta amb la via de l'IL-6, però només un d'ells, rs11052877, ha estat reproduït en altres estudis més dirigits (129–131).

En un estudi realitzat en 87 pacients amb AR tractats amb TCZ, es descriu que els pacients amb el genotip rs396991-TT del *FGCR3A* van mostrar una major resposta EULAR als 12 mesos. Destaca que no es tracta de les mateixes variants genètiques en *FGCR3A* que s'havien trobat associacions en els estudis de fàrmacs anti-TNF i, per altra banda, que es tracta de la relació inversa dels resultats d'un estudi amb RTX. Ja que els pacients presentaven una millor resposta a RTX en el cas de ser portadors de l'al·lel G en rs396991 (121).

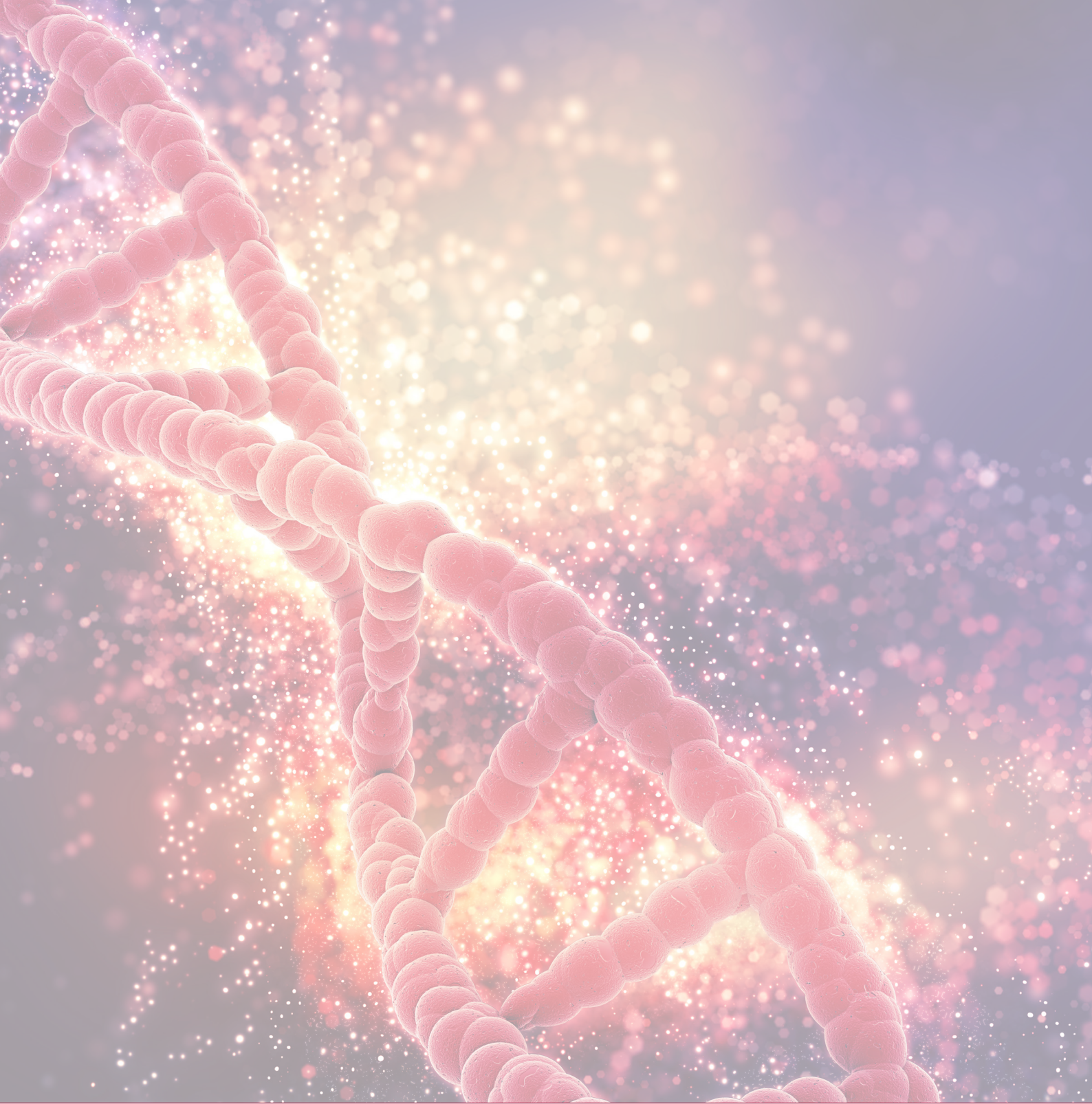
Les troballes a priori més rellevants, ja que han estat reproduïdes en diferents estudis farmacogenètics i presenten una major coherència fisiopatològica, són els SNPs trobats en el gen *IL6R*. Enevold et al. va trobar que certs haplotips dels SNPs rs12083537, rs4329505, rs2228145 de *IL6R* estaven associats a una pitjor resposta a TCZ basant-se en NAT i considerant els criteris de resposta EULAR en una població de 79 pacients amb AR (132).

D'altra banda, Maldonado-Montoro et al. va trobar que els pacients amb el genotip AA per rs12083537 i CC per rs11265618 tenien millor resposta en termes de LDA després de 12 mesos de tractament amb TCZ en una mostra de 77 pacients amb AR. Per tant, tot i que es van trobar associacions amb la resposta a TCZ i els SNP esmentats, el sentit de l'efecte era contrari. En l'estudi de Luxembourger et al. de 2019 es van repetir els resultats de Maldonado-Montoro, associant el genotip AA per rs12083537 a una millor resposta a TCZ (130, 132, 133).

Pel que fa als estudis de biomarcadors genètics per TCZ i EA, probablement hi ha pocs estudis degut a la baixa freqüència de gran part dels EA més rellevants, fet que dificulta obtenir suficient mostra i potencia estadística. En un estudi realitzat en població amb AR japonesa, sí que es va trobar que TCZ pot induir hiperbilirrubinèmia aïllada amb major freqüència en aquells portadors dels genotips 6/6, 6/28 o 28/68 del gen *UGT1A1*(134), troballes similars també reportades més recentment per sarilumab (135).

Per últim, destaca un estudi en població general en que es van estudiar dos SNPs localitzades en *IL6R* (rs4845625 i rs4537545) en relació als nivells d'inflamació mesurats per PCR i paràmetres

per avaluar el perfil lipídic. Els resultats van mostrar que l'al·lel T de rs4537545 estava associat a menors nivells basals de PCR, mentre que el genotip rs4845625\*T s'ha relacionat amb majors nivells de PCR i nivells alts de LDL i ApoB. Donat que aquest últim s'associa a nivells elevats d'inflamació basal i paràmetres de perfil lipídic de risc, els autors proposen rs4845625 com a possible factor de risc cardiovascular i suggereixen el seu potencial valor en posteriors estudis farmacogenètics amb fàrmacs anti-IL-6 (136). L'estudi d'aquestes variants i la seva influència en el perfil lipídic no han estat encara estudiats en població amb AR, així com tampoc la seva influència amb el tractament inhibidor de les vies d'IL-6.

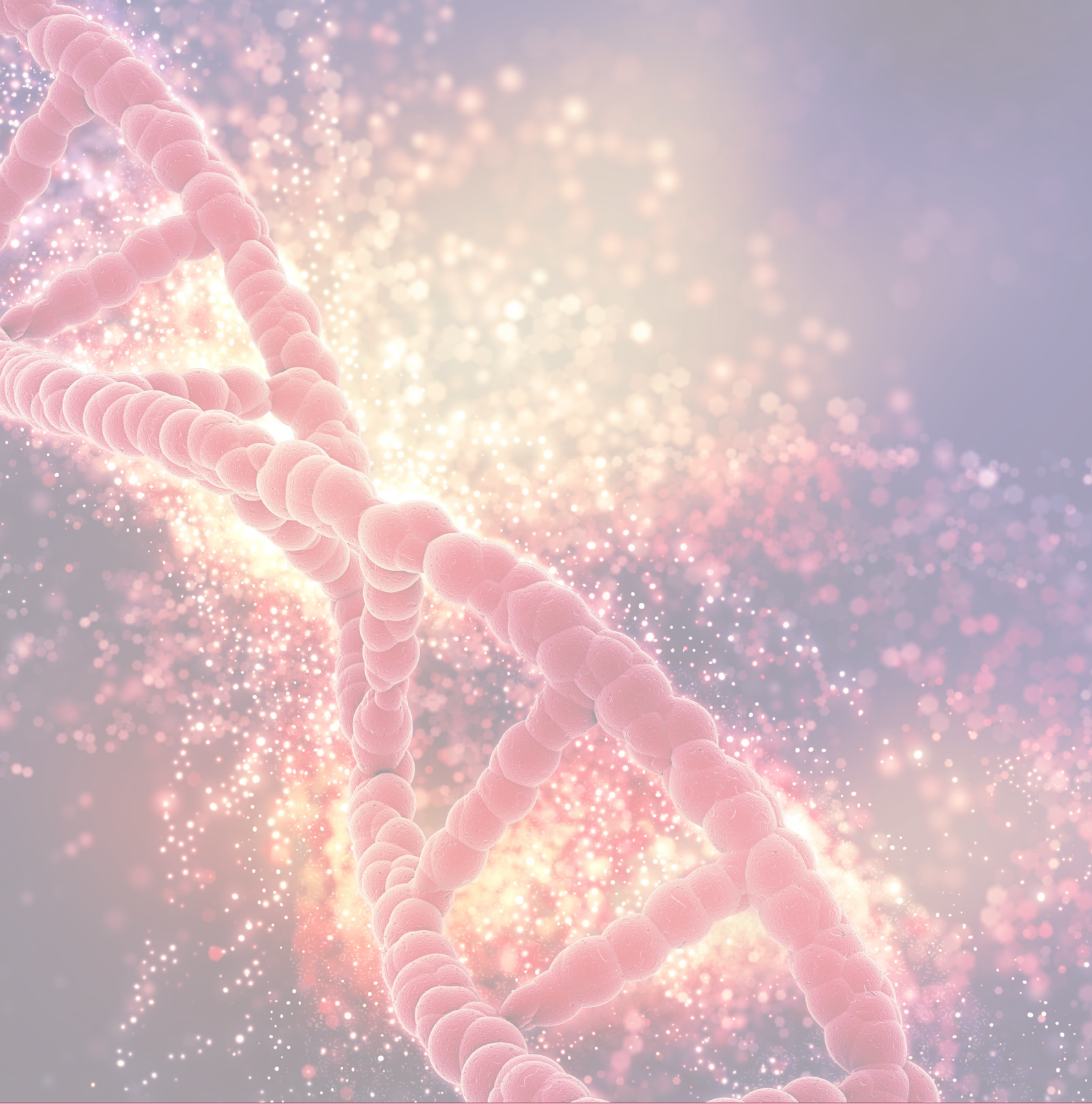


## 2. Hipòtesi

Falten eines per guiar el tractament farmacològic amb FAMM en pacients amb AR i la farmacogenètica es postula com una possible font de biomarcadors útils que permetrien individualitzar l'estratègia terapèutica.

Cal estudiar si les variacions genètiques en el gen *IL6R* poden influir en la resposta al tractament o en l'aparició de toxicitat en pacients amb AR tractats amb fàrmacs anti-IL-6R.





### **3. Objectius**

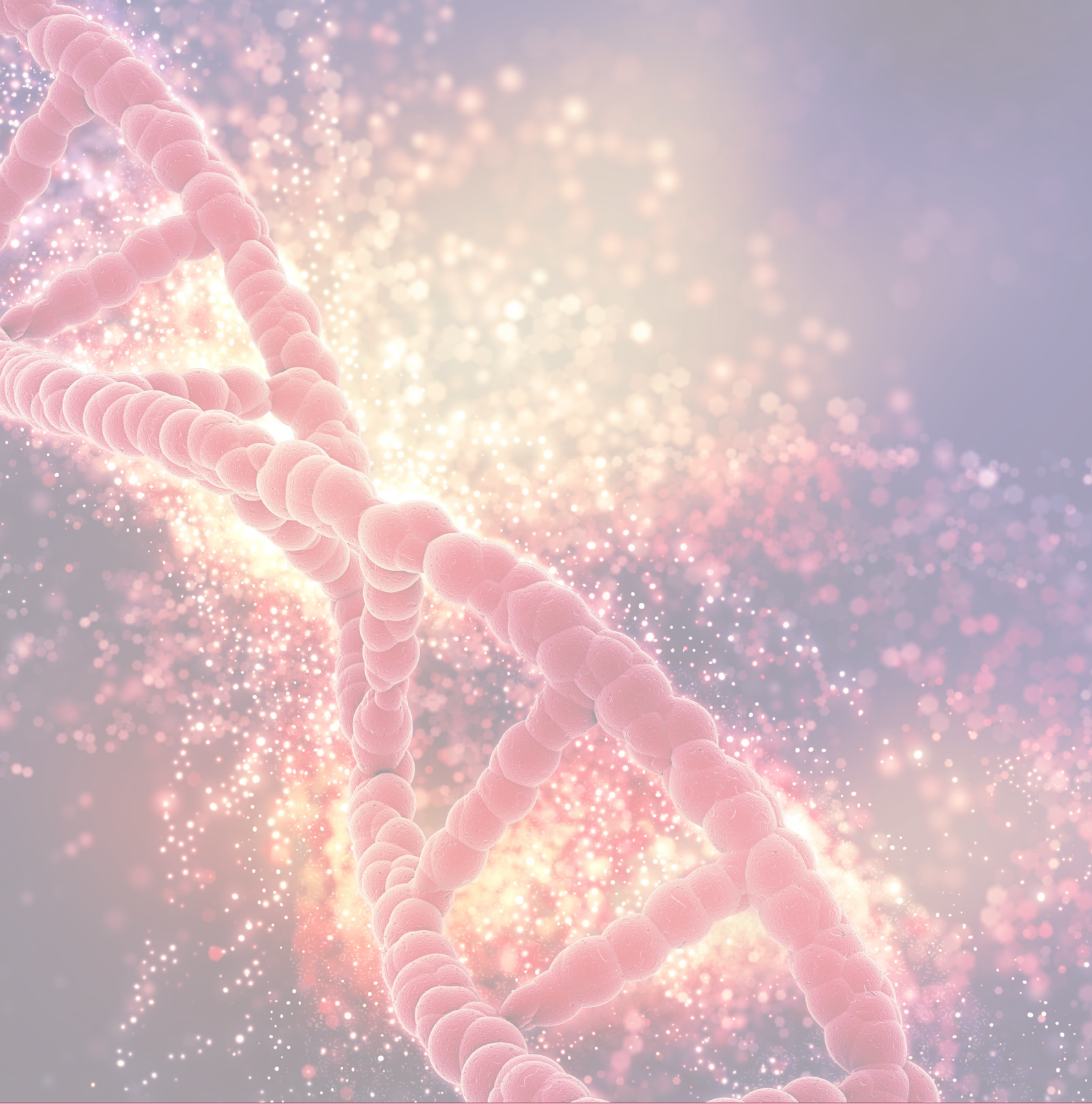
## **Objectiu primari**

Analitzar l'associació entre les variants genètiques en el gen de *IL6R* i la resposta al tractament a fàrmacs anti-IL-6R, tocilizumab i sarilumab, en pacients amb AR.

## **Objectiu secundari**

Avaluar l'associació entre les variants genètiques en el gen de *IL6R* i la toxicitat farmacològica a fàrmacs anti-IL-6R, tocilizumab i sarilumab, en pacients amb AR.





## **4. Compendi de publicacions**

## 4.1. Article 1

Sainz L, Riera P, Moya P, Bernal S, Casademont J, Díaz-Torné C, Millán AM, Sang-Park H, Lasa A, Corominas H. Role of IL6R Genetic Variants in Predicting Response to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceutics* 2022, 14, 1942. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091942>.



## Article

# Role of *IL6R* Genetic Variants in Predicting Response to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis

Luis Sainz <sup>1,2,3,†</sup> , Pau Riera <sup>3,4,5,\*,†</sup> , Patricia Moya <sup>1,3</sup> , Sara Bernal <sup>3,5,6</sup> , Jordi Casademont <sup>2,3,7</sup> , Cesar Díaz-Torné <sup>1,2,3</sup>, Ana Milena Millán <sup>1,3</sup>, Hye Sang Park <sup>1,3</sup> , Adriana Lasa <sup>3,5,6</sup> and Héctor Corominas <sup>1,2,3,\*</sup>

- <sup>1</sup> Rheumatology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08041 Barcelona, Spain
  - <sup>2</sup> Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Barcelona, Spain
  - <sup>3</sup> Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB SANT PAU), 08041 Barcelona, Spain
  - <sup>4</sup> Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain
  - <sup>5</sup> CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain
  - <sup>6</sup> Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain
  - <sup>7</sup> Internal Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, 08025 Barcelona, Spain
- \* Correspondence: priera@santpau.cat (P.R.); hcorominas@santpau.cat (H.C.)  
† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Rheumatoid arthritis (RA) is a prevalent autoimmune disease characterized by chronic arthritis that may lead to irreversible joint damage and significant disability. Patients with RA are commonly treated with Tocilizumab (TCZ), an IL-6 receptor (IL-6R) antagonist, but many patients refractorily respond to this therapy. Identifying genetic biomarkers as predictors of TCZ response could be a key to providing a personalized medicine strategy. We aimed to evaluate whether functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IL6R* gene could predict TCZ response in patients with RA. We retrospectively included 88 RA patients treated with TCZ. Six SNPs previously described in the *IL6R* gene (rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545, and rs4845625) were genotyped in DNA samples from these patients. Using parametric tests, we evaluated the association between these polymorphisms and clinicopathological features. Responses to treatments were assessed at six months using three variables: a quantitative improvement in Disease activity score including 28 joints (DAS28), a satisfactory European League Against Rheumatism (EULAR) response, and low disease activity (LDA) achievement. The three response variables studied were associated with genetic variant rs4845625, and no association was found with the other five SNPs. Our findings support the potential clinical value of SNPs in the *IL6R* gene as predictive biomarkers for TCZ response.

**Keywords:** *IL6R*; genetic variants; tocilizumab; rheumatoid arthritis; predictive factors



**Citation:** Sainz, L.; Riera, P.; Moya, P.; Bernal, S.; Casademont, J.; Díaz-Torné, C.; Millán, A.M.; Park, H.S.; Lasa, A.; Corominas, H. Role of *IL6R* Genetic Variants in Predicting Response to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1942. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091942>

Academic Editors: Francisco Abad Santos and Pablo Zubiaur

Received: 15 July 2022  
Accepted: 30 August 2022  
Published: 14 September 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a common autoimmune and inflammatory disease with an estimated worldwide prevalence ranging from 0.2 to 1% [1]. The most recent estimate in adults in Spain, published in 2016, reported a prevalence of 0.82% (95% CI, 0.59–1.15) [2]. RA etiology is complex as it involves the interplay of environmental triggers and genotype, factors known to play an important role in RA physiopathology. The most relevant genes associated with RA are involved in immunity activation and regulation, antigenic presentation, and proinflammatory cytokines [3]. RA is characterized by synovial inflammation, hyperplasia, and the progressive destruction of bones and cartilages in multiple joints [3]. If not treated correctly, these characteristics cause progressive disability, systemic complications, and reduced life expectancy [4]. Over the last 20 years, treatment has changed substantially thanks to the development of targeted biologic and non-biologic



disease-modifying anti-rheumatic drugs. These high-efficacy therapies enabled the improved control of the disease, and their diverse mechanisms of action, targeting various immune pathways, broadened the treatment armamentarium. Therapeutic strategies have also changed. Focus is now centered on early treatments and a treat-to-target approach where the main therapeutic goal is to achieve remissions or low disease activity (LDA) in order to prevent structural damage and maintain a quality of life [5–10].

The choice of treatments for RA is currently a trial-and-error process as no consistent clinical, biochemical, or genetic biomarkers that predict response to biological disease-modifying anti-rheumatic drug (bDMARD) have yet been identified. As delays in finding effective treatment can lead to disease progression and a poorer quality of life, establishing biomarkers of different responses is of paramount importance [11–13]. Because genetics can explain much of the inter-individual response to treatments, the study of single nucleotide polymorphisms (SNPs) has gained increasing interest in recent years. In the field of pharmacogenomics, such research has focused on genetic biomarkers relative to MTX [14–17] and anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) treatments [18–24].

Tocilizumab (TCZ) is a first-line bDMARD that competitively inhibits the binding of interleukin-6 (IL-6) to its soluble or membrane receptor (IL-6R). It is effective in the treatment of patients with moderate to severe RA and European League Against Rheumatism (EULAR) response rates of between 62 and 80 [13,25–27]. Nevertheless, due to pharmacoeconomic considerations, it is generally only prescribed after an inadequate response to methotrexate (MTX) or anti-TNF agents ([28–30]). Despite the effectiveness of TCZ in RA [13], some patients do not respond adequately to this drug. Taking into account that TCZ blocks the action of IL-6R, we hypothesized that functional variations in this gene could affect TCZ effectiveness. Previous studies assessed the influence of *IL6R* genetic variants on TCZ responses. However, the results hitherto published are inconsistent and produce contradictory results, and they are, therefore, not applicable to clinical practice [31–35]. The aim of the present study was to evaluate whether genetic variants in the *IL6R* gene are associated with responses to TCZ in patients with RA.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

We conducted a retrospective cohort study that included 88 RA patients treated with TCZ between 2016 and 2021. The following sociodemographic and clinical data were collected from electronic medical records: age, gender, age at diagnosis, previous treatments, comorbidities, TCZ starting date, TCZ dose, administration route, concomitant treatments, C-reactive protein (CRP), rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated protein antibody (ACPA), DAS28 at treatment initiation and at 6 months, and EULAR response at 6 months. DAS28 is a simplified disease activity score frequently used in trials and clinical practice that includes counting tender and swollen joints, the general health state evaluated by the patient, and acute phase reactants in blood tests. Response variables were determined at the baseline and at 6 months of TCZ treatment. Responses to treatment were assessed using three variables: a quantitative improvement in DAS28, a satisfactory EULAR response, and low disease activity (LDA). According to the EULAR guidelines, we considered a EULAR response to be satisfactory when the DAS28 improvement was greater than 1.2 and the presented DAS28 was lower than 3.2. We considered LDA when patients reached a DAS28 lower than 3.2 at 6 months [36,37].

The study was approved by the institutional ethics committees and registered at clinicaltrials.gov (protocol code: IIBSP-III-2020-148). All participants provided written informed consent for blood sampling and genetic analyses.

### 2.2. Genetic Studies

SNPs were selected according to published data concerning their functional relevance in the IL6 receptor. Those included were rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545 and rs4845625 (Table 1). The rationale for the selection of these SNPs was detailed

in previous studies [31–34,38]. All SNPs presented a minor allele frequency (MAF) over 0.10 in European population according to the ALFA project [39].

**Table 1.** Selected functional polymorphisms in the *IL6R* gene.

refSeg	Genomic Position (GRCh38)	MAF	Alleles
rs12083537	chr1:154408627	0.21	A > <b>G</b>
rs11265618	chr1:154457616	0.17	C > <b>T</b>
rs4329505	chr1:154459944	0.17	T > <b>C</b>
rs2228145	chr1:154454494	0.40	A > <b>C</b>
rs4537545	chr1:154446403	0.41	C > <b>T</b>
rs4845625	chr1:154449591	0.43	T > <b>C</b>

Abbreviations: *IL6R*, Interleukin 6 Receptor; MAF, minor allele frequency reported in the European population. The minor allele is highlighted in bold.

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). SNPs were analyzed by real-time PCR using TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The IDs for each Taqman SNP assays were the following: rs12083537 (C\_30997483\_10), rs11265618 (C\_30997439\_10), rs4329505 (C\_26292281\_20), rs2228145 (C\_16170664\_10), and rs4537545 (C\_11258666\_20). A custom Taqman assay was used for rs4845625. All cases were successfully genotyped.

#### Statistical Analyses

The Hardy–Weinberg equilibrium was assessed for each analyzed SNP using a chi-square test. Codominant, dominant, and recessive models of inheritance were considered to assess associations with outcome variables whenever appropriate.

Quantitative data were expressed as the mean (SD) for normally distributed variables. Normality was assessed using the Shapiro–Wilk test. The Student’s t-test or ANOVA was applied for normally distributed variables depending on the number of groups compared. We analysed the bivariate association for qualitative dichotomous variables using Pearson’s  $\chi^2$  or Fisher’s exact test. Associations between the various SNPs and the qualitative response variables were tested using  $\chi^2$  tests.

All tests were two-sided and a significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ) was considered significant. All statistical analyses were performed using IBM-SPSS (version 26.0, IBM, Armonk, NY, USA).

### 3. Results

#### 3.1. Characteristics of the Patients

We studied 88 patients with RA diagnosed at a mean age of 46.6 years (SD 15.86). Mean disease duration was 16.5 (SD 11.9) years. Most patients were female (86.4%). Table 2 summarizes baseline demographic and clinical characteristics.

The mean numbers of conventional cDMARD and bDMARD treatments received prior to TCZ were 2.39 (SD 1.3) and 1.48 (SD 1.4), respectively.

Baseline disease activity, measured by DAS28, was high, with a mean of 5.4 (SD 0.9). We were unable to include 4 of the 88 patients (4.5%) because the treatment was discontinued prematurely due to a loss of follow-up in 3 patients and the observation of a hypersensitivity reaction in 1 patient. Thus, these patients were not included in the efficacy analysis. After 6 months, the mean decrease in DAS28 was 2.9 (SD 1.3) and the satisfactory EULAR response rate was 73.9%.

None of the response variables studied showed statistically significant differences according to sex, tobacco exposure, seropositivity, the number of previous cDMARD or bDMARD, age at diagnosis, and body mass index (BMI). However, we observed two trends concerning these variables: EULAR satisfactory responses were higher in women than in

men (79.7% vs. 60%,  $p = 0.16$ ) and non-smokers showed a trend towards greater DAS28 improvements than smokers (3.04 vs. 2.35,  $p = 0.08$ ).

**Table 2.** Baseline patient characteristics ( $n = 88$ ).

Variables	$n$ (%)	Mean (SD)
Female/Male	76 (86.4)/12 (13.6)	
Age at diagnosis (years)		46.57 (15.86)
Disease duration (years)		16.53 (11.87)
Erosive RA	47 (53.4)	
RF positive	58 (65.9)	
ACPA positive	57 (64.8)	
Smoking habit		
Non-smoker	61 (69.3)	
Ex-smoker	14 (15.9)	
Smoker	13 (14.8)	
Body mass index		28.64 (6.07)
Number of previous cDMARD		2.39 (1.32)
Number of previous bDMARD		1.48 (1.41)
TCZ administration (intravenous)	47 (53.4)	
Baseline DAS28-CRP		5.39 (0.98)

ACPA, anticitrullinated protein antibodies; CRP, C-reactive protein; DAS28-CRP, disease activity score including 28 joints (based on CRP); bDMARD, biological disease-modifying antirheumatic drug; ESR, erythrocyte sedimentation rate; RF, rheumatoid factor; SD, standard deviation; TCZ, tocilizumab.

### 3.2. Genetic Determinants and Response to Treatment

The genotypic frequencies of the six SNPs studied were in Hardy–Weinberg equilibrium. As expected from the allele frequency population-based studies, we found that the mutated allele (C) of the SNP rs4845625 was more frequent than the wild-type (T) [39].

In the univariate analysis, only one SNP, rs4845625, showed a statistically significant association with the response outcomes studied (Table 3). When considering DAS28 improvement, six months after initiating TCZ treatment, we observed differences between the three genotypes compatible with an additive genetic model. The TT carriers for rs4845625 had a greater decrease (3.62) in DAS28 than those with the CT genotype (3.06) and the CC genotype (2.36) ( $p = 0.015$ ).

**Table 3.** Associations between the considered SNPs and response outcomes at 6 months.

SNPs	Genotype ( $n$ )	DAS28 Improvement			Satisfactory EULAR Response Rates				Low Disease Activity Rates			
		Mean Absolute Value	Genetic Model	$p$	%	Genetic Model	OR (95% CI)	$p$	%	Genetic Model	OR (95% CI)	$p$
rs4845625	T/T (13)	3.62	Cod	<b>0.015</b>	92.3	Cod	-	<b>0.01</b>	90.9	Cod	-	<b>0.015</b>
	T/C (42)	3.07	Rec	<b>0.009</b>	85.7	Rec	4.83 (1.63–14.28)	<b>0.03</b>	85.4	Rec	4.95 (1.57–15.55)	<b>0.004</b>
	C/C (29)	2.36			58.6				56.5			
rs11265618	C/C (57)	3.06	Cod	0.16	82.5	Cod	-	0.271	81.1	Cod	-	0.474
	C/T (24)	2.66	Dom	0.115	66.7	Dom	2.35 (0.82–6.71)	0.106	68.4	Dom	2.01 (0.65–6.22)	0.223
	T/T (3)	1.76			66.7				66.7			
rs4329505	T/T (58)	3	Cod	0.106	82.8	Cod	-	0.212	81.5	Cod	-	0.388
	T/C (23)	2.56	Dom	0.06	65.2	Dom	2.54 (0.88–7.29)	0.078	66.7	Dom	2.2 (0.7–6.8)	0.169
	C/C (3)	1.76			66.7				66.7			
rs12083537	A/A (55)	2.94	Cod	0.717	78.2	Cod	-	0.335	81.6	Cod	-	0.454
	A/G (24)	2.76	Dom	0.749	70.8	Dom	0.88 (0.3–2.54)	0.809	68.2	Dom	1.98 (0.66–5.95)	0.222
	G/G (5)	3.38			100.0				75.0			
rs2228145	A/A (25)	3.01	Cod	0.483	80.0	Cod	-	0.888	78.3	Cod	-	0.841
	A/C (44)	2.99	Dom	0.651	77.3	Dom	0.8 (0.26–2.54)	0.709	78.9	Dom	1.08 (0.33–3.52)	0.898
	C/C (15)	2.55			73.3				71.4			
rs4537545	C/C (24)	2.98	Cod	0.702	83.3	Cod	-	0.666	81.8	Cod	-	0.690
	C/T (46)	2.97	Dom	0.759	76.1	Dom	0.6 (0.18–2.04)	0.410	77.5	Dom	1.46 (0.42–5.1)	0.550
	T/T (14)	2.64			77.4				69.2			

Cod: Codominant; DAS28: disease activity score including 28 joints; Dom: dominant; OR: odds ratio;  $p$ :  $p$ -value; Rec: recessive; SNPs: single nucleotide polymorphisms. Significant values are highlighted in bold.



Patients carrying the T allele (TT + CT) also reached more satisfactory EULAR response rates than CC carriers (87.3% vs. 58.6%,  $p = 0.03$ ). Accordingly, when assessing LDA rates, the TT and CT genotypes also demonstrated better outcomes (86.5% vs. 56.6%,  $p = 0.04$ , OR (95% CI) = 4.95 (1.5–15.56)).

We did not perform a multivariate analysis as there were no statistically significant associations that could act as confounding variables.

As for the other five SNPs studied, no statistically significant associations were found (Table 3). The results showed a trend towards an association with response variables for rs4329505 and rs11265618, although they did not reach statistical significance. Patients carrying the CC genotype for rs4329505 seemed to have a poorer reduction in DAS28 at 6 months than those with the TT + CT genotypes (1.76 vs. 2.95,  $p = 0.06$ ). For the rs11265618 variant, the CC genotype (dominant homozygous) appeared to have superior satisfactory EULAR response rates than CT + TT genotypes (82.5% vs. 66.7%,  $p = 0.106$ ).

#### 4. Discussion

In this study, we assessed the associations between six SNPs in the *IL6R* gene and the response outcomes at 6 months in patients with RA. We found an association between rs4845625 and the three response variables used: DAS28 improvement, EULAR response, and LDA achievement.

As far as we know, this is the first study to show that rs4845625 could be a potential biomarker of response to TCZ in RA patients. Our results suggest that patients carrying TT and TC genotypes present higher satisfactory EULAR response rates when treated with tocilizumab (85.7–92.3% compared to the 73.9% of the whole cohort). However, larger prospective studies are needed to validate our results and for implementing rs4845625 genotyping in clinical practice.

This SNP is located at Chr1 (q21.3) g.154422067 in intron 7 of the *IL6R* gene. In silico tools such as the ESE Finder predict that this SNP could alter the splicing process and, therefore, modify the final amount of a functional protein. However, further analyses are required to confirm this hypothesis.

Current evidence shows several associations between rs4845625 and inflammatory pathways. Shah T et al. reported that rs4845625 is associated with plasma concentrations of IL6. However, the contribution of the SNPs evaluated in plasma IL6 levels in their study was mild [40]. Associations of the allele rs4845625\*T with increased levels of RCP, LDL, and apolipoprotein B were also found in a healthy cohort of 995 participants [38]. These results contrast with our findings of improved response outcomes in T allele carriers. A possible explanation for this discrepancy could be that a patient with a genetically determined pro-inflammatory basal state would have a greater chance to respond to treatments blocking these pathways. However, studies are lacking regarding associations between this genotype and inflammatory markers in the context of autoimmune diseases. Rs4845625 genetic variants have been linked to cardiovascular conditions in several reports, suggesting an important role of the IL-6 pathway ([41–44]), but we did not find previous research regarding rs4845625 and RA.

Although the rs11265618 polymorphism in our study showed no statistically significant association with the response to treatment variables, we observed a trend towards a greater response of the homozygous genotype (CC). In 2018, Maldonado-Montoro et al. described an association within the CC genotype that showed a better response in terms of LDA after 12 months of TCZ therapy (OR (95% CI) = 12.11 (2.2–67.8)), but they were unable to demonstrate this regarding the EULAR response or the DAS28 improvement [31]. While our findings did not confirm previously reported results, we propose that further investigations and larger samples are needed to determine the potential usefulness of rs11265618 as a biomarker for TCZ therapy.

Our results regarding rs4329505 also merit discussion. Despite the lack of statistical significance, our results using an additive genetic model suggest that the T allele could be associated with DAS28 improvements. Similar results have been reported previously. In a

retrospective study including 79 RA patients, the CC genotype of rs4329505 was linked to a poorer response regarding less joint swelling at 3 months [33]. Supporting the biologic role of these SNP variants with inflammatory physiopathological pathways in autoimmune diseases, the CC genotype has shown an association with higher RCP levels in female diabetic patients. Interestingly, these changes were independent of IL-6 serum levels and were not observed in healthy individuals [45]. However, the study by Maldonado-Montoro et al. and the findings reported by Luxembourger et al. did not suggest that rs4329505 could predict responses to TCZ [31,34]. Overall, data supporting the role of rs4329505 genetic polymorphisms in the response to treatment with TCZ in RA patients are scarce and inconsistent, even though our findings seem to indicate a trend worth investigating in future studies.

We did not find any associations between rs12083537, rs2228145, and rs4537545 genetic variants and the response to treatment outcomes. Diverse and conflicting results have been reported concerning the rs12083537 AA genotype. This variant was initially associated with a worse response when considering swollen joint count individually and when analyzed as a haplotype along with rs2228145 and rs4329505 variants [33]. In contrast, Maldonado-Montoro et al. and Luxembourger et al. reported improved responses to TCZ in the rs12083537 AA genotype when analyzing LDA at 12 months and EULAR response rates at 6 months, respectively [31,34]. These conflicting data contrast with the absence of associations in our study. Apart from the study by Enevold et al., there were no further reports of associations between rs2228145 and the response to TCZ in RA [33]. In contrast, possible physiopathological mechanisms of rs2228145 have been reproduced, suggesting a regulation of IL-6 bioactivity via the downregulation of cellular IL-6R [46,47].

Among the published studies about TCZ pharmacogenetics, we found only one study that followed a genome-wide association studies (GWAS) approach, which could be useful for avoiding missing potential biomarkers. However, none of the eight loci encountered clearly seemed to be involved in the physiopathology of RA or IL-6 pathways [35]. The inconsistent findings between studies and the lack of a robust biological basis on the most frequently reported SNP highlight the complexity of immune pathways in RA and the factors that modulate responses to TCZ.

The limitations of this study should be considered when interpreting results. First, the retrospective design and the relatively small sample size may have compromised potential associations between SNPs and response to TCZ. In particular, rs11265618 and rs4329505 homozygosity for the mutated allele is expected to be low, as mutated allele frequencies are 0.03 and 0.04. Nonetheless, the homogeneity of our cohort supports the validity of our findings. Second, as the present study was designed to study promising *IL6R* SNPs, we may not have detected other genetic variants as potential predictors to TCZ treatments.

Further research in the pharmacogenomics of RA treatment is needed to establish robust evidence with clinical relevance that could lead to personalized medicine. In addition, further studies are needed to investigate the potential use of rs4845625 as a treatment biomarker of TCZ.

## 5. Conclusions

Our results suggest that the *IL6R* polymorphism, rs4845625, is associated with DAS28 improvements, EULAR response rates, and an LDA at 6 months after initiating TCZ in RA patients.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.S., P.R., P.M., S.B., C.D.-T., A.L. and H.C.; methodology, L.S., P.R., P.M., S.B., H.S.P., A.L. and H.C.; validation, P.R., P.M., S.B., A.L., J.C. and H.C.; investigation, L.S. and P.R.; resources, S.B. and A.L.; writing—original draft preparation, L.S. and P.R.; writing—review and editing, P.M., S.B., J.C., H.C., C.D.-T., A.L., A.M.M., H.S.P., A.L. and H.C.; visualization, L.S. and P.R.; supervision, P.M., S.B., A.L., H.C. and J.C.; project administration, L.S. and P.R.; funding acquisition, L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was supported in part by Beca STADA 2020-2021, given by “Societat Catalana de Reumatologia”.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of “Hospital de la Santa Creu I Sant Pau” (IIBSP-IIL-2020-148; 1 March 2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all patients involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the inclusion of clinical and personal information.

**Acknowledgments:** We thank Carolyn Newey for language editing. We thank Ivan Castellví, Lidia González-Quereda, Berta Magallares, Ana Laiz, Helena Codes, and David Lobo Prat for their revisions on the final work. We thank Ignasi Gich for statistical analysis. We thank Meritxell Cros for helping in the genotyping process.

**Conflicts of Interest:** Pau Riera received a travel grant from Roche. H.C. has received grants for research and attendance at conferences from Grünenthal, MSD, Biogen, Galapagos, Roche, BMS, and honorarium for advisory boards from Galapagos, Gebro, Abbvie, Sanofi, and UCB. The other authors declare no conflict of interest.

## References

1. Cross, M.; Smith, E.; Hoy, D.; Carmona, L.; Wolfe, F.; Vos, T.; Williams, B.; Gabriel, S.; Lassere, M.; Johns, N.; et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1316–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Seoane-Mato, D.; Sánchez-Piedra, C.; Silva-Fernández, L.; Sivera, F.; Blanco, F.J.; Ruiz, F.P.; Juan-Mas, A.; Pego-Reigosa, J.M.; Narváez, J.; Martí, N.Q.; et al. Prevalence of rheumatic diseases in adult population in Spain (EPISER 2016 study): Aims and methodology. *Reumatol. Clin.* **2019**, *15*, 90–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. McInnes, I.B.; Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2205–2219. [[CrossRef](#)]
4. Rodríguez-Valverde, V.; Cáliz, R.C.; Álvaro, J.M.-G.; de la Fuente, J.L.M.; Mendoza, J.M.; Molina, J.T.; Sánchez, J.A.; García, F.B.; Gualda, E.B.; Crespillo, J.C.; et al. III Actualización del Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre terapia biológica en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* **2006**, *2*, S52–S59. [[CrossRef](#)]
5. Goekoop-Ruiterman, Y.P.; De Vries-Bouwstra, J.K.; Allaart, C.F.; Van Zeben, D.; Kerstens, P.J.; Hazes, J.M.W.; Zwinderman, A.H.; Peeters, A.J.; De Jonge-Bok, J.M.; Malleé, C.; et al. Comparison of treatment strategies in early rheumatoid arthritis: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *146*, 406–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Saunders, S.A.; Capell, H.A.; Stirling, A.; Vallance, R.; Kincaid, W.; McMahon, A.D.; Porter, D.R. Triple therapy in early active rheumatoid arthritis: A randomized, single-blind, controlled trial comparing step-up and parallel treatment strategies. *Arthritis Care Res.* **2008**, *58*, 1310–1317. [[CrossRef](#)]
7. Möttönen, T.; Hannonen, P.; Korpela, M.; Nissilä, M.; Kautiainen, H.; Ilonen, J.; Laasonen, L.; Kaipiainen-Seppänen, O.; Franzen, P.; Helve, T.; et al. Delay to Institution of Therapy and Induction of Remission Using Single-Drug or Combination-Disease-Modifying Antirheumatic Drug Therapy in Early Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Care Res.* **2002**, *46*, 894–898. [[CrossRef](#)]
8. Verstappen, S.M.M.; Jacobs, J.W.G.; van der Veen, M.J.; Heurkens, A.H.M.; Schenk, Y.; ter Borg, E.J.; Blaauw, A.A.M.; Bijlsma, J.W.J. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 1443–1449. [[CrossRef](#)]
9. Grigor, C.; Capell, H.; Stirling, A.; McMahon, A.D.; Lock, P.; Vallance, R.; Porter, D.; Kincaid, W. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): A single-blind randomised controlled trial. *Lancet* **2004**, *364*, 263–269. [[CrossRef](#)]
10. Smolen, J.S.; Landewé, R.B.M.; Bijlsma, J.W.J.; Burmester, G.R.; Dougados, M.; Kerschbaumer, A.; McInnes, I.B.; Sepriano, A.; van Vollenhoven, R.F.; de Wit, M.; et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* **2020**, *79*, 685–699. [[CrossRef](#)]
11. Pers, Y.-M.; Fortunet, C.; Constant, E.; Lambert, J.; Godfrin-Valnet, M.; De Jong, A.; Mercier, G.; Prades, B.P.; Wendling, D.; Gaudin, P.; et al. Predictors of response and remission in a large cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab in clinical practice. *Rheumatology* **2013**, *53*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tarnowski, M.; Paradowska-Gorycka, A.; Dąbrowska-Zamojcin, E.; Czerewaty, M.; Śluczankowska-Głąbowska, S.; Pawlik, A. The effect of gene polymorphisms on patient responses to rheumatoid arthritis therapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *12*, 41–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Narváez, J.; Magallares, B.; Torné, C.D.; Hernández, M.V.; Reina, D.; Corominas, H.; Sanmartí, R.; Llobet, J.M.; de la Serna, A.R.; Nolla, J.M. Predictive factors for induction of remission in patients with active rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in clinical practice. *Semin. Arthritis Rheum.* **2015**, *45*, 386–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

14. Cao, M.; Guo, M.; Wu, D.-Q.; Meng, L. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 1182–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Salazar, J.; Moya, P.; Altés, A.; Díaz-Torné, C.; Casademont, J.; Cerdà-Gabaro, D.; Corominas, H.; Baiget, M. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: Are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics* **2014**, *15*, 1079–1090. [[CrossRef](#)]
16. Moya, P.; Salazar, J.; Arranz, M.J.; Díaz-Torné, C.; del Río, E.; Casademont, J.; Corominas, H.; Baiget, M. Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 25–29. [[CrossRef](#)]
17. Jekic, B.; Maksimovic, N.; Damjanovic, T.; Biljana, J.; Nela, M.; Tatjana, D. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* **2019**, *20*, 1235–1245. [[CrossRef](#)]
18. Márquez, A.; Ferreiro-Iglesias, A.; Dávila-Fajardo, C.L.; Montes, A.; Pascual-Salcedo, D.; Perez-Pampin, E.; Moreno-Ramos, M.J.; García-Portales, R.; Navarro, F.; Moreira, V.; et al. Lack of validation of genetic variants associated with anti-tumor necrosis factor therapy response in rheumatoid arthritis: A genome-wide association study replication and meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, R66. [[CrossRef](#)]
19. Sode, J.; Vogel, U.; Bank, S.; Andersen, P.S.; Hetland, M.L.; Loch, H.; Heegaard, N.H.H.; Andersen, V. Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated with Anti-TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139781. [[CrossRef](#)]
20. Bek, S.; Bojesen, A.B.; Nielsen, J.V.; Sode, J.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, V. Systematic review and meta-analysis: Pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Pharm. J.* **2017**, *17*, 403–411. [[CrossRef](#)]
21. Wysocki, T.; Paradowska-Gorycka, A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Montes, A.; Perez-Pampin, E.; Joven, B.; Carreira, P.; Fernández-Nebro, A.; Ordóñez, M.D.C.; Navarro-Sarabia, F.; Moreira, V.; Vasilopoulos, Y.; Sarafidou, T.; et al. FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics* **2015**, *16*, 333–345. [[CrossRef](#)]
23. Chen, W.; Xu, H.; Wang, X.; Gu, J.; Xiong, H.; Shi, Y. The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Canet, L.M.; Filipescu, I.; Cáliz, R.; Lupiáñez, C.B.; Canhão, H.; Escudero, A.; Segura-Catena, J.; Soto-Pino, M.J.; Ferrer, M.A.; García, A.; et al. Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: A multicenter study. *Pharm. Genom.* **2015**, *25*, 323–333. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Iking-Konert, C.; Von Hinüber, U.; Richter, C.; Schwenke, H.; Gürtler, I.; Kästner, P.; Klapperich, B.; Peters, A.M.; Burmester, G.-R. ROUTINE—a prospective, multicentre, non-interventional, observational study to evaluate the safety and effectiveness of intravenous tocilizumab for the treatment of active rheumatoid arthritis in daily practice in Germany Rheumatology key messages. *Rheumatology* **2015**, *55*, 624–635. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Forsblad-D’Elia, H.; Bengtsson, K.; Kristensen, L.E.; Jacobsson, L.T.H. Drug adherence, response and predictors thereof for tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: Results from the Swedish biologics register. *Rheumatology* **2014**, *54*, 1186–1193. [[CrossRef](#)]
27. Backhaus, M.; Kaufmann, J.; Richter, C.; Wassenberg, S.; Roske, A.-E.; Hellmann, P.; Gaubitz, M. Comparison of tocilizumab and tumour necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: A retrospective analysis of 1603 patients managed in routine clinical practice. *Clin. Rheumatol.* **2015**, *34*, 673–681. [[CrossRef](#)]
28. Scott, L.J. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs* **2017**, *77*, 1865–1879. [[CrossRef](#)]
29. Gabay, C.; Emery, P.; van Vollenhoven, R.; Dikranian, A.; Alten, R.; Pavelka, K.; Klearman, M.; Musselman, D.; Agarwal, S.; Green, J.; et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): A randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet* **2013**, *381*, 1541–1550. [[CrossRef](#)]
30. Jones, G.; Wallace, T.; McIntosh, M.J.; Brockwell, L.; Gómez-Reino, J.J.; Sebba, A. Five-year Efficacy and Safety of Tocilizumab Monotherapy in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Were Methotrexate- and Biologic-naive or Free of Methotrexate for 6 Months: The AMBITION Study. *J. Rheumatol.* **2016**, *44*, 142–146. [[CrossRef](#)]
31. Maldonado-Montoro, M.; Cañadas-Garre, M.; González-Utrilla, A.; Calleja-Hernández, M. Influence of IL6R gene polymorphisms in the effectiveness to treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharm. J.* **2016**, *18*, 167–172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Maldonado-Montoro, M.; Cañadas-Garre, M.; González-Utrilla, A.; Plaza-Plaza, J.C.; Calleja-Hernández, M. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 264–271. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Enevold, C.; Baslund, B.; Linde, L.; Josephsen, N.L.; Tarp, U.; Lindegaard, H.; Jacobsen, S.; Nielsen, C.H. Interleukin-6-receptor polymorphisms rs12083537, rs2228145, and rs4329505 as predictors of response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharm. Genom.* **2014**, *24*, 401–405. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Luxembourger, C.; Ruyssen-Witrand, A.; Ladhari, C.; Rittore, C.; Degboe, Y.; Maillefert, J.-F.; Gaudin, P.; Marotte, H.; Wendling, D.; Jorgensen, C.; et al. A single nucleotide polymorphism of IL6-receptor is associated with response to tocilizumab in rheumatoid arthritis patients. *Pharm. J.* **2019**, *19*, 368–374. [[CrossRef](#)]

35. Wang, J.; Bansal, A.T.; Martin, M.A.; Germer, S.; Benayed, R.; Essioux, L.; Lee, J.S.; Begovich, A.B.; Hemmings, A.; Kenwright, A.; et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharm. J.* **2012**, *13*, 235–241. [[CrossRef](#)]
36. van Gestel, A.M.; Anderson, J.J.; van Riel, P.L.; Boers, M.; Haagsma, C.J.; Rich, B.; Wells, G.; Lange, M.L.; Felson, D.T. ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. American College of Rheumatology European League of Associations for Rheumatology. *J. Rheumatol.* **1999**, *26*, 705–711.
37. Aletaha, D.; Ward, M.M.; Machold, K.; Nell, V.P.K.; Stamm, T.; Smolen, J.S. Remission and active disease in rheumatoid arthritis: Defining criteria for disease activity states. *Arthritis Care Res.* **2005**, *52*, 2625–2636. [[CrossRef](#)]
38. Arguinano, A.A.; Naderi, E.; Ndiaye, N.C.; Stathopoulou, M.; Dadé, S.; Alizadeh, B.; Visvikis-Siest, S. IL6R haplotype rs4845625\*T/rs4537545\*C is a risk factor for simultaneously high CRP, LDL and ApoB levels. *Genes Immun.* **2017**, *18*, 163–169. [[CrossRef](#)]
39. Phan, L.; Jin, Y.; Zhang, H.; Qiang, W.; Shekhtman, E.; Shao, D.; Revoe, D.; Villamarin, R.; Ivanchenko, E.; Kimura, M.; et al. 'ALFA: Allele Frequency Aggregator.' National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Available online: [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/) (accessed on 10 March 2020).
40. Shah, T.; Zabaneh, D.; Gaunt, T.; Swerdlow, D.; Shah, S.; Talmud, P.; Day, I.N.; Whittaker, J.; Holmes, M.V.; Sofat, R.; et al. Gene-Centric Analysis Identifies Variants Associated with Interleukin-6 Levels and Shared Pathways with Other Inflammation Markers. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **2013**, *6*, 163–170. [[CrossRef](#)]
41. Webb, T.R.; Erdmann, J.; Stirrups, K.E.; Stitzel, N.O.; Masca, N.G.D.; Jansen, H.; Kanoni, S.; Nelson, C.P.; Ferrario, P.G.; König, I.R.; et al. Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated With Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **2017**, *69*, 823–836. [[CrossRef](#)]
42. Wu, G.; Cheng, M.; Huang, H.; Yang, B.; Jiang, H.; Huang, C. A Variant of IL6R Is Associated with the Recurrence of Atrial Fibrillation after Catheter Ablation in a Chinese Han Population. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99623. [[CrossRef](#)]
43. Deloukas, P.; Kanoni, S.; Willenborg, C.; Farrall, M.; Assimes, T.L.; Thompson, J.R.; Ingelsson, E.; Saleheen, D.; Erdmann, J.; Goldstein, B.A.; et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 25–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Svensson, T.; Kitlinski, M.; Engström, G.; Melander, O. A genetic risk score for CAD, psychological stress, and their interaction as predictors of CAD, fatal MI, non-fatal MI and cardiovascular death. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0176029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Qi, L.; Rifai, N.; Hu, F.B. Interleukin-6 Receptor Gene, Plasma C-Reactive Protein, and Diabetes Risk in Women. *Diabetes* **2009**, *58*, 275–278. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ferreira, R.C.; Freitag, D.F.; Cutler, A.; Howson, J.; Rainbow, D.B.; Smyth, D.; Kaptoge, S.; Clarke, P.; Boreham, C.; Coulson, R.M.; et al. Functional IL6R 358A1a Allele Impairs Classical IL-6 Receptor Signaling and Influences Risk of Diverse Inflammatory Diseases. *PLoS Genet.* **2013**, *9*, e1003444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Reich, D.; Patterson, N.; Ramesh, V.; De Jager, P.L.; McDonald, G.J.; Tandon, A.; Choy, E.; Hu, D.; Tamraz, B.; Pawlikowska, L.; et al. Admixture Mapping of an Allele Affecting Interleukin 6 Soluble Receptor and Interleukin 6 Levels. *Am. J. Hum. Genet.* **2007**, *80*, 716–726. [[CrossRef](#)]





## 4.2. Article 2

Sainz L, Riera P, Moya P, Bernal S, Casademont J, Díaz-Torné C, Millán AM, Sang-Park H, Lasa A, Corominas H. Clinical Value of IL6R Gene Variants as Predictive Biomarkers for Toxicity to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Journal of Personalized Medicine*. 2022 Dec 28;13(1):61. doi:10.3390/jpm13010061

## Article

# Clinical Value of *IL6R* Gene Variants as Predictive Biomarkers for Toxicity to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis

Luis Sainz <sup>1,2,3,†</sup> , Pau Riera <sup>3,4,5,\*,†</sup> , Patricia Moya <sup>1,3</sup> , Sara Bernal <sup>3,5,6</sup> , Jordi Casademont <sup>2,3,7</sup> , Cesar Díaz-Torné <sup>1,2,3</sup>, Ana Milena Millán <sup>1,3</sup>, Hye Sang Park <sup>1,3</sup>, Adriana Lasa <sup>3,5,6</sup>  and Héctor Corominas <sup>1,2,3,\*</sup> 

<sup>1</sup> Rheumatology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), 08041 Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08041 Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB SANT PAU), 08041 Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Pharmacy Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), 08025 Barcelona, Spain

<sup>5</sup> CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain

<sup>6</sup> Genetics Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), 08025 Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Medicine Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (HSCSP), 08025 Barcelona, Spain

\* Correspondence: priera@santpau.cat (P.R.); hcorominas@santpau.cat (H.C.)

† These authors contributed equally to this work.

**Abstract:** Tocilizumab is a first-line biologic disease-modifying anti-rheumatic drug (bDMARD) that inhibits the interleukin-6 (IL-6) pathway by antagonizing the IL-6 receptor (IL-6R). Tocilizumab is widely used to treat rheumatoid arthritis (RA), a prevalent autoimmune disease that can cause irreversible joint damage and disability. Although many bDMARDs have been developed for RA, there is a lack of validated biomarkers which could guide personalized medicine strategies. To evaluate whether single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *IL6R* gene could predict tocilizumab toxicity in patients with RA, we conducted a retrospective cohort study of 88 patients treated with tocilizumab. Six SNPs previously described in the *IL6R* gene were genotyped (rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545, and rs4845625). Using parametric tests, we studied the association between the SNPs and hepatotoxicity, infection, hypersensitivity, gastrointestinal, hematological, and dyslipidemia adverse events (AEs). We found associations between dyslipidemia and rs4845625 and between hematological AEs and rs11265618 and rs4329505. No further associations were found for the remaining SNPs and other AEs. Our findings support the potential clinical value of SNPs in the *IL6R* gene as predictive biomarkers for toxicity to tocilizumab in patients with RA.

**Keywords:** *IL6R*; genetic variants; tocilizumab; toxicity; rheumatoid arthritis; predictive biomarkers



**Citation:** Sainz, L.; Riera, P.; Moya, P.; Bernal, S.; Casademont, J.; Díaz-Torné, C.; Millán, A.M.; Park, H.S.; Lasa, A.; Corominas, H. Clinical Value of *IL6R* Gene Variants as Predictive Biomarkers for Toxicity to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *J. Pers. Med.* **2023**, *13*, 61. <https://doi.org/10.3390/jpm13010061>

Academic Editors: Luis Andrés López-Fernández, Sara Salvador-Martín and Matea Zajc Petranović

Received: 5 December 2022

Revised: 22 December 2022

Accepted: 23 December 2022

Published: 28 December 2022



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is the most frequent autoimmune inflammatory disease worldwide, with an overall prevalence of 0.2–1% [1,2]. It is characterized by synovial inflammation, hyperplasia, and the progressive destruction of bone and cartilage in multiple joints [3], which, without appropriate treatment, may lead to progressive disability, systemic complications, and reduced life expectancy [4]. The current therapeutic strategy, consisting of early treatment based on a treat-to-target approach, aims to achieve remission or low disease activity and ultimately prevent structural damage [5–10].

At present, there is lack of evidence to recommend the treatment of one biologic disease-modifying anti-rheumatic drug (bDMARD) over another, as there are no validated biomarkers that predict response or toxicity to bDMARDs. Consequently, treatment selection is a trial-and-error process, and this can delay the identification of the most effective and well-tolerated treatment for a patient, which, in turn, may lead to disease progression and/or a poorer quality of life [11–13]. Although there is growing interest in the role of genetic markers as predictors of response/toxicity to biological drugs, most studies

published to date have focused on methotrexate [14–17] and anti-tumor necrosis factor (anti-TNF) treatments [18–24].

Tocilizumab is a first-line bDMARD that competitively binds to both the membrane-bound and soluble forms of human interleukin-6 receptor (IL-6R), thereafter inhibiting the interleukin-6 (IL-6) pathway. It is an effective treatment for patients with moderate to severe RA, with reported response rates of 62–80% [13,25–27]. Despite being generally well-tolerated, approximately 80% of tocilizumab-treated patients experience adverse events (AEs) [28], most frequently infections, followed by gastrointestinal disorders. Although AEs are mainly mild or moderate, in 4% of patients, they are severe. To date, no biomarkers or predictors of toxicity have been identified.

Given that tocilizumab inhibits IL-6R, we hypothesized that functional variations in its encoding gene could affect tocilizumab toxicity. While previous studies have assessed the influence of *IL6R* gene variants on tocilizumab response, the results are inconsistent and not applicable to clinical practice [28–33]. As for toxicity, no studies to date have evaluated the influence of *IL6R* gene variants on tocilizumab-induced toxicities. The aim of this study was to assess whether genetic variants in the *IL6R* gene are associated with tocilizumab toxicity in patients with RA.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Population

We conducted a single-center retrospective cohort study including RA patients recruited in a tertiary referral hospital. The potential patients were identified using pharmacy registries in which we filtered for the patients who underwent tocilizumab treatment between January 2016 and January 2021.

We applied the following inclusion criteria: RA diagnosed according to the criteria of the American College of Rheumatology (ACR)/European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 [34], prescription of tocilizumab for RA, and age over 18 years old. The exclusion criteria were other rheumatic diagnoses such as connective tissue diseases or vasculitis and loss of patient follow-up.

Sociodemographic and clinical data collected from electronic medical records were as follows: age, gender, age at diagnosis, previous treatments, comorbidities, body mass index, tocilizumab starting date, dose, and administration route, concomitant treatments, rheumatoid factor (RF), anti-citrullinated protein antibody (ACPA), reason for tocilizumab discontinuation, and AEs.

AEs were classified in the following groups: hepatotoxicity, infections, hypersensitivity, gastrointestinal, hematological, and dyslipidemia. For hepatotoxicity, hematological, and dyslipidemia AEs, periodic blood tests were revised retrospectively and, when an AE occurred, numeric values for bilirubinemia, transaminases, leukocytes and neutrophils, platelets, and lipids (total cholesterol, low-density lipoprotein (LDL), and triglycerides) were recorded. AEs were graded as mild (grade 1), moderate (grade 2), severe (grade 3), life-threatening (grade 4), and death (grade 5), in accordance with the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAEs) v6.0 [35].

Patients who discontinued tocilizumab without relation to AEs, death, or external causes were classified in the primary failure group, when discontinued in the first 6 months of treatment, and in the secondary failure group, when discontinued after a period of efficacy (>6 months).

The study was approved by the corresponding institutional ethics committees and registered at [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov) (protocol code: IIBSP-IIL-2020-148). All the participants gave written informed consent for blood sampling and genetic analyses.

### 2.2. Genetic Studies

Considering published data and bearing in mind single-nucleotide polymorphisms' (SNPs') functionality in the *IL6R*, we selected SNPs as follows: rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545, and rs4845625 (Table 1). The rationale for selecting these

SNPs has been described in previous studies [28–31,36]. All the SNPs presented a minor allele frequency (MAF) over 0.10 in the European population according to the Allele Frequency Aggregator (ALFA) [37].

**Table 1.** Selected functional polymorphisms in the *IL6R* gene.

Genetic Variant	Genomic Position (GRCh38)	MAF	Alleles
rs12083537	chr1:154408627	0.21	A> <b>G</b>
rs11265618	chr1:154457616	0.17	C> <b>T</b>
rs4329505	chr1:154459944	0.17	T> <b>C</b>
rs2228145	chr1:154454494	0.40	A> <b>C</b>
rs4537545	chr1:154446403	0.41	C> <b>T</b>
rs4845625	chr1:154449591	0.43	T> <b>C</b>

Abbreviations: *IL6R*, interleukin-6 receptor. MAF, minor allele frequency reported in the European population. The minor allele is highlighted in bold.

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples (Autopure, Qiagen, Hilden, Germany). The SNPs were analyzed via real-time polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan SNP genotyping assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the cases were successfully genotyped.

### 2.3. Statistical Analysis

Hardy–Weinberg equilibrium was assessed for each analyzed SNP using the chi-square test ( $\chi^2$ ). Codominant, dominant, and recessive models of inheritance were considered to assess associations with outcome variables whenever appropriate.

Quantitative data were expressed as mean ( $\pm$  SD) for normally distributed variables. Normality was assessed using the Shapiro–Wilks test. Depending on the number of groups compared, the Student's *t*-test or ANOVA were used for normally distributed variables. Bivariate association between qualitative dichotomous variables was assessed using  $\chi^2$  or Fisher's exact test. The associations between SNPs and qualitative response variables were tested using the  $\chi^2$  test.

All the tests were two-sided, significance was set to 5% ( $\alpha = 0.05$ ), and statistical analyses were performed using IBM-SPSS (IBM Corp. Released 2019. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0. Armonk, NY, USA: IBM Corp).

## 3. Results

### 3.1. Patient Characteristics

Table 2 summarizes the baseline demographic and clinical characteristics for the 88 patients that were included in the study. The mean disease duration on tocilizumab initiation was 16.5 (SD 11.9) years, and treatment survival was 45.91 (SD 40.1) months. Just over a third of patients (35.2%,  $n = 31$ ) were in active treatment at the end of data collection. The primary reason for tocilizumab discontinuation was AEs, followed closely by secondary and primary failure of treatment.

### 3.2. Adverse Events

Table 3 summarizes the frequency and severity of detected AEs, showing that hematological and dyslipidemia AEs were the most frequent. Most hematological AEs were mild and only required observation ( $n = 16$ ) or dose reduction ( $n = 9$ ). Neutropenia was the most common toxicity, with a median value of  $1.17$  (SD  $0.03$ )  $\times 10^9$ /L; however, there were no severe cases, and tocilizumab was discontinued in only two patients. When thrombocytopenia occurred, the median value of platelets was  $108.5$  (SD  $11.5$ )  $\times 10^9$ /L. As for dyslipidemia, the mean values of lipid values were as follows: total cholesterol,  $284.5$  (SD  $42.0$ ) mg/dL; LDL,  $180.2$  (SD  $55.7$ ) mg/dL; and triglycerides,  $215.3$  (SD  $144.5$ ) mg/dL. Regarding dys-

lipidemia management, 15 patients were initiated on hypolipemiant treatment during tocilizumab treatment.

**Table 2.** Patient baseline characteristics (*n* = 88).

Variables	<i>n</i> (%)	Mean (SD)
Female/male	76 (86.4) / 12 (13.6)	
Age on diagnosis (years)		46.6 (15.9)
Disease duration (years)		16.5 (11.9)
RF positive	58 (65.9)	
ACPA positive	57 (64.8)	
Body mass index		28.6 (6.1)
Number of previous cDMARDs		2.4 (1.3)
Number of previous bDMARDs		1.5 (1.4)
Tocilizumab administration (intravenous)	47 (53.4)	
Treatment survival (months)		45.91 (40.1)
Reasons for discontinuation ( <i>n</i> =57)		
Primary failure	14 (15.9)	
Secondary failure	16 (18.2)	
AE	19 (21.6)	
Unrelated death	1 (1.1)	
Other	7 (8.0)	

Abbreviations: ACPA, anti-citrullinated protein antibodies; AE, adverse event; bDMARD, biological disease-modifying anti-rheumatic drug; cDMARD, conventional disease-modifying anti-rheumatic drug; RF, rheumatoid factor; SD, standard deviation.

**Table 3.** Reported adverse events (*n* = 88).

Variables	<i>n</i> (%)	Mild <i>n</i> (%)	Moderate <i>n</i> (%)	Severe <i>n</i> (%)
Hepatotoxicity	20 (22.7)	13 (14.7)	7 (7.9)	0
Hyperbilirubinemia	7 (7.9)			
Hypertransaminasemia	13 (14.7)			
Treatment discontinuation	5 (5.7)			
Infections	18 (20.5)	9 (10.2)	6 (6.8)	3 (3.4)
Tocilizumab discontinuation	1			
Hypersensitivity	7 (7.9)	0	7 (7.9)	0
Tocilizumab discontinuation	7			
Gastrointestinal	3 (3.4)	1 (1.1)	2 (2.3)	0
Tocilizumab discontinuation	0			
Hematological	27 (30.7)	19 (21.6)	8 (9.1)	0
Neutropenia	23 (26.1)			
Thrombocytopenia	6 (6.8)			
Tocilizumab discontinuation	2 (2.3)			
Dyslipidemia	27 (30.7)			
Statin initiation	15 (17)			

The third most frequent AE was hepatotoxicity, with more cases of hypertransaminasemia (mean aspartate aminotransferase (AST), 62.7 (SD 21.2) IU/L and alanine aminotransferase (ALT), 92.1 (SD 42.2) IU/L) than of hyperbilirubinemia (mean bilirubin, 24.9 (SD 14.4) μmol/L). Only seven hepatotoxicity AEs were graded as moderate; four of those cases developed during concomitant methotrexate treatment and were managed effectively with methotrexate dose reduction.

The most severe AEs were infections, with three patients requiring hospitalization; all the cases were managed with temporary tocilizumab suspension. All seven patients showing hypersensitivity to tocilizumab were managed with permanent discontinuation.

### 3.3. Genetic Determinants and Adverse Events

The genotypic frequencies of the six studied SNPs did not significantly deviate from the expected Hardy–Weinberg equilibrium. The mutated allele (C) of the SNP rs4845625 was more frequent than the wild-type (T) allele, as expected from allele frequency population-based studies [37].

In the univariate analysis, three SNPs (rs4845625, rs1126518, and rs432955) showed statistically significant associations with hepatotoxicity, hematological, and dyslipidemia AEs (Table 4). The CC carriers for rs4845625 developed dyslipidemia less frequently (16.7%) than the patients carrying the T allele (TT + CT) (36.7%) ( $p = 0.04$ ). Considering a codominant model for rs4845625 and hepatotoxicity, statistically significant differences were found between the three genotypes ( $p = 0.048$ ). Patients carrying the CC genotype for rs1126518 showed a higher rate of hematological AEs compared to T carriers (CT + TT) (36.7% vs. 14.3%,  $p = 0.032$ ). Comparably, the TT genotype for rs4329505 also demonstrated more hematological AEs than C carriers (CT + CC) (36.1% vs. 14.8%,  $p = 0.044$ ).

**Table 4.** Associations between rs4845625, rs1126518, and rs4329505 and hepatotoxicity, hematological, and dyslipidemia AEs.

SNPs	Genotype (n)	Hepatotoxicity AEs			Hematological AEs			Dyslipidemia AEs					
		%	Genetic Model	OR (95% CI)	p	%	Genetic Model	OR (95% CI)	p	%	Genetic Model	OR (95% CI)	p
rs4845625	T/T (13)	7.7	Cod	-	0.048	38.5	Cod	-	0.712	23.1	Cod	-	0.051
	C/T (45)	33.3	Dom	4.07 (0.49–33.42)	0.161	26.7	Rec	1.03 (0.39–2.71)	0.946	42.2	Rec	3.05 (1.02–9.17)	0.04
	C/C (30)	13.3				30				16.7			
rs1126518	C/C (60)	16	Cod	-	0.603	36.7	Cod	-	0.075	33.3	Cod	-	0.447
	C/T (25)	25	Dom	0.65 (0.21–2.02)	0.456	12	Dom	3.47 (1.07–11.36)	0.032	28	Dom	0.67 (0.24–1.83)	0.43
	T/T (3)	33.3				33.3				0			
rs4329505	T/T (61)	24.6	Cod	-	0.665	36.1	Cod	-	0.099	32.8	Cod	-	0.388
	C/T (24)	16.7	Dom	0.69 (0.23–2.16)	0.531	12.5	Dom	3.25 (1–10.64)	0.044	29.2	Dom	0.72 (0.26–1.98)	0.52
	C/C (3)	33				33.3				0			

Abbreviations: Cod: codominant; Dom: dominant; OR: odds ratio; Rec: recessive; SNP: single-nucleotide polymorphism.

Further statistically significant associations were not found, either for the remaining AEs detected during tocilizumab treatment or for the remaining SNPs (rs12083537, rs2228145, and rs4537545).

### 4. Discussion

We assessed associations between six SNPs in the IL6R gene and AEs during tocilizumab treatment in 88 patients with RA. We found an association between rs4845625 and dyslipidemia rates and associations between rs1126518 and rs4329505 and hematological AEs.

Previous studies focused on UGT1A1 polymorphisms and hyperbilirubinemia have reported results for Japanese patients with RA [38,39]. However, this is the first study demonstrating that SNPs in the IL6R gene may influence the development of AEs during long-term treatment with tocilizumab in patients with RA.

Our results regarding rs4845625 show that carriers of the T allele (TT + TC) had a higher incidence of dyslipidemia compared to CC carriers (36.7% vs. 16.7%) when treated with tocilizumab. A recent study of patients with RA by our group also described a greater response to tocilizumab treatment at six months in carriers of the TT or CT genotypes for rs4845625 [33]. Additionally, in line with our results, in 2017, Arguinano et al. described an association between rs4845625\*T and high levels of LDL in a healthy cohort, suggesting that IL6R genetic variations may constitute a cardiovascular risk factor [36]. Although it seems that genotypes associated with better efficacy outcomes are also related to greater rates of dyslipidemia, this should not be problematic from a treatment biomarker perspective, given that dyslipidemia secondary to tocilizumab treatment has not been linked to cardiovascular events [40–45]. In fact, the association between the inflammatory burden in RA with changes in the lipid profile and cardiovascular risk has been described



as the “lipid paradox”, as lower cholesterol is associated with higher cardiovascular risk in RA untreated patients [46]. Although the mechanism underlying tocilizumab effects on the lipid profile is unclear, it has been demonstrated that, in a proinflammatory state with the activation of IL-6 pathways, there is a lowering of serum lipids mediated by the modification of apolipoprotein synthesis [47] as well as IL-6 local effects on fat tissue and muscle [44]. It has also been hypothesized that tocilizumab treatment raises lipid levels by reversing the lowering of lipid levels induced by IL-6-mediated inflammation [47,48]. Another suggested explanation is that dyslipidemia is mediated by the direct effect of IL-6 levels, raised through the blockage of IL-6R on administering tocilizumab [44].

We also observed an increase in compounding hematological AEs for the CC genotype for rs11265618 and for the TT genotype for rs4329505. In previous research, these genotypes have been described as potential biomarkers to guide tocilizumab treatment in RA cohorts. CC carriers of rs11265618 showed improved low disease activity rates at 12 months [28], while TT carriers of rs4329505 showed less joint swelling at three months [30]. Although we found similar trends relating to the same genotypes with efficacy outcomes at six months in our previous study, the results were not statistically significant [33].

We found no association between the rs12083537, rs2228145, and rs4537545 genetic variants and AEs detected during tocilizumab treatment. The rs12083537 variant has previously been studied, with conflicting results; while Enevold et al. [30] found that carriers of the AA genotype presented a poorer response to tocilizumab treatment, other studies found the opposite [29,31], and a recent study found no association [33]. As for the *IL6R* SNP rs2228145, this has only been proposed as a biomarker of response to tocilizumab by Enevold et al. [30]. On the other hand, Arguinano et al. [36] have reported rs4537545\*C to be associated with higher LDL levels in a cohort of healthy patients, although only when considered as a haplotype with rs4845625\*T. In our research, we did not consider haplotypes, and we did not find increased dyslipidemia for the rs4537545 genetic variant.

The main limitation of this study is its retrospective design. The relatively high incidence of AEs reported is possibly explained by our exhaustive search for hepatic, hematologic, and lipid profile abnormalities in routine blood tests over long periods of tocilizumab treatment. This would also explain the predominance of mild AEs that did not require tocilizumab discontinuation. Although the homogeneity of our cohort and the relatively large sample size reinforce the validity of our results, further prospective studies are warranted before the implementation of our findings in clinical practice.

## 5. Conclusions

Our *IL6R* polymorphism results suggest that, during the treatment of patients with active RA with tocilizumab, rs4845625 is associated with the development of dyslipidemia, and rs11255618 and rs4329505 are associated with the development of hematological effects.

**Author Contributions:** Conceptualization, L.S., P.R., P.M., S.B., C.D.-T., A.L. and H.C.; methodology, L.S., P.R., P.M., S.B., H.S.P., A.L., and H.C.; validation, P.R., P.M., S.B., A.L., J.C., and H.C.; investigation, L.S. and P.R.; resources, S.B. and A.L.; writing—original draft preparation, L.S. and P.R.; writing—review and editing, P.M., S.B., J.C., C.D.-T., A.L., A.M.M., H.S.P., and H.C.; visualization, L.S. and P.R.; supervision, P.M., S.B., A.L., H.C. and J.C.; project administration, L.S. and P.R.; funding acquisition, L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This study has been funded by the Societat Catalana de Reumatologia (Beca STADA 2020–2021).

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of the Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (IIBSP-III-2020-148; 1 March 2021).

**Informed Consent Statement:** Informed consent was obtained from all patients involved in the study.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available upon request from the corresponding author. The data are not publicly available due to the inclusion of clinical and personal data.

**Acknowledgments:** We thank Ignasi Gich for statistical analysis, Meritxell Cros for assisting with the genotyping process, and Ailish Maher for language editing.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Seoane-Mato, D.; Sánchez-Piedra, C.; Silva-Fernández, L.; Sivera, F.; Blanco, F.J.; Ruiz, F.P.; Juan-Mas, A.; Pego-Reigosa, J.M.; Narváez, J.; Martí, N.Q.; et al. Prevalence of rheumatic diseases in adult population in Spain (EPISER 2016 study): Aims and methodology. *Reumatol. Clin.* **2015**, *15*, 90–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cross, M.; Smith, E.; Hoy, D.; Carmona, L.; Wolfe, F.; Vos, T.; Williams, B.; Gabriel, S.; Lassere, M.; Johns, N.; et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann. Rheum. Dis.* **2014**, *73*, 1316–1322. [[CrossRef](#)]
- McInnes, I.B.; Schett, G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *N. Engl. J. Med.* **2011**, *365*, 2205–2219. [[CrossRef](#)]
- Rodríguez-Valverde, V.; Cáliz, R.C.; Álvaro, J.M.-G.; de la Fuente, J.L.M.; Mendoza, J.M.; Molina, J.T.; Sánchez, J.A.; García, F.B.; Gualda, E.B.; Crespillo, J.C.; et al. III Actualización del Consenso de la Sociedad Española de Reumatología sobre terapia biológica en la artritis reumatoide. *Reumatol. Clin.* **2006**, *2* (Suppl. S2), S52–S59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Goekoop-Ruiterman, Y.P.; De Vries-Bouwstra, J.K.; Allaart, C.F.; Van Zeben, D.; Kerstens, P.J.; Hazes, J.M.W.; Zwinderman, A.H.; Peeters, A.J.; De Jonge-Bok, J.M.; Malleé, C.; et al. Comparison of Treatment Strategies in Early Rheumatoid Arthritis: A randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **2007**, *146*, 406–415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Saunders, S.A.; Capell, H.A.; Stirling, A.; Vallance, R.; Kincaid, W.; McMahon, A.D.; Porter, D.R. Triple therapy in early active rheumatoid arthritis: A randomized, single-blind, controlled trial comparing step-up and parallel treatment strategies. *Arthritis Rheum.* **2008**, *58*, 1310–1317. [[CrossRef](#)]
- Möttönen, T.; Hannonen, P.; Korpela, M.; Nissilä, M.; Kautiainen, H.; Ilonen, J.; Laasonen, L.; Kaipiainen-Seppänen, O.; Franzen, P.; Helve, T.; et al. Delay to institution of therapy and induction of remission using single-drug or combination-disease-modifying antirheumatic drug therapy in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **2002**, *46*, 894–898. [[CrossRef](#)]
- Verstappen, S.M.M.; Jacobs, J.W.G.; van der Veen, M.J.; Heurkens, A.H.M.; Schenk, Y.; ter Borg, E.J.; Blaauw, A.A.M.; Bijlsma, J.W.J.; on the behalf of the Utrecht Rheumatoid Arthritis Cohort study group Intensive treatment with methotrexate in early rheumatoid arthritis: Aiming for remission. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann. Rheum. Dis.* **2007**, *66*, 1443–1449. [[CrossRef](#)]
- Grigor, C.; Capell, H.; Stirling, A.; McMahon, A.D.; Lock, P.; Vallance, R.; Porter, D.; Kincaid, W. Effect of a treatment strategy of tight control for rheumatoid arthritis (the TICORA study): A single-blind randomised controlled trial. *Lancet* **2004**, *364*, 263–269. [[CrossRef](#)]
- Smolen, J.S.; Landewé, R.B.M.; Bijlsma, J.W.J.; Burmester, G.R.; Dougados, M.; Kerschbaumer, A.; McInnes, I.B.; Sepriano, A.; van Vollenhoven, R.F.; de Wit, M.; et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2019 update. *Ann. Rheum. Dis.* **2020**, *79*, 685–699. [[CrossRef](#)]
- Pers, Y.-M.; Fortunet, C.; Constant, E.; Lambert, J.; Godfrin-Valnet, M.; De Jong, A.; Mercier, G.; Prades, B.P.; Wendling, D.; Gaudin, P.; et al. Predictors of response and remission in a large cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab in clinical practice. *Rheumatology* **2013**, *53*, 76–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tarnowski, M.; Paradowska-Gorycka, A.; Dąbrowska-Zamojcin, E.; Czerewaty, M.; Śluczanaowska-Głabowska, S.; Pawlik, A. The effect of gene polymorphisms on patient responses to rheumatoid arthritis therapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2016**, *12*, 41–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Narváez, J.; Magallares, B.; Torné, C.D.; Hernández, M.V.; Reina, D.; Corominas, H.; Sanmartí, R.; Llobet, J.M.; de la Serna, A.R.; Nolla, J.M. Predictive factors for induction of remission in patients with active rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in clinical practice. *Semin. Arthritis Rheum.* **2016**, *45*, 386–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cao, M.; Guo, M.; Wu, D.-Q.; Meng, L. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook. *Curr. Drug Metab.* **2018**, *19*, 1182–1187. [[CrossRef](#)]
- Salazar, J.; Moya, P.; Altés, A.; Díaz-Torné, C.; Casademont, J.; Cerdà-Gabaro, D.; Corominas, H.; Baiget, M. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: Are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics* **2014**, *15*, 1079–1090. [[CrossRef](#)]
- Moya, P.; Salazar, J.; Arranz, M.J.; Díaz-Torné, C.; del Río, E.; Casademont, J.; Corominas, H.; Baiget, M. Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics* **2016**, *17*, 25–29. [[CrossRef](#)]
- Jekic, B.; Maksimovic, N.; Damjanovic, T.; Biljana, J.; Nela, M.; Tatjana, D. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics* **2019**, *20*, 1235–1245. [[CrossRef](#)]

18. Márquez, A.; Ferreiro-Iglesias, A.; Dávila-Fajardo, C.L.; Montes, A.; Pascual-Salcedo, D.; Perez-Pampin, E.; Moreno-Ramos, M.J.; García-Portales, R.; Navarro, F.; Moreira, V.; et al. Lack of validation of genetic variants associated with anti-tumor necrosis factor therapy response in rheumatoid arthritis: A genome-wide association study replication and meta-analysis. *Arthritis Res. Ther.* **2014**, *16*, R66. [[CrossRef](#)]
19. Sode, J.; Vogel, U.; Bank, S.; Andersen, P.S.; Hetland, M.L.; Loch, H.; Heegaard, N.H.H.; Andersen, V. Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated with Anti-TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139781. [[CrossRef](#)]
20. Bek, S.; Bojesen, A.B.; Nielsen, J.V.; Sode, J.; Bank, S.; Vogel, U.; Andersen, V. Systematic review and meta-analysis: Pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* **2017**, *17*, 403–411. [[CrossRef](#)]
21. Wysocki, T.; Paradowska-Gorycka, A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Montes, A.; Perez-Pampin, E.; Joven, B.; Carreira, P.; Fernández-Nebro, A.; Ordóñez, M.D.C.; Navarro-Sarabia, F.; Moreira, V.; Vasilopoulos, Y.; Sarafidou, T.; et al. FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics* **2015**, *16*, 333–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Chen, W.; Xu, H.; Wang, X.; Gu, J.; Xiong, H.; Shi, Y. The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. *Int. Immunopharmacol.* **2015**, *28*, 146–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Canet, L.M.; Filipescu, I.; Cáliz, R.; Lupiañez, C.B.; Canhão, H.; Escudero, A.; Segura-Catena, J.; Soto-Pino, M.J.; Ferrer, M.A.; García, A.; et al. Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: A multicenter study. *Pharmacogenetics Genom.* **2015**, *25*, 323–333. [[CrossRef](#)]
25. Iking-Konert, C.; Von Hinüber, U.; Richter, C.; Schwenke, H.; Gürtler, I.; Kästner, P.; Klapperich, B.; Peters, M.; Burmester, G.-R. ROUTINE—A prospective, multicentre, non-interventional, observational study to evaluate the safety and effectiveness of intravenous tocilizumab for the treatment of active rheumatoid arthritis in daily practice in Germany Rheumatology key messages. *Rheumatology* **2016**, *55*, 624–635. [[CrossRef](#)]
26. Forsblad-D'Elia, H.; Bengtsson, K.; Kristensen, L.E.; Jacobsson, L.T.H. Drug adherence, response and predictors thereof for tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis: Results from the Swedish biologics register. *Rheumatology* **2014**, *54*, 1186–1193. [[CrossRef](#)]
27. Backhaus, M.; Kaufmann, J.; Richter, C.; Wassenberg, S.; Roske, A.-E.; Hellmann, P.; Gaubitz, M. Comparison of tocilizumab and tumour necrosis factor inhibitors in rheumatoid arthritis: A retrospective analysis of 1603 patients managed in routine clinical practice. *Clin. Rheumatol.* **2015**, *34*, 673–681. [[CrossRef](#)]
28. Maldonado-Montoro, M.; Cañadas-Garre, M.; González-Utrilla, A.; Calleja-Hernández, M. Influence of IL6R gene polymorphisms in the effectiveness to treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* **2018**, *18*, 167–172. [[CrossRef](#)]
29. Maldonado-Montoro, M.; Cañadas-Garre, M.; González-Utrilla, A.; Plaza-Plaza, J.C.; Calleja-Hernández, M. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol. Res.* **2016**, *111*, 264–271. [[CrossRef](#)]
30. Enevold, C.; Baslund, B.; Linde, L.; Josephsen, N.L.; Tarp, U.; Lindegaard, H.; Jacobsen, S.; Nielsen, C.H. Interleukin-6-receptor polymorphisms rs12083537, rs2228145, and rs4329505 as predictors of response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenetics Genom.* **2014**, *24*, 401–405. [[CrossRef](#)]
31. Luxembourger, C.; Ruyssen-Witrand, A.; Ladhari, C.; Rittore, C.; Degboe, Y.; Maillfert, J.-F.; Gaudin, P.; Marotte, H.; Wendling, D.; Jorgensen, C.; et al. A single nucleotide polymorphism of IL6-receptor is associated with response to tocilizumab in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J.* **2019**, *19*, 368–374. [[CrossRef](#)]
32. Wang, J.; Bansal, A.T.; Martin, M.A.; Germer, S.; Benayed, R.; Essioux, L.; Lee, J.S.; Begovich, A.B.; Hemmings, A.; Kenwright, A.; et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* **2013**, *13*, 235–241. [[CrossRef](#)]
33. Sainz, L.; Riera, P.; Moya, P.; Bernal, S.; Casademont, J.; Díaz-Torné, C.; Millán, A.M.; Park, H.S.; Lasa, A.; Corominas, H. Role of IL6R Genetic Variants in Predicting Response to Tocilizumab in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1942. [[CrossRef](#)]
34. Aletaha, D.; Neogi, T.; Silman, A.J.; Funovits, J.; Felson, D.T.; Bingham, C.O., 3rd; Birnbaum, N.S.; Burmester, G.R.; Bykerk, V.P.; Cohen, M.D.; et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 2569–2581. [[CrossRef](#)]
35. *Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5*; US Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2017.
36. Arguinano, A.; Naderi, E.; Ndiaye, N.C.; Stathopoulou, M.; Dadé, S.; Alizadeh, B.; Visvikis-Siest, S. IL6R haplotype rs4845625\*T/rs4537545\*C is a risk factor for simultaneously high CRP, LDL and ApoB levels. *Genes Immun.* **2017**, *18*, 163–169. [[CrossRef](#)]
37. Phan, L.; Jin, Y.; Zhang, H.; Qiang, W.; Shekhtman, E.; Shao, D.; Revoe, D.; Villamarin, R.; Ivanchenko, E.; Kimura, M.; et al. ALFA: Allele Frequency Aggregator. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2020. Available online: [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/) (accessed on 10 March 2020).

38. Lee, J.S.; Wang, J.; Martin, M.; Germer, S.; Kenwright, A.; Benayed, R.; Spleiss, O.; Platt, A.; Pilson, R.; Hemmings, A.; et al. Genetic variation in *UGT1A1* typical of Gilbert syndrome is associated with unconjugated hyperbilirubinemia in patients receiving tocilizumab. *Pharmacogenetics Genom.* **2011**, *21*, 365–374. [[CrossRef](#)]
39. Mori, S.; Terada, K.; Ueki, Y. Tocilizumab-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with rheumatoid arthritis: Its association with UDP glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms. *Mod. Rheumatol.* **2011**, *22*, 515–523. [[CrossRef](#)]
40. Hoffman, E.; Rahat, M.A.; Feld, J.; Elias, M.; Rosner, I.; Kaly, L.; Lavie, I.; Gazitt, T.; Zisman, D. Effects of Tocilizumab, an Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody, on Serum Lipid and Adipokine Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4633. [[CrossRef](#)]
41. Lukas, C.; Redondin, M.; Pane, I.; Soubrier, M.; Houvenagel, E.; Sibilia, J.; Combe, B.; Morel, J. Cardiovascular events and change in cholesterol levels in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: Data from the REGATE Registry. *Clin. Exp. Rheumatol.* **2021**, *39*, 501–507. [[CrossRef](#)]
42. Castagné, B.; Viprey, M.; Martin, J.; Schott, A.-M.; Cucherat, M.; Soubrier, M. Cardiovascular safety of tocilizumab: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0220178. [[CrossRef](#)]
43. Kim, S.C.; Solomon, D.H.; Rogers, J.R.; Gale, S.; Klearman, M.; Sarsour, K.; Schneeweiss, S. Cardiovascular Safety of Tocilizumab Versus Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients with Rheumatoid Arthritis: A Multi-Database Cohort Study. *Arthritis Rheumatol.* **2017**, *69*, 1154–1164. [[CrossRef](#)]
44. Alsulaim, T.; Alhassan, N.; Khalil, H.; Almutlaq, A. Tocilizumab Effect on Lipid Profile in Correlation to Cardiovascular Events: A Retrospective Cohort Study. *Int. J. Rheumatol.* **2021**, *2021*, 5535486. [[CrossRef](#)]
45. Giles, J.T.; Sattar, N.; Gabriel, S.; Ridker, P.M.; Gay, S.; Warne, C.; Musselman, D.; Brockwell, L.; Shittu, E.; Klearman, M.; et al. Cardiovascular Safety of Tocilizumab Versus Etanercept in Rheumatoid Arthritis: A Randomized Controlled Trial. *Arthritis Rheumatol.* **2020**, *72*, 31–40. [[CrossRef](#)]
46. Behl, T.; Kaur, I.; Sehgal, A.; Zengin, G.; Brisc, C.; Brisc, M.C.; Munteanu, M.A.; Nistor-Cseppento, D.C.; Bungau, S. The Lipid Paradox as a Metabolic Checkpoint and Its Therapeutic Significance in Ameliorating the Associated Cardiovascular Risks in Rheumatoid Arthritis Patients. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 9505. [[CrossRef](#)]
47. Hashizume, M.; Yoshida, H.; Koike, N.; Suzuki, M.; Mihara, M. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Ann. Rheum. Dis.* **2010**, *69*, 741–746. [[CrossRef](#)]
48. Hashizume, M.; Mihara, M. IL-6 and lipid metabolism. *Inflamm. Regen.* **2011**, *31*, 325–333. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

### 4.3. Article 3

Sainz L, Riera P, Moya P, Bernal S, Casademont J, Díaz-Torné C, Millán AM, Sang-Park H, Lasa A, Corominas H. Impact of IL6R genetic variants on treatment efficacy and toxicity response to sarilumab in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy*. 2023 Nov 24;25(1):226. doi: 10.1186/s13075-023-03209-1.

RESEARCH

Open Access



# Impact of IL6R genetic variants on treatment efficacy and toxicity response to sarilumab in rheumatoid arthritis

Luis Sainz<sup>1,2,3†</sup>, Pau Riera<sup>3,4,5\*†</sup>, Patricia Moya<sup>1,3</sup>, Sara Bernal<sup>3,5,6</sup>, Jordi Casademont<sup>2,3,7</sup>, Cesar Díaz-Torné<sup>1,2,3</sup>, Ana Milena Millán<sup>1</sup>, Hye Sang Park<sup>1</sup>, Adriana Lasa<sup>3,5,6</sup> and Hector Corominas<sup>1,2,3\*</sup>

## Abstract

**Background** Sarilumab, an IL-6 receptor antagonist, is a first-line biologic disease-modifying anti-rheumatic drug for rheumatoid arthritis. The identification of genetic biomarkers as predictors of response to sarilumab could allow for a personalized treatment strategy to improve clinical outcomes.

**Methods** We conducted a retrospective cohort study of 62 patients treated with sarilumab to determine whether single-nucleotide polymorphisms (SNP) in the *IL6R* gene could predict efficacy and toxicity responses. Six SNPs previously described in the *IL6R* gene (rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545, and rs4845625) were genotyped in DNA samples obtained from these patients. Using parametric tests, we evaluated the association between these polymorphisms and clinicopathological features. Treatment response was assessed six months after treatment initiation. Satisfactory response was based on EULAR criteria. Low disease activity was determined according to DAS28 and CDAI and quantitative improvements in DAS28 and CDAI scores.

**Results** Three SNPs (rs4845625, rs4329505 and rs11265618) were significantly associated with response outcomes. All of the SNPs, except for rs12083537, had at least one significant association with dyslipidemia or hepatotoxicity.

**Conclusions** These findings support the potential clinical value of SNPs, particularly rs4845625, as potentially useful biomarkers to predict response to sarilumab in patients with RA.

**Keywords** IL6R, Genetic variants, Sarilumab, Rheumatoid arthritis, Predictive factors

<sup>†</sup>Luis Sainz and Pau Riera contributed equally to this work.

\*Correspondence:

Pau Riera

priera@santpau.cat

Hector Corominas

hcorominas@santpau.cat

<sup>1</sup> Rheumatology Department, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>2</sup> Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, Spain

<sup>3</sup> Institut d'Investigació Biomèdica Sant Pau (IIB SANT PAU), Barcelona, Spain

<sup>4</sup> Pharmacy Department, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>5</sup> Biomedical Network Research Centre On Rare Diseases (CIBERER), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>6</sup> Genetics Department, Institut d'Investigacions Biomèdiques Sant Pau - Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, Spain

<sup>7</sup> Internal Medicine Department, Hospital de La Santa Creu I Sant Pau, Barcelona, Spain





## Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a highly prevalent chronic systemic inflammatory disease. Clinically, RA is characterized by symmetrical peripheral polyarthritis with extraarticular manifestations [1]. The natural course of this disease may lead to progressive disability, systemic complications, and reduced quality of life [2, 3].

The principal aim of current therapeutic strategies is to achieve clinical remission or a state of low disease activity (LDA). If neither of these objectives are achieved, then the recommended approach is to adjust the treatment strategy, usually by switching to disease-modifying antirheumatic drugs (DMARD) [4]. In recent decades many highly effective biologic (bDMARD) and non-biologic therapies have been developed, leading to better disease control in many patients. Nonetheless, only limited progress has been made in identifying reliable biomarkers that could allow for personalized selection of the optimal DMARDs. At present, however, most of the available DMARDs lack robust supporting data [5]. Therefore, although the treatment selection process must take into account comorbidities and the costs of treatment, in most cases the treating physician can select treatment according to his or her professional experience, using a trial-and-error approach [6–8].

In recent years, interest in pharmacogenomics has grown due to its potential to explain much of the inter-individual differences in treatment response and predisposition to drug toxicity. The vast majority of studies published to date have focused on single nucleotide polymorphisms (SNP) as genetic biomarkers for methotrexate [9–12] and/or anti-TNF [13–19], and on new therapies, such as the IL-6R antagonist tocilizumab (TCZ) [20–26].

Sarilumab is a biologic disease-modifying antirheumatic drug (bDMARD) that exhibits specific binding affinity to both soluble and membrane-bound IL-6 receptors (IL-6R), thereby inhibiting IL-6 mediated signaling. In the last few years, this drug has received regulatory approval for the treatment of patients with moderately to severely active RA who are either intolerant or unresponsive to at least one conventional synthetic (cs)DMARD. Placebo-controlled clinical trials [27, 28] have reported response rates (ACR50 criteria) ranging from 40 to 45% at 6 months. Despite this notable efficacy, only 28–34% of patients in those studies achieved the therapeutic goal of DAS28-CRP (c-reactive protein) remission.

In this context, and in line with findings from pharmacogenetic studies on TCZ [20–26], we hypothesized that functional variations in the interleukin-6 receptor (IL6R) gene could affect treatment outcomes with sarilumab. Therefore, the aim of the present study was to assess whether genetic variants in the *IL6R* gene are associated

with response to sarilumab and treatment-related toxicity in patients diagnosed with RA.

## Materials and methods

### Study population

We conducted a single-center, retrospective cohort study involving RA patients recruited from a tertiary referral hospital. Potential participants were identified through a search of pharmacy registries, in which we identified all patients who received sarilumab treatment between January 2018 and December 2021.

The inclusion criteria were as follows: confirmed diagnosis of RA based on the American College of Rheumatology /European League Against Rheumatism (EULAR) 2010 criteria [29]; prescription of sarilumab for RA; and age  $\geq 18$  years. Exclusion criteria were: presence of other rheumatic conditions (including connective tissue diseases or vasculitis) and loss of patient to follow-up.

Sociodemographic and clinical data were collected from electronic medical records. The following variables were assessed: age; sex; age at diagnosis; body mass index (BMI); previous treatments; comorbidities; baseline c-reactive protein (CRP) level; rheumatoid factor (RF) and anti-citrullinated protein antibody (ACPA) status; and sarilumab initiation and withdrawal dates.

The Disease Activity Score 28 (DAS28) and Clinical Disease Activity Index (CDAI) at treatment initiation and at 6-months were used to evaluate treatment response. Response was further evaluated based on the following parameters: satisfactory response (EULAR criteria); achievement of LDA, which was defined as a DAS28 score  $\leq 3.2$  or CDAI score  $\leq 10$ , as well as quantifiable improvements in DAS28 and CDAI values at 6 months. Following EULAR guidelines, a satisfactory EULAR response was defined as a DAS28 improvement  $> 1.2$  with a resulting DAS28 score  $\leq 3.2$ . [30, 31].

Adverse effects (AE) were registered and classified by type [32] and by severity according to the Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE, v 6.0). AEs were further categorized into specific groups, as follows: hepatotoxicity, infections, hypersensitivity, gastrointestinal, hematological and dyslipidemia. To assess hepatotoxicity, hematological alterations, and dyslipidemia, we retrospectively reviewed the results of routine blood tests performed during follow-up every 6 months. Numeric values for transaminases, leukocytes, neutrophils, platelets, and lipids levels were recorded at the time any AE was detected.

The study protocol was approved by the respective institutional ethics committees and registered at clinicaltrials.gov (protocol code: IIBSP-IIL-2020–148). Prior to participation, all participants provided written informed

**Table 1** Selected functional polymorphisms in the *IL6R* gene

refSeg	Genomic position (GRCh38)	MAF	Alleles
rs12083537	chr1:154408627	0.21	A > <b>G</b>
rs11265618	chr1:154457616	0.17	C > <b>T</b>
rs4329505	chr1:154459944	0.17	T > <b>C</b>
rs2228145	chr1:154454494	0.40	A > <b>C</b>
rs4537545	chr1:154446403	0.41	C > <b>T</b>
rs4845625	chr1:154449591	0.43	T > <b>C</b>

The minor allele is highlighted in bold

Abbreviations: *IL6R* Interleukin 6 Receptor, *MAF* Minor allele frequency reported in the European population

consent for the collection of blood samples and subsequent genetic analyses.

### Genetic studies

Selection of the specific SNPs for analysis was based on the available literature and SNP functionality in the *IL6R* gene. The following SNPs were selected: rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545, and rs4845625 (Table 1). The rationale behind the selection of these SNPs has been described elsewhere [20–24, 26, 33]. Importantly, all of the chosen SNPs have a minor allele frequency (MAF) > 0.10 in the European population according to the Allele Frequency Aggregator (ALFA) [34].

Genomic DNA was automatically extracted from peripheral whole-blood samples using the Autopure LS system (Qiagen; Hilden, Germany). Genotyping of the selected SNPs was performed through real-time PCR using TaqMan® SNP genotyping assays (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). All cases were successfully genotyped.

### Statistical analyses

The Hardy–Weinberg equilibrium for all SNPs was assessed with the chi-square test. Associations between the SNPs and treatment outcome variables were examined considering various models of inheritance—including codominant, dominant, and recessive models—as appropriate.

Quantitative data are presented as means (standard deviation [SD]) for normally distributed variables. The Shapiro–Wilks test was applied to assess distribution normality. Student's T test or ANOVA was employed for normally distributed variables, depending on the number of groups being compared. For qualitative dichotomous variables, bivariate associations were evaluated with Pearson's chi-square ( $\chi^2$ ) or Fisher's exact test.

Associations between the SNPs and qualitative response variables were tested using  $\chi^2$  tests.

All statistical tests were two-sided, with the cut-off for statistical significance set at 5% ( $\alpha=0.05$ ). The IBM SPSS Statistics for Windows, v. 26.0 (IBM Corp. Armonk, NY, USA: IBM Corp) was used to perform all statistical analyses.

## Results

### Patient population

A total of 62 patients were included in the study. Table 2 summarizes the baseline demographic and clinical characteristics of these patients. The mean (SD) disease duration at initiation of sarilumab was 17.1 (10.9) years. At the end of the data collection period (at six months of follow-up), one-third of the patients (20/62, 32.3%) were still actively receiving sarilumab.

#### Effectiveness.

Of the 62 patients initially included in the study, seven (11.3%) were excluded from the efficacy analysis due to premature treatment discontinuation caused by early toxicity (6 patients) or because the results of the disease activity assessment were not recorded in the electronic medical records (one patient).

At the 6-month follow up, the mean (SD) decrease in DAS28 and CDAI scores was 2.6 (1.3) and 10.6 (9.3), respectively. A satisfactory EULAR response rate was

**Table 2** Baseline patient characteristics ( $n=62$ )

Variables	n (%)	Mean (SD)
Female / Male	55 (88.7) / 7 (11.3)	
Age at diagnosis, years		48.1 (14.9)
Disease duration, years		17.1 (10.9)
Erosive RA	36 (58.1)	
RF positive	46 (74.2)	
ACPA positive	42 (67.8)	
Smoking habit		
Non-smoker	36 (58.1)	
Ex-smoker	11 (17.7)	
Smoker	6 (9.7)	
Missing data	9 (14.5)	
Body mass index		28.8 (6.3)
Number of previous cDMARDs		2.5 (1.3)
Number of previous bDMARDs		2.8 (2.2)
Duration of treatment, months		18.2 (14.4)
Baseline DAS28		5.3 (1.2)
Baseline CDAI		24.9 (9.8)

Abbreviations: RA Rheumatoid arthritis, ACPA Anticitrullinated protein antibodies, DAS28 Disease Activity Score including 28 joints, bDMARD biological disease-modifying antirheumatic drug, cDMARD conventional biological disease-modifying antirheumatic drug, CDAI Clinical Disease Activity Index, RF Rheumatoid factor

achieved in 76.4% of cases. LDA for DAS28 and CDAI was achieved in 68.5% and 63.5% of patients, respectively. The mean (SD) duration of treatment was 18.2 months (14.4).

No significant differences in treatment response variables were observed according to sex, seropositivity, number of previous cDMARDs or bDMARDs, age at diagnosis, or BMI. Although ex-smokers ( $n=11$ ) and current smokers ( $n=5$ ) had a better response than never-smokers ( $n=36$ ) in terms of achieving.

DAS28-LDA (90.9% and 100% vs 58.3%,  $p=0.02$ ), no differences in CDAI-

LDA rates were found.

### Adverse events

Table 3 summarizes the frequency and severity of AEs for the 62 patients. All AEs were mild or moderate; no severe AEs were reported. The two most common types of AE were hematological alterations and dyslipidemia. Of the 24 hematological AEs registered, 11 were mild and 13 moderate. In most cases, these were managed by observation ( $n=9$ ), temporary discontinuation of sarilumab ( $n=3$ ), or dose reduction ( $n=7$ ). The most common hematological AE was neutropenia (22 cases), with a median (SD) value of  $1.06 \times 10^9/L$  (360). In terms of dyslipidemia, the median (SD) total cholesterol value was 284.6 (43.9) mg/dL. Only three patients required initiation of cholesterol lowering therapy due to sarilumab.

### Genetic determinants and response to treatment

The genotypic frequencies of all six SNPs were in Hardy–Weinberg equilibrium. A linked inheritance was observed between rs4329505 and rs11265618, as all individuals carrying the T allele for rs4329505 also had the C allele for rs11265618, and vice versa. Consequently, the results for both of those SNPs were analogous.

On the univariate analysis, three SNPs (rs4845625, rs4329505, rs11265618) were significantly associated

with response outcomes (Table 4). In Fig. 1, the dot plot graphs for CDAI at 6 months, which is used to determine the CDAI-LDA, for these three SNPs are shown.

Patients carrying the CC genotype for rs4845625 had worse response rates to sarilumab as measured by CDAI and DAS28 LDA rates (45.5% and 52.4% vs. 76.7% and 80% in the CT+TT genotypes, respectively;  $p=0.021$  and  $p=0.037$ ). CC carriers showed less improvement in DAS28 (2.34 vs. 2.8,  $p=0.27$ ) and CDAI (10.7 vs. 16.7,  $p=0.066$ ), although these differences were not statistically significant. These findings are consistent with a recessive genetic model.

For rs4329505 and rs11265618, the genetic model that best fit the data was the dominant model, as patients homozygous for the wild-type allele (TT for rs4329505 and CC for rs11265618) showed better remission rates than the other patients; specifically, remission rates (CDAI-LDA) were 73.5% vs. 44.4% ( $p=0.039$ ) and the quantitative improvement in DAS28 was 2.9 vs. 2.0 ( $p=0.048$ ). No significant differences were found for DAS28 LDA, CDAI improvement, and/or EULAR response rates.

No statistically significant associations were observed for the remaining three SNPs (rs12083537, rs2228145, rs4537545).

### Genetic determinants and adverse effects

On the univariate analysis, all SNPs (except for rs12083537) were significantly associated with dyslipidemia and/or hepatotoxicity (Table 5). None of the SNPs showed a statistically significant association with any of the other AEs observed during the study period.

Compared to AC+CC carriers, patients carrying the AA genotype for rs2228145 had a higher incidence of dyslipidemia (50% vs. 17.5%,  $p=0.008$ ). Similarly, for rs4537545, the incidence of dyslipidemia was greater in CC carriers than for CT+TT genotypes (50% vs. 19%,  $p=0.014$ ).

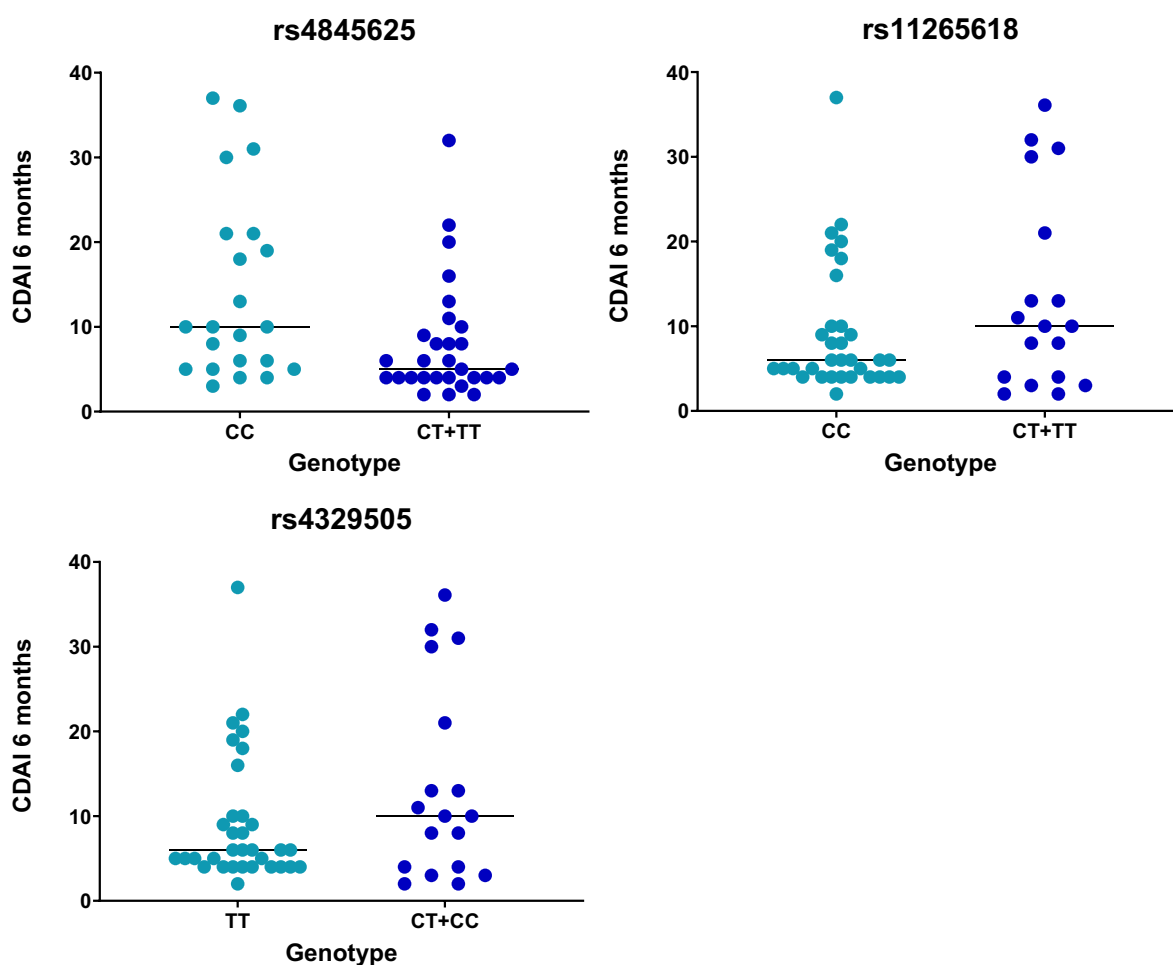
**Table 3** Sarilumab-related adverse events (62 patients)

Adverse event	n (%)	Mild, n (%)	Moderate, n (%)	Sarilumab discontinuation n (%)
Hepatotoxicity	6 (9.7)	5 (8.1)	1 (1.6)	0
Infections	4 (6.5)	1 (1.6)	3 (4.9)	0
Hypersensitivity/Intolerance	8 (12.9)	2 (3.2)	6 (9.7)	7 (11.9)
Gastrointestinal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Hematological, total	24 (38.7)	11 (17.7)	13 (20.9)	5 (8.1)
Neutropenia ( $n=22$ )				
Thrombocytopenia ( $n=2$ )				
Dyslipidemia	18 (29)			

**Table 4** Associations between the six SNPs and response outcomes at 6 months

SNPs	DAS28 improvement			DAS28-LDA			CDAI improvement			CDAI-LDA			
	Genotype (n)	Mean absolute value	p	Genetic model	%	p	Genetic model	Mean absolute value	Genetic model	p	%	Genetic model	p
rs4845625	T/T (9)	2.79	0.55	Cod	71.4	0.09	Cod	13.36	Cod	0.13	71.4	Cod	0.06
	C/T (28)	2.82	0.28	Rec	82.6	<b>0.037</b>	Rec	17.69	Rec	0.06	78.3	Rec	<b>0.02</b>
	C/C (25)	2.34			52.4			10.69			45.5		
rs11265618	C/C (42)	2.91	0.08	Cod	73.5	0.12	Cod	15.64	Cod	0.31	73.5	Cod	0.08
	C/T (17)	1.87	<b>0.048</b>	Dom	50	0.29	Dom	10.12	Dom	0.18	40	Dom	<b>0.039</b>
	T/T (3)	2.82			100			15.66			66.7		
rs4329505	T/T (42)	2.91	0.08	Cod	73.5	0.12	Cod	15.64	Cod	0.31	73.5	Cod	0.08
	C/T (17)	1.87	<b>0.048</b>	Dom	50	0.29	Dom	10.12	Dom	0.18	40	Dom	<b>0.039</b>
	C/C (3)	2.82			100			15.66			66.7		
rs12083537	A/A (40)	2.36	0.21	Cod	72.7	0.26	Cod	13.37	Cod	0.48	63.6	Cod	0.35
	A/G (20)	3.13	0.10	Dom	64.7	0.39	Dom	16.05	Dom	0.56	66.7	Dom	0.97
	G/G (2)	2.05			0			3			0		
rs2228145	A/A (22)	2.36	0.62	Cod	73.7	0.82	Cod	13.39	Cod	0.95	63.2	Cod	0.99
	C/A (27)	2.71	0.35	Dom	66.7	0.55	Dom	14.49	Dom	0.75	63.6	Dom	0.97
	C/C (13)	2.87			63.6			14.41			63.6		
rs4537545	C/C (20)	2.31	0.50	Cod	72.7	0.92	Cod	13.27	Cod	0.91	61.1	Cod	0.95
	C/T (28)	2.68	0.29	Dom	66.7	0.68	Dom	14.06	Dom	0.73	63.6	Dom	0.79
	T/T (14)	2.96			66.7			15.23			66.7		

Abbreviations: CDAI Clinical Disease Activity Index, Cod Codominant, DAS28 Disease Activity Score including 28 joints, Dom Dominant, p p-value, Rec Recessive, SNPs Single Nucleotide Polymorphisms



**Fig. 1** Dot plot of CDAI at 6 months for genotypes of rs4845625, rs11265618, and rs4329505. The line at each genotype represents the median. The consideration of CDAI-LDA at 6 months was considered when the CDAI score was equal or under 10. Abbreviations: CDAI: Clinical Disease Activity Index; LDA: Low Disease Activity

Both rs4329505 and rs11265618 were significantly associated with hepatotoxicity. More specifically, TT carriers for rs4329505 and CC carriers for rs11265618 had higher rates of hepatotoxicity compared to the other genotypes (14.3% vs. 0%,  $p=0.026$ ).

Patients with the TT genotype for rs4845625 had a significantly higher incidence of hepatotoxicity compared to carriers of the C allele (CT+CC) (33.3% vs. 5.7%,  $p=0.03$ ). We also observed a trend towards an association between rs4845625 and dyslipidemia, as evidenced by the higher incidence of dyslipidemia for patients carrying the T allele (TT+CT); however, this association was not statistically significant.

## Discussion

This study was conducted to investigate possible associations between six different SNPs in the *IL6R* gene and treatment response outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with sarilumab over a 6-month

period. To our knowledge, this is the first study to examine the pharmacogenetics of sarilumab. Significant associations were identified between three SNPs (rs4845625, rs4329505, rs11265618) and certain response outcomes (DAS28 improvement, DAS28-LDA, CDAI-LDA). Similarly, five of the six SNPs (rs2228145, rs4329505, rs11265618, rs4537545, rs4845625) were significantly associated with adverse events (hepatotoxicity and dyslipidemia).

Our findings with regard to the rs4845625 SNP are particularly noteworthy given how consistent these results were. This SNP was positively associated with LDA rates for both DAS28 and CDAI. Interestingly, there were clinically-relevant differences between the groups, with a 20–30% gap between them in terms of achieving the treatment aims (remission or LDA) (Table 4). The rs4845625 SNP is located in Chr1 (q21.3) g.154422067, in intron 7 of the *IL6R* gene. In silico tools such as ESE Finder predict that this SNP may alter the



**Table 5** Associations between the SNPs and hepatotoxicity and dyslipidemia

SNPs	Genotype (n)	Hepatotoxicity			Dyslipidemia		
		%	Genetic model	<i>p</i>	%	Genetic model	<i>p</i>
rs4845625	T/T (9)	33.3	Cod	0.07	44.4	Cod	0.14
	C/T (28)	7.1	Dom	<b>0.027</b>	35.7	Rec	0.056
	C/C (25)	4			16		
rs11265618	T/T (42)	14.3	Cod	0.08	23.8	Cod	0.41
	C/T (17)	0	Dom	<b>0.026</b>	41.2	Dom	0.19
	C/C (3)	0			33.3		
rs4329505	T/T (42)	14.3	Cod	0.08	23.8	Cod	0.41
	C/T (17)	0	Dom	<b>0.026</b>	41.2	Dom	0.19
	C/C (3)	0			33.3		
rs2228145	A/A (22)	13.6	Cod	0.75	50	Cod	0.028
	C/A (27)	7.4	Dom	0.44	5	Dom	<b>0.008</b>
	C/C (13)	7.7			2		
rs4537545	C/C (20)	15	Cod	0.64	50	Cod	<b>0.046</b>
	C/T (28)	7.1	Dom	0.34	17.9	Dom	<b>0.014</b>
	T/T (14)	7.1			21.4		

Abbreviations: SNPs Single Nucleotide Polymorphisms, *p* *p*-value

splicing process, thus leading to changes in the amount or functionality of the resulting protein. These changes may result in differences in treatment responses, as previous studies have indicated that RA patients with higher concentrations of soluble IL-6R tend to show poorer responses to TCZ [35]. Furthermore, it has been demonstrated that other SNPs (such as rs2228145) in IL6R can influence the balance between membrane-bound IL-6R and soluble IL-6R [36].

Previous studies have shown several associations between rs4845625 and inflammatory pathways, including differences in plasma IL-6 levels [37] and basal levels of inflammatory markers in healthy cohorts [33]. Our research group was the first to report the association between rs4845625 and differences in response outcomes in patients with RA treated with tocilizumab, another IL-6 receptor antagonist [20]. In that study, patients with the CC genotype had a lower response to TCZ (as measured by DAS28-LDA) than patients with the CT + TT genotypes (58.3% vs. 82.4%, respectively). Those findings are consistent with the results of the present study with sarilumab. Moreover, the results of the present study provide further support for our earlier results with TCZ, as we have now identified the same association with another IL-6R antagonist (sarilumab), suggesting that genetic variations in *IL6R* can modulate treatment response. Additionally, in the present study we utilized more reliable and consistent response outcome measures, including the addition of CDAI, which is not influenced by the effect of IL-6 inhibitors on C-reactive protein [38].

Both the rs4329505 and rs11265618 SNPs exhibited similar results due to linked inheritance, which makes it challenging to identify the specific genetic changes that truly modulate treatment response. Apart from a substantial 30% variation in treatment response (CDAI-LDA), these SNPs were the only ones to demonstrate significant differences in terms of the quantitative reduction in DAS28. Enevold et al. [23] evaluated treatment response outcomes (number of swollen joints) to TCZ in patients with RA, finding similar differences for rs4329505. In that study, allele C carriers (CC+CT) also had a lower response to treatment. In our previous study with TCZ [20], we also found a trend toward better response rates (measured by DAS28 and EULAR) in patients with the TT genotype, although these differences were not statistically significant. By contrast, rs4329505 has been investigated in two retrospective studies by Maldonado-Montoro et al. [22] and Luxembourg et al. [24], without finding significant associations with response rates.

In our previous study with TCZ, we found no significant association between rs11265618 and response outcomes. By contrast, in the present study with sarilumab, we did observe a significant association, a finding that is in line with the study by Maldonado-Montoro et al. [21], who described an association with the CC genotype for rs11265618, indicating a better response in terms of LDA after 12 months of TCZ therapy. Previous studies of IL-6 inhibitors have not found consistent results for either rs4329505 or rs11265618 [21, 24]. Although our findings provide support for a coherent trend with regards to the



value of those SNPs as potential biomarkers, further confirmation is warranted before they can be considered reliable biomarkers for IL-6 inhibitor therapy.

Most of the AEs reported in the present series were mild or moderate, with no severe AEs detected during follow-up (mean, 18 months). The most commonly reported AEs were hematological, but they rarely required discontinuation of sarilumab (8.1%). Additionally, we found no associations between these AEs and any genetic determinants.

Although we found a positive association between several AEs with at least one SNP, in most cases the AEs were not clinically relevant and thus did not require a therapeutic change. With regards to hepatotoxicity, given that these cases were only of mild to moderate severity and also relatively rare (9.7%), we believe that the observed associations were only incidental findings. For dyslipidemia, we found significant associations for rs2228145, with higher rates in AA carriers, and for rs4537545, with higher rates in CC carriers. Although the clinical significance of these associations may be low, as dyslipidemia secondary to TCZ treatment has not been linked to an increased risk of cardiovascular events [39–43], the interplay between lipid profiles and inflammatory pathways, such as IL-6, has been extensively described [42, 44–46]. Therefore, it is plausible that alterations in the *IL6R* pathway may influence the development of dyslipidemia. In our previous study with TCZ, we observed that patients carrying the CT+TT genotype had a better response to treatment but a higher incidence of dyslipidemia. In the present study with sarilumab, we have found similar results in terms of treatment efficacy. Although we found no significant association between genotype and dyslipidemia, we did observe a trend towards a higher incidence of dyslipidemia for TT+CT genotypes than for CC genotypes (33.3% vs. 16%,  $p=0.056$ ), a finding that is consistent with the results of our previous study.

This study has several limitations that should be considered when interpreting the results. First, the retrospective design and the relatively small sample size may have limited our ability to identify a significant association between some SNPs and response outcomes, particularly in those SNPs (rs11265618 and rs4329505) with a low frequency of the mutated allele. Nonetheless, the homogeneity of this cohort and the fact that our results were comparable to those described in our previous study with TCZ, strengthen the validity of our findings. Second, we only evaluated the six most promising *IL6R* SNPs; other genetic variants not included in the present study could also be predictor of response to sarilumab. Another strength is that this is the first pharmacogenetic study of sarilumab. Moreover, since sarilumab is typically used in current clinical practice after failure of at least

one other bDMARD, this is the first study to provide data on this unique cohort.

The pharmacogenomics of RA is highly complex and further research is needed to obtain more robust, clinically-relevant evidence to determine the association between genetic markers and treatment response in patients with RA. However, based on our findings, we believe that rs4845625 may be a useful biomarker to help predict treatment response. However, more comprehensive research is needed before it can be considered for use in routine clinical practice.

## Conclusions

The results of this study suggest that several *IL6R* polymorphisms—rs4845625, rs4329505 and rs11265618—may be associated with treatment response as measured by CDAI and DAS28 LDA rates and absolute improvement in DAS28 after six months of sarilumab in patients with RA. In addition, we have also shown that five SNPs (rs2228145, rs4329505, rs11265618, rs4537545, rs4845625) are associated with the development of certain adverse events—particularly hepatotoxicity and dyslipidemia—during the follow-up, even though they showed limited clinical significance. To our knowledge, these associations have not been previously reported.

## Abbreviations

ACPA	Anti-citrullinated protein antibody
AE	Adverse effects
CDAI	Clinical disease activity index
CRP	C-reactive protein
DAS28	Disease activity score 28
bDMARD	Biologic Disease-Modifying anti-rheumatic drugs
DMARD	Disease-Modifying anti-rheumatic drugs
EULAR	European league against rheumatism
IL-6R	IL-6 receptors
LDA	Low disease activity
MAF	Minor allele frequency
RA	Rheumatoid arthritis
RF	Rheumatoid factor
SD	Standard deviation
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCZ	Tocilizumab

## Acknowledgements

We thank Bradley Londres for professional English language editing.

## Authors' contributions

Conceptualization, L.S., P.R., P.M., S.B., C.D-T., A.L., H.C.; methodology, L.S., P.R., P.M., S.B., I.G., H.S-P., A.L., H.C.; software, I.G.; validation, P.R., P.M., S.B., A.L., L.G-Q., J.C., H.C.; formal analysis, I.G.; investigation, L.S., P.R., M.C.; resources, S.B., A.L.; writing—original draft preparation, L.S., P.R.; writing—review and editing, P.M., S.B., J.C., D.L., H.C., I.C., C.D-T., A.L., B.M., A.M.M., H.S-P., A.L., H.C.; visualization, L.S., P.R.; supervision, P.M., S.B., A.L., H.C., J. C.; project administration, L.S., P.R.; funding acquisition, L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

This research was supported in part by a 2020–2021 grant by "Societat Catalana de Reumatologia". This work was supported by the Instituto de Salud Carlos III (JR20/00008 for Pau Riera).

### Availability of data and materials

The datasets generated and analysed during the current study are not publicly available due to containing clinical information which could constitute potential patient identifiers, but are available from the corresponding author on reasonable request.

### Declarations

#### Ethics approval and consent to participate

The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethics Committee of "Hospital de la Santa Creu I Sant Pau" (IIBSP-III-2020-148; 1 March 2021). Informed consent was obtained from all patients involved in the study.

#### Consent for publication

Not applicable.

#### Competing interests

HC has received grants for research and attendance at conferences from Grünenthal, MSD, Biogen, Galapagos, Roche, BMS and honorarium for advisory boards from Galapagos, Gebro, Abbvie, Sanofi, UCB.

Received: 15 September 2023 Accepted: 6 November 2023

Published online: 24 November 2023

### References

- Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1316–22.
- McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011;365(23):2205–19.
- Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2016;388(10055):2023–38.
- Smolen JS, Landewé RBM, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis*. 2023;82(1):3–18.
- Wei K, Jiang P, Zhao J, Jin Y, Zhang R, Chang C, et al. Biomarkers to predict DMARDs efficacy and adverse effect in rheumatoid arthritis. *Front Immunol*. 2022;28:13.
- Jin Y, Desai RJ, Liu J, Choi NK, Kim SC. Factors associated with initial or subsequent choice of biologic disease-modifying antirheumatic drugs for treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2017;19(1):159.
- Narváez J, Magallares B, Díaz-Torné C, Hernández MV, Reina D, Corominas H, et al. Predictive factors for induction of remission in patients with active rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in clinical practice. *Semin Arthritis Rheum*. 2016;45(4):386–90.
- Pers YM, Mentine Fortunet C, Constant E, Lambert J, Godfrin-Valnet M, De Jong A, et al. Predictors of response and remission in a large cohort of rheumatoid arthritis patients treated with tocilizumab in clinical practice. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article/53/1/76/1781300>.
- Cao M, Guo M, Wu DQ, Meng L. Pharmacogenomics of methotrexate: current status and future outlook. *Curr Drug Metab*. 2018;19(14):1182–7.
- Salazar J, Moya P, Altés A, Díaz-Torné C, Casademont J, Cerdà-Gabarro D, et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics*. 2014;15(8):1079–90.
- Moya P, Salazar J, Arranz MJ, Díaz-Torné C, del Río E, Casademont J, et al. Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17(1):25–9.
- Jekic B, Maksimovic N, Damjanovic T. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2019;20(17):1235–45.
- Márquez A, Ferreiro-Iglesias A, Dávila-Fajardo CL, Montes A, Pascual-Salcedo D, Perez-Pampin E, et al. Lack of validation of genetic variants associated with anti-tumor necrosis factor therapy response in rheumatoid arthritis: a genome-wide association study replication and meta-analysis. 2014. Available from: <http://arthritis-research.com/content/16/2/R66>.
- Sode J, Vogel U, Bank S, Andersen PS, Lund Hetland M, Loch H, et al. Genetic Variations in Pattern Recognition Receptor Loci Are Associated with Anti-TNF Response in Patients with Rheumatoid Arthritis. 2015; Available from: [www.lgcgenomics.com](http://www.lgcgenomics.com).
- Bek S, Bojesen AB, Nielsen J v, Sode J, Bank S, Vogel U, et al. Systematic review and meta-analysis: pharmacogenetics of anti-TNF treatment response in rheumatoid arthritis. *Nature Publishing Group*. 2017;17. Available from: <http://permed2020.eu/>.
- Wysocki T, Paradowska-Gorycka A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/jims23042366>.
- Montes A, Perez-Pampin E, Joven B, Carreira P, Fernández-Nebro A, del Carmen OM, et al. FCGR polymorphisms in the treatment of rheumatoid arthritis with Fc-containing TNF inhibitors. *Pharmacogenomics*. 2015;16(4):333–45.
- Chen W, Xu H, Wang X, Gu J, Xiong H, Shi Y. The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: a meta-analysis. *Int Immunopharmacol*. 2015;28(1):146–53.
- Canet LM, Filipescu I, Cáliz R, Lupiáñez CB, Canhão H, Escudero A, et al. Genetic variants within the TNFRSF1B gene and susceptibility to rheumatoid arthritis and response to anti-TNF drugs: a multicenter study. *Pharmacogenet Genomics*. 2015;25(7):323–33.
- Sainz L, Riera P, Moya P, Bernal S, Casademont J, Díaz-Torné C, et al. Role of IL6R genetic variants in predicting response to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2022;14(9):1942.
- Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Ángel C-H. Influence of IL6R gene polymorphisms in the effectiveness to treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2018;18(1):167–72.
- Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Plaza-Plaza JC, Calleja-Hernández M. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res*. 2016;111:264–71.
- Enevold C, Baslund B, Linde L, Josephsen NL, Tarp U, Lindegaard H, et al. Interleukin-6-receptor polymorphisms rs12083537, rs2228145, and rs4329505 as predictors of response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics*. 2014;24(8):401–5.
- Luxembourger C, Ruysen-Witrand A, Ladhari C, Rittore C, Degboe Y, Mailliefert JF, et al. A single nucleotide polymorphism of IL6-receptor is associated with response to tocilizumab in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2019;19(4):368–74.
- Wang J, Bansal AT, Martin M, Germer S, Benayed R, Essioux L, et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2013;13(3):235–41.
- Sainz L, Riera P, Moya P, Bernal S, Casademont J, Díaz-Torné C, et al. Clinical value of IL6R gene variants as predictive biomarkers for toxicity to tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *J Pers Med*. 2022;13(1):61.
- Huizinga TWJ, Fleischmann RM, Jasson M, Radin AR, van Adelsberg J, Fiore S, et al. Sarilumab, a fully human monoclonal antibody against IL-6R $\alpha$  in patients with rheumatoid arthritis and an inadequate response to methotrexate: efficacy and safety results from the randomised SARIL-RA-MOBILITY Part A trial. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(9):1626–34.
- Genovese MC, Fleischmann R, Kivitz AJ, Rell-Bakalarska M, Martincova R, Fiore S, et al. Sarilumab plus methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response to methotrexate: results of a phase III study. *Arthritis Rheumatol*. 2015;67(6):1424–37.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum*. 2010;62(9):2569–81.
- van Gestel AM, Anderson JJ, van Riel PL, Boers M, Haagsma CJ, Rich B, et al. ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. American college of rheumatology European league of associations for rheumatology. *J Rheumatol*. 1999;26(3):705–11.

31. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VPK, Stamm T, Smolen JS. Remission and active disease in rheumatoid arthritis defining criteria for disease activity states. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2625–36.
32. U.S. Department of Health and Human Services. Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) Version 5.0. 2017. [https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic\\_applications/docs/ctcae\\_v5\\_quick\\_reference\\_5x7.pdf](https://ctep.cancer.gov/protocoldevelopment/electronic_applications/docs/ctcae_v5_quick_reference_5x7.pdf). Accessed 10 Jan 2022.
33. Arguinano AA, Naderi E, Ndiaye NC, Stathopoulou M, Dadé S, Alizadeh B, et al. IL6R haplotype rs4845625\*T/rs4537545\*C is a risk factor for simultaneously high CRP, LDL and ApoB levels. *Genes Immun.* 2017;18(3):163–9.
34. L. Phan, Y. Jin, H. Zhang, W. Qiang, E. Shekhtman, D. Shao, D. Revove, R. Villamarin, E. Ivanchenko, M. Kimura, Z. Y. Wang, L. Hao, N. Sharopova, M. Bihan, A. Sturcke, M. Lee, N. Popova, W. Wu, C. Bastiani, M. Ward, J. B. Holmes, V. Lyoshin, K. Kaur, E. Moyer, M. Feolo, and B. L. Kattman. "ALFA: Allele Frequency Aggregator." National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2020. [www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/docs/gsr/alfa/).
35. Diaz-Torne C, Ortiz MDA, Moya P, Hernandez MV, Reina D, Castellvi I, et al. The combination of IL-6 and its soluble receptor is associated with the response of rheumatoid arthritis patients to tocilizumab. *Semin Arthritis Rheum.* 2018;47(6):757–64.
36. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JMM, Rainbow DB, Smyth DJ, et al. Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases. *PLoS Genet.* 2013;9(4):e1003444.
37. Shah T, Zabaneh D, Gaunt T, Swerdlow DJ, Shah S, Talmud PJ, et al. Gene-centric analysis identifies variants associated with interleukin-6 levels and shared pathways with other inflammation markers. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013;6(2):163–70.
38. Smolen JS, Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: the role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum.* 2011;63(1):43–52.
39. Hoffman E, Rahat MA, Feld J, Elias M, Rosner I, Kaly L, et al. Effects of Tocilizumab, an Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody, on Serum Lipid and Adipokine Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences Article.* 2019; Available from: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms). Cited 13 Oct 2022.
40. Lukas C, Redondin M, Pane I, Soubrier M, Houvenagel E, Sibilia J, et al. Cardiovascular events and change in cholesterol levels in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: data from the REGATE Registry. *Clin Exp Rheumatol.* 2021;39(3):501–7.
41. Castagné B, Viprey M, Martin J, Schott AM, Cucherat M, Soubrier M. Cardiovascular safety of tocilizumab: a systematic review and network meta-analysis. *PLoS ONE.* 2019;14(8):e0220178.
42. Alsulaim T, Alhassan N, Khalil H, Almutlaq A. Tocilizumab effect on lipid profile in correlation to cardiovascular events: a retrospective cohort study. *Int J Rheumatol.* 2021;12(2021):1–8.
43. Giles JT, Sattar N, Gabriel S, Ridker PM, Gay S, Warne C, et al. Cardiovascular safety of tocilizumab versus etanercept in rheumatoid arthritis: a randomized controlled trial. *Arthritis Rheumatol.* 2020;72(1):31–40.
44. Behl T, Kaur I, Sehgal A, Zengin G, Brisc C, Brisc MC, et al. The lipid paradox as a metabolic checkpoint and its therapeutic significance in ameliorating the associated cardiovascular risks in rheumatoid arthritis patients. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9505.
45. Hashizume M, Mihara M. IL-6 and lipid metabolism. *Inflamm Regen.* 2011;31(3):325–33.
46. Hashizume M, Yoshida H, Koike N, Suzuki M, Mihara M. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Ann Rheum Dis.* 2010;69(4):741–6.

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

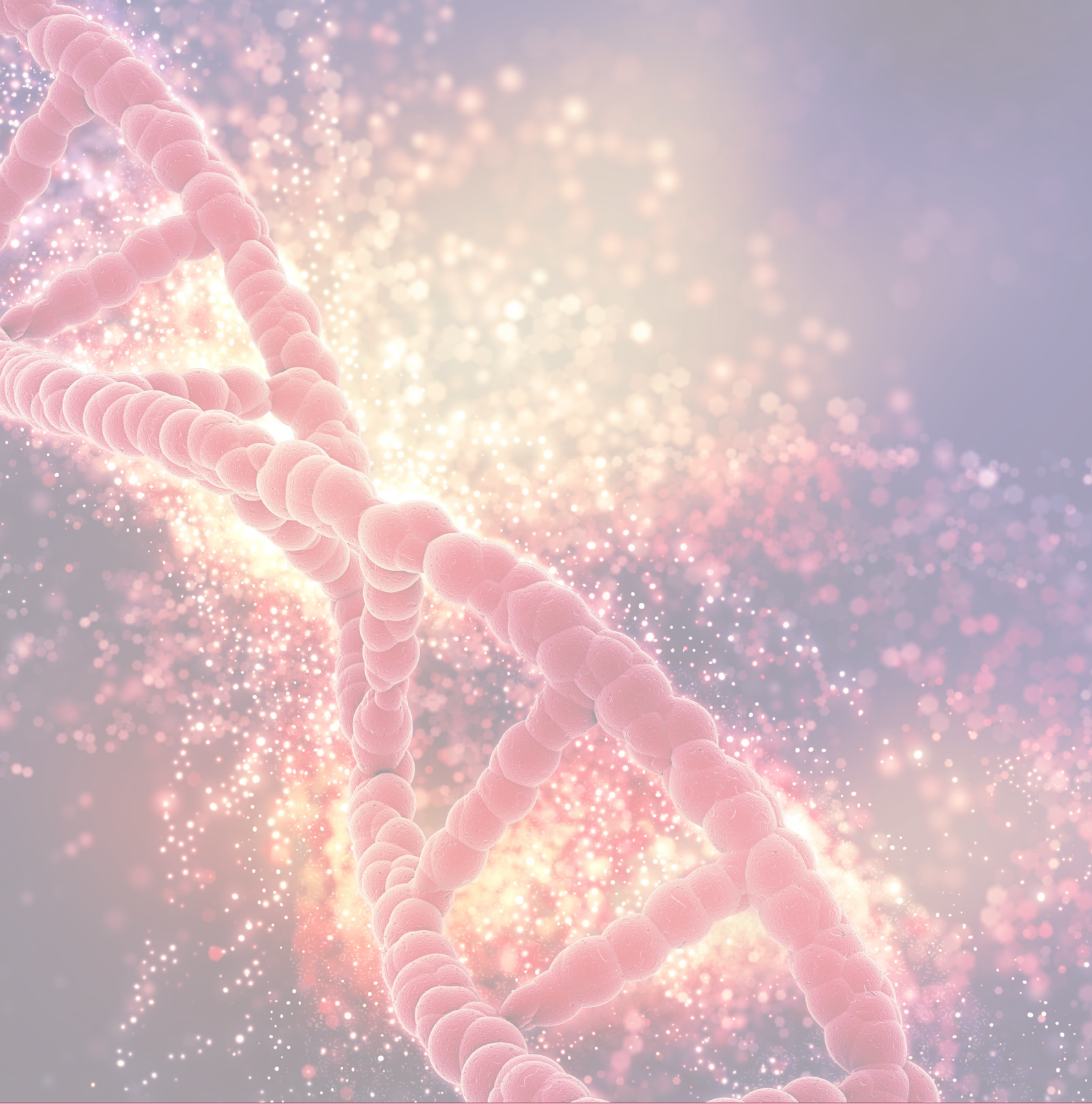
At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)









## **5. Resum global de resultats**

## 5.1. Característiques basals dels pacients

Es resumeixen les característiques basals de les dues cohorts utilitzades en els estudis de la present tesi doctoral en la taula 7. En l'Annex 1 es resumeixen els sis SNPs estudiats, les seves posicions genòmiques i les corresponents freqüències al·lèliques poblacionals.

La cohort de pacients tractats amb TCZ és més nombrosa (88) que la de sarilumab (62) però presenta una proporció molt similar de la resta de característiques basals com són l'edat al diagnòstic, la duració de malaltia, seropositivitat, percentatge de fumadors i índex de massa corporal (IMC). Entre les principals diferències destaca el temps de tractament amb el fàrmac corresponent, marcadament superior en la cohort de TCZ, i el nombre de FAMMb previs utilitzats abans del fàrmac en estudi, que és superior en sarilumab. Ambdues cohorts presentaven pacients amb alt nivells d'activitat previs a l'inici de tractament. Com a diferència destacable, en la cohort de sarilumab es tenen recollides dades d'activitat de la malaltia més completes, amb la inclusió de CDAI com a marcador d'activitat.

### Taula 7.

Resum resultats població basal de les cohorts de pacients tractats amb tocilizumab i sarilumab.

Variables	Tocilizumab (n=88)		Sarilumab (n=62)	
	n (%)	Mitjana (DE)	n (%)	Mitjana (DE)
Dones / Homes	76 (86.4)/ 12(13.6)		55 (88.7)/ 7(11.3)	
Edat al diagnòstic, anys		46.6 (15.9)		48.1 (14.9)
Duració de malaltia, anys		16.5 (11.8)		17.1 (10.9)
AR erosiva	47 (53.4)		36 (58.1)	
FR positiu	58 (65.9)		46 (74.2)	
ACPA positiu	57 (64.8)		42 (67.8)	
No fumadors	61 (69.3)		36 (58.1)	
Ex-fumadors	14 (15.9)		11 (17.7)	
Fumadors	13 (14.8)		6 (9.7)	
Sense dades	0		9 (14.5)	
Índex Massa Corporal		28.6 (6.1)		28.8 (6.3)
Nombre de FAMMc previs		2.4 (1.3)		2.5 (1.3)
Nombre de FAMMb previs		1.5 (1.4)		2.8 (2.2)
Duració del tractament, mesos		45.9 (40.1)		18.2 (14.4)
DAS28 basal		5.4 (1)		5.3 (1.2)
CDAI basal				24.9 (9.8)



## 5.2. Associacions entre variants genètiques i variables de resposta al tractament

En l'estudi que tracta TCZ i variables d'eficàcia, s'han estudiat les associacions entre els 6 SNPs i les següents variables de resposta al tractament als 6 mesos: milloria absoluta del DAS28, resposta EULAR satisfactòria i consecució de LDA.

En l'anàlisi univariant, únicament un dels SNPs (rs4845625) va mostrar una associació estadísticament significativa amb les tres variables resposta, observant unes diferències quantitativament destacables entre els grups. Les taxes LDA van ser de 90.9% i 85.4% en els genotips TT i CT respectivament, contrastant amb el 56.5% dels homozigots mutats (CC) ( $p=0.015$ ). A part de detectar diferències, la variable quantitativa de resposta (milloria absoluta en DAS28), mostra potencials canvis substancials en la magnitud de resposta. Els portadors del genotip TT per rs4845625 van mostrar una reducció de 3.62 en DAS28 als 6 mesos d'inici de TCZ, respecte 3.06 en el genotip CT i 2.36 en el genotip CC ( $p=0.015$ , considerant un model genètic additiu).

Tot i no aconseguir altres associacions estadísticament significatives, si que destaca una tendència observada entre les variants rs4329505 i rs11265618 amb les variables resposta, especialment quan es considera la milloria absoluta de DAS28 i la resposta EULAR satisfactòria. En aquests, els portadors dels genotips homozigots silvestres o naturals (CC per rs11265618 i TT per rs4329505) semblen presentar millor resposta al tractament.

En quant a la resposta al tractament a sarilumab, cal destacar que es van realitzar canvis en les variables resposta amb la inclusió de milloria absoluta de CDAI als 6 mesos com a variable quantitativa i la taxa de consecució de LDA per CDAI com variable qualitativa de resposta. En aquesta ocasió també es va descriure que els pacients portadors del genotip CC en rs4845625 presentaven pitjors respostes al tractament que els pacients amb genotips CT+TT, mesurat tant amb taxes de consecució LDA per DAS28 (45.5% vs. 76.7%,  $p=0.021$ ) com per CDAI (52.4% vs. 80%,  $p=0.037$ ) als 6 mesos. Tot i no aconseguir la significança estadística amb les variables resposta quantitatives, es pot observar la mateixa tendència consistent amb un model genètic recessiu, amb respostes qualitativament 6 punts menors en reducció de CDAI (10.7 en pacients CC i 16.7 en CT+TT,  $p=0.066$ ) i 0,5 punts menors en DAS28 (2.34 en CC i 2.8 en CT+TT,  $p=0.27$ )

Respecte els SNPs rs4329505 i rs11265618, els mateixos pacients homozigots per l'al·lel silvestre van mostrar millors respostes al tractament al ser valorat tant com per LDA, per CDAI i com per la milloria absoluta en DAS28, també considerant un model genètic dominant. Els pacients homozigots per l'al·lel silvestre per ambdós SNP (CC per rs11265618 i TT per rs4329505) van presentar reduccions majors en LDA per CDAI que la resta (73.5% vs. 44.4%,

p=0.039). També es van observar diferències estadísticament significatives al avaluar milloria absoluta en DAS28 (2.9 vs. 2.0 p=0.048).

### **5.3. Associacions entre variants genètiques i aparició d'efectes adversos**

En la cohort de pacients tractats amb TCZ, els EA més freqüents van ser els hematològics (27 casos, 30.7%) a expenses principalment de casos de neutropènia (23 casos). El maneig conservador va ser la principal estratègia i només 2 pacients van requerir discontinuar el fàrmac definitivament per aquest motiu.

Es van detectar valors analítics de dislipèmia amb la mateixa freqüència (27 casos, 30.7%), amb valors mitjos de colesterol total de 284.5mg/dL i de 180.2mg/dL de LDL.

Destaquen en tercer lloc els casos d'hepatotoxicitat, en cap cas sever, però sí amb 7 casos amb afectació moderada, quatre dels quals van ocórrer amb la biteràpia amb MTX.

Per la seva rellevància clínica, cal destacar que hi va haver 3 casos d'infeccions severes que van requerir hospitalització, tots ells resolts amb la suspensió temporal del fàrmac i el tractament pertinent per la infecció.

En la cohort de pacients tractats amb sarilumab, els EA reportats més freqüentment van ser també els hematològics seguits de la dislipèmia. Els EA hematològics (24 casos, 38.7%), principalment neutropènia, van ser exclusivament lleus (11 casos) o moderats (13 casos) i, en la meitat dels casos, es van poder manejar de forma conservadora amb observació o discontinuació temporal. Tot i això, en 5 ocasions van requerir discontinuació del fàrmac.

La dislipèmia va ocórrer en 18 pacients (colesterol mitjà de 284.6mg/dL) però només en 3 casos es va requerir inici de tractament hipolipemiant. La resta d'EA (hepatotoxicitat, infeccions, gastrointestinals i hipersensibilitat/intolerància) van ser molt més infreqüents, sempre lleu o moderats, i només van suposar una discontinuació del fàrmac en 7 casos d'hipersensibilitat o intolerància al fàrmac.

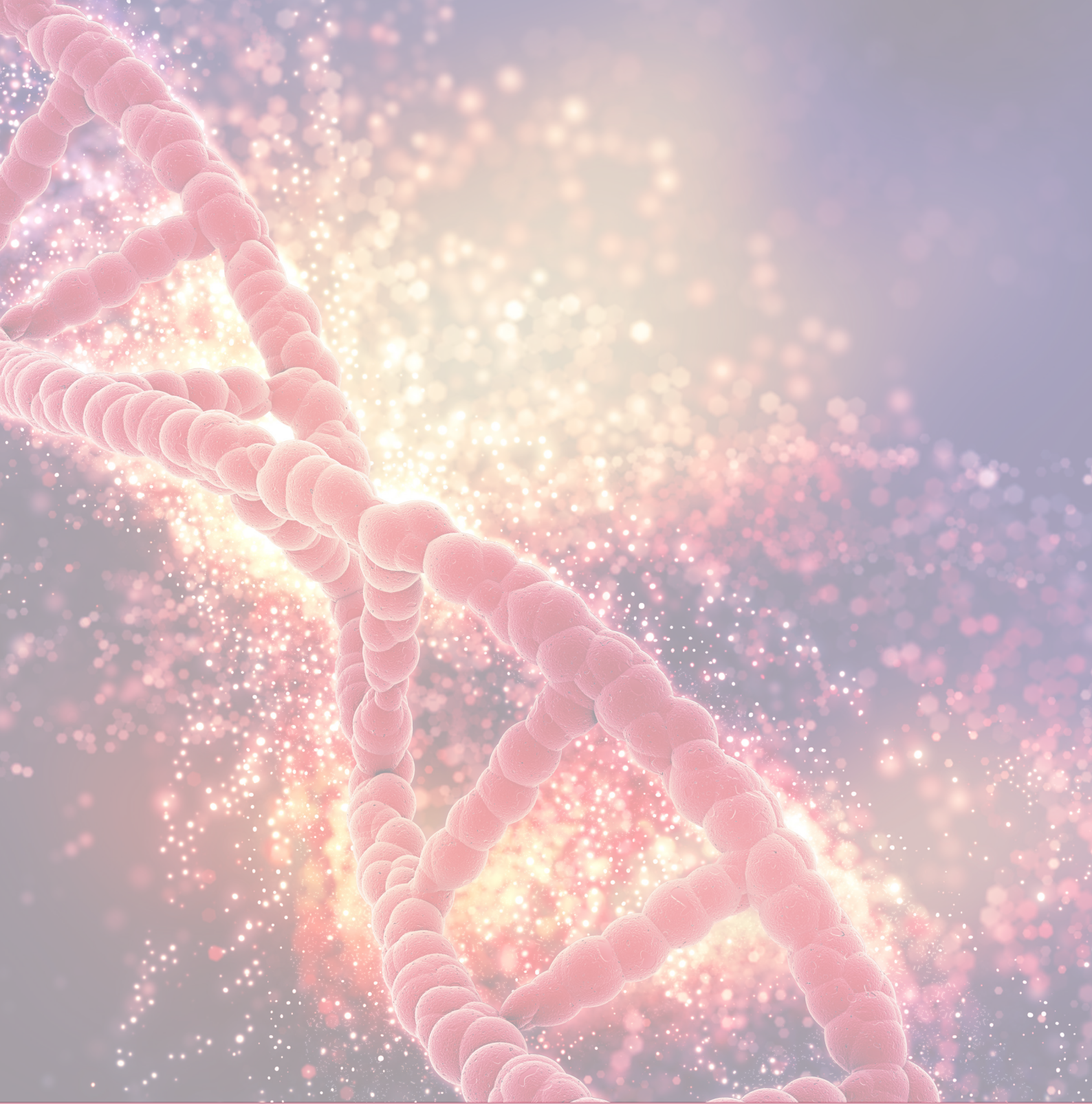
Els pacients portadors del genotip CC per rs4845625 van mostrar una menor freqüència d'aparició de dislipèmia (16.7%) en comparació als portadors de l'al·lel T (TT+CT) amb l'exposició a TCZ (16.7% vs. 36.7%, p=0.04). En la cohort tractada amb sarilumab es va observar la mateixa tendència però sense arribar a la significança estadística.

Per altra banda, si que es van observar associacions entre rs4845625 i l'hepatotoxicitat en ambdós cohorts. En la cohort de pacients tractats amb TCZ, es van observar diferències significatives entre els tres genotips de rs4845625. En la cohort de sarilumab, els portadors del genotip TT per rs4329505 i CC per rs11265618 van mostrar majors taxes d'hepatotoxicitat (14.3% vs. 0%,  $p=0.026$ ).

En la cohort de TCZ, els pacients amb genotip CC per rs11265618 i TT per rs4329505 van presentar majors taxes d'aparició d'EA hematològics respecte els altres respectius genotips. Mentre que en la cohort de sarilumab, no es va detectar cap associació entre els EA hematològics i els SNPs estudiats.

Per altra banda, en la cohort de sarilumab es van detectar noves associacions no vistes en la cohort de TCZ. Els portadors del genotip AA de rs2228145 i CC de rs4537545 van mostrar majors taxes d'aparició de dislipèmia que la resta de genotips corresponents. Els pacients amb genotip silvestre (CC per rs11265618 i TT per rs4329505) van presentar més hepatotoxicitat (14.3% vs. 0%,  $p=0.026$ ) considerant un model genètic dominant.





## **6. Resum global de la discussió**



En aquest apartat es discutiran els principals resultats de la present tesi doctoral, fent divisió entre els resultats obtinguts entre les diferents variants genètiques i els resultats, tant en variables de resposta al tractament com de toxicitat.

## **6.1. Associació entre variables de resposta al tractament i variants genètiques**

En els estudis de TCZ i sarilumab hem avaluat l'associació entre diferents SNPs d'*IL6R* (rs12083537, rs11265618, rs4329505, rs2228145, rs4537545 i rs4845625) i variables de resposta al tractament en pacients amb AR als 6 mesos.

En l'estudi de TCZ, únicament rs4845625 va mostrar associacions estadísticament significatives amb les variables resposta al tractament (milloria de DAS28, resposta EULAR i consecució de LDA per DAS28). Per altra banda, en l'estudi amb sarilumab, es van detectar associacions entre rs4845625, rs4329505 i rs11265618 i algunes de les variables resposta d'aquest estudi (milloria DAS28, consecució de LDA per DAS28 i CDAI). En el cas de la cohort de sarilumab es tracta del primer estudi que examina la farmacogenètica d'aquest fàrmac.

### **6.1.1. rs4845625**

Havent revisat la literatura més recent, s'ha descrit per primera vegada rs4845625 com un potencial biomarcador de resposta al tractament amb TCZ i sarilumab en pacients amb AR. Els presents resultats mostren que els pacients portadors dels genotips TT i CT presenten una milloria major en DAS28 als 6 mesos de tractament amb TCZ respecte els pacients portadors del genotip CC (3.62 i 3.07 vs. 2.36,  $p=0.015$ ). Considerant la variable resposta taxa de LDA per DAS28, els pacients TT+CT van mostrar un 85.6% de baixa activitat en comparació amb el 56.6% dels pacients CC, amb una OR de 4.9 (1.5-15.6). Per últim, els resultats també van ser coherents amb la variable resposta EULAR satisfactòria (que valora la reducció absoluta en DAS28 i l'activitat als 6 mesos) en que també els pacients amb genotip CC van mostrar respostes notablement inferiors.

Aquest primer estudi en la cohort de TCZ, es la primera descripció que es fa de rs4845625 associat a variables de resposta al tractament.

En la cohort de sarilumab, cal destacar que es van afegir les variables de resposta amb milloria quantitativa de CDAI i LDA per CDAI per tal de poder obtenir resultats més robusts degut a la influència dels inhibidors de IL-6 en els reactants de fase aguda. Una influència que és independent de la resposta al tractament, i, per tant, pot alterar la valoració de la resposta al tractament utilitzant DAS28 (137).



En aquest estudi, els pacients amb genotip CC també van mostrar pitjors taxes de consecució de LDA per DAS28 i LDA per CDAI als 6 mesos de tractament amb sarilumab. La diferència amb els genotips TT+CT en CDAI va ser del 31.2% (45.5% vs. 76.7%,  $p=0.021$ ) i en DAS28 del 27.6% (52.4% vs. 80%,  $p=0.037$ ). Tot i no ser estadísticament significatives també es poden apreciar diferències amb les millories absolutes de DAS28 i CDAI.

En primer lloc, aquests resultats destaquen per mostrar diferències de resposta clínicament significatives amb variables de resposta robustes i utilitzades habitualment per guiar l'estratègia de tractament T2T de l'AR. En segon lloc, els resultats són consistents amb els resultats previs obtinguts de la cohort de TCZ, donant més suport a la hipòtesi que variants genètiques en *IL6R* podrien modular la resposta al tractament amb fàrmacs anti-IL-6.

Per tal de d'hipotetitzar el seu mecanisme d'actuació, s'exposen els principals possibles mecanismes implicats i les associacions amb les vies inflamatòries que van portar a la inclusió de rs4845625 en aquests estudis. Aquest SNP està localitzat en l'intró 7 del gen *IL6R* (Chr1 (q21.3) g.154422067). Eines d'anàlisi *in silico* com ESE Finder prediuen que aquest SNP podria alterar el procés de *splicing*, donant així una hipòtesi plausible de com podria afectar aquesta mutació puntual en la quantitat o funcionalitat de proteïna resultant. Aquests canvis podrien alterar la resposta al tractament ja que s'han descrit pitjors respostes al tractament amb TCZ en pacients amb majors concentracions d'IL-6R soluble (138). També recolza aquest possible mecanisme que altres SNPs d'*IL6R* (rs2228145) han demostrat produir variacions en el balanç entre receptor d'IL-6 soluble i de membrana (139).

Tot i no haver-se descrit prèviament en relació a resposta al tractament, si hi ha nombrosa literatura que l'ha relacionat amb canvis en les vies inflamatòries.

En primer lloc, un estudi en població sana orientat a l'estudi de la via IL-6 i la seva relació amb la malaltia cardiovascular, va associar rs4845625, entre d'altres SNPs, amb canvis en concentracions plasmàtiques de IL-6, tot i que la magnitud d'efecte es va considerar lleugera (140). Un altre estudi en una nombrosa cohort amb pacients sans ( $n=995$ ), va relacionar l'al·lel rs4845625\*T amb nivells elevats de PCR, de LDL i d'apolipoproteïna B (136). Rs4845625 també ha estat estudiat en el context de malalties cardiovasculars en diversos estudis, suggerint que aquesta tingui un paper important en les vies inflamatòries de IL-6 i en el risc cardiovascular. (141–144)

Es tracta de la primera descripció de rs4845625 com a potencial biomarcador pel tractament de l'AR tant en pacients tractats amb TCZ com sarilumab. En els estudis inclosos en la present tesi, els resultats són consistents entre les cohorts i mostren resultats amb canvis clínics rellevants. A

més, existeix una base fisiològica que la dota de coherència. Per aquest motiu, es postula aquest SNP en rs4845625 com un possible biomarcador farmacogenètic.

### 6.1.2. rs11265618 i rs4329505

Tal i com s'observa en l'estudi de la cohort de sarilumab, rs4329505 i rs11265618 presenten una herència lligada, de tal manera que els subjectes amb genotip homozigot natural per rs11265618 (CC) són també homozigot natural per rs4329505 (TT). En la cohort de TCZ es va complir aquesta troballa amb la única excepció d'un pacient amb genotips per ambdós SNPs no corresponents. Aquesta herència lligada, explica els resultats gairebé idèntics a l'hora d'avaluar les associacions amb variables de resposta i toxicitat.

En l'estudi de resposta a TCZ, es va observar una tendència no estadísticament significativa que mostrava que els pacients portadors del genotip TT per rs4329505 i CC per rs11265618 presentaven majors taxes de resposta EULAR satisfactòria i milloria quantitativa de DAS28 al comparar-se amb els respectius genotips heterozigots i homozigots mutats.

Sí es van observar diferències estadísticament significatives i clínicament rellevants en l'estudi amb sarilumab, en el mateix sentit que la tendència observada en l'estudi amb TCZ. Es va descriure una reducció quantitativa de DAS28 (2.9 vs. 2,  $p=0.048$ ) com també en taxes de consecució de LDA per CDAI (73.5 vs. 44.4,  $p=0.039$ ).

En l'estudi d'Enevold es va reportar una associació entre el nombre de NAT (un dels ítems avaluats en DAS28 i CDAI) i els genotips de rs4329505 (132). Els pacients amb al·lel C (CT+CC) per rs4329505 van presentar una menor reducció del nombre d'articulacions tumefactes, en la mateixa línia que els nostres resultats. Estudis posteriors al d'Enevold no havien aconseguit trobar resultats estadísticament significatius respecte rs4329505 i variables de resposta al tractament (130, 133). Per altra banda, Maldonado-Montoro sí que va descriure una associació entre el genotip CC per rs11265618 i millor resposta al tractament amb TCZ en termes de LDA (133).

Tot i que els nostres resultats respecte rs11265618 i rs4329505 són prometedors en la cohort de sarilumab i consistents amb les troballes que havíem fet prèviament amb la cohort de TCZ i amb alguns reports en la literatura, cal considerar que també hi ha hagut altres autors que han estudiat aquests SNPs sense trobar-ne associacions. L'herència lligada també dificulta la interpretació dels resultats.

Per tant, considerem que són necessaris més estudis per a confirmar aquests resultats prèviament a considerar aquests dos SNPs com potencials biomarcadors.

En la taula 8 es resumeixen els principals resultats dels estudis referenciats en la discussió que han estudiat els SNPs en *IL6R*.

**Taula 8.**

*Resum resultats dels estudis de SNPs en IL6R*

SNP del gen <i>IL6R</i>	Referència	Població	n	Variable a estudi	Relacions SNP
Rs4845625 Rs4537545	Arguinano et al. 2017	Individus sans	368 + 995	Nivells plasmàtics: -PCR -Colesterol, LDL i ApoB	Rs4845625*T: major PCR, LDL i ApoB Rs4537545*T: menor PCR
rs12083537 rs2228145 rs4329505	Enevold et al. 2014	Pacients amb TCZ	79	Eficàcia als 3m -NAD/NAT -DAS28-PCR -Resposta EULAR	Rs12083537-A: menor eficàcia en NAT Rs 4329505-C: menor eficàcia en NAT Rs 2228145: sense associacions  Haplotip 12083537/228145/4329505 AAC: menor eficàcia en NAT i resposta EULAR
Rs12083537 Rs4329505	Luxembourger et al. 2019	Pacients amb TCZ	164 + 60	Eficàcia als 3m: -Resposta EULAR	rs12083537-AA: major eficàcia en resposta EULAR rs4329505: no associacions
Rs12083537 Rs11265618 Rs2228145 Rs4329505	Maldonado et al. 2018	Pacients amb TCZ	77	Eficàcia als 12m: -Resposta EULAR -Remissió i LDA per DAS28	Rs12083537-AA: major eficàcia en LDA Rs11265618-CC: major eficàcia en LDA Rs2228145 i 4329505: no associacions

## 6.2. Associació entre aparició d'efectes adversos i variants genètiques

Els estudis presentats en l'actual tesi, són els primers en descriure que SNPs en *IL6R* poden influenciar l'aparició d'EA a llarg termini amb l'ús de fàrmacs anti-IL-6R. Amb anterioritat, únicament s'havien reportat associacions entre polimorfismes en *UGT1A1* i hiperbilirrubinèmia en pacients amb AR en població japonesa (134, 145).

Les dades dels estudis en que s'han avaluat EA, mostren un perfil de seguretat molt similar entre els dos fàrmacs anti-IL-6R. Tot i així, trobem certes diferències. En comparació amb les dades de TCZ, es van reportar menys EA totals amb sarilumab, en probable relació amb un menor temps d'exposició al fàrmac, tal i com es mostra en la taula 7. També són destacables una menor taxa d'hepatotoxicitat i l'absència de casos d'infeccions greus.

Tot seguit es discuteixen els principals resultats obtinguts dividits per categoria d'EA.

### 6.2.1. Dislipèmia

En la cohort de pacients tractats amb TCZ es va descriure que els portadors de l'al·lel T (TT+TC) per rs4845625 tenien una major incidència de dislipèmia en comparació amb els portadors del genotip CC (36.7% vs. 16.7%,  $p=0.04$ ).

Tot i trobar els mateixos resultats positius entre rs4845625 i eficàcia en la cohort de sarilumab, no es van detectar associacions estadísticament significatives amb l'aparició de dislipèmia. Tot i així, si s'observa una tendència en el mateix sentit i comparable, ja que els pacients amb genotip CC van tenir dislipèmia en un 16% en comparació amb el 33.3% dels pacients TT+CT ( $p=0.056$ ).

Anteriorment, en l'apartat d'eficàcia de la discussió, s'ha esmentat l'estudi d'Arguinano et al. que ja havia descrit majors nivells de LDL en població sana portadora de l'al·lel T (CT+TT) per rs4845625 (136).

Altres variants genètiques d'*IL6R* també han mostrat associacions únicament en la cohort de pacients amb sarilumab, amb taxes d'aparició superiors en els pacients portadors d'AA per rs2228145 i CC per rs4537545.

Comparant amb els nostres propis resultats en la valoració de resposta al tractament, observem com aquells pacients que aconseguen una major resposta clínica també presenten una major taxa d'aparició de dislipèmia, fet que podria dificultar, *a priori*, el seu posicionament com biomarcador.

Cal conèixer que la dislipèmia és un efecte advers freqüentment reportat i conegut amb els fàrmacs anti-IL-6R i que no ha estat lligat a un augment de risc cardiovascular (146–150). De fet, l'associació entre la inflamació en l'AR i els canvis en el perfil lipídic s'ha descrit com a la “paradoxa lipídica”, ja que pacients sense tractament que tenen un colesterol més baix presenten un major risc cardiovascular (151). Sembla ser que l'estat pro inflamatori de la malaltia, amb l'activació de les vies inflamatòries d'IL-6, provoca una reducció dels lípids en sèrum mediat per la síntesi d'apolipoproteïnes (152), entre d'altres efectes locals directes d'IL-6 en múscul i greix (150). Tot i que els mecanismes encara no són clars, s'ha hipotetitzat que TCZ podria provocar un “augment” de colesterol al revertir els efectes reductors en sèrum que provoca l'activació de les vies pro inflamatòries d'IL-6 (152,153).

En conclusió, es reporten resultats coherents ja que existeixen diverses associacions entre variants genètiques en *IL6R* i l'aparició de dislipèmia en pacients tractats amb anti-IL6R i s'han descrit mecanismes que suporten fisiopatològicament els resultats. Tot i així, la rellevància clínica que poden tenir aquests resultats és dubtosa si no hi ha una repercussió final en quant a increment de risc cardiovascular demostrada.

### 6.2.2. Efectes adversos hematològics

Els EA hematològics han estat els més freqüentment reportats en ambdues cohorts, juntament amb la dislipèmia, i dos SNPs han mostrat associacions estadísticament significatives amb la taxa d'EA hematològics en l'estudi amb TCZ (rs11265618 i rs4329505). Destaca que són resultats consistents amb els prèviament descrits per eficàcia, ja que els pacients amb genotip CC per rs11265618 i TT per rs4329505 són els que presenten més EA hematològics a la vegada que s'han associat a majors taxes de resposta en la literatura, tal i com s'ha esmentat anteriorment. Per contra en la cohort de sarilumab, no es van trobar associacions amb els EA hematològics amb cap de les variants genètiques avaluades.

### 6.2.3. Hepatotoxicitat

En quant a l'hepatotoxicitat, descrita com a hiperbilirrubinèmia o hipertransaminassèmia durant el seguiment, s'han descrit associacions en ambdues cohorts. En la cohort de TCZ els pacients portadors de rs4845625 van mostrar diferències entre els 3 diferents genotips, sense observar-se però una tendència clara.

En els pacients tractats amb sarilumab, els tres genotips que van mostrar associació amb les variables de resposta són els que també mostren associació amb l'aparició de hepatotoxicitat. Destaca a més, que són els mateixos genotips associats a una major eficàcia els que presenten una major taxa d'EA (rs4845625-TT, rs11265618-CC, rsr4329505-TT).



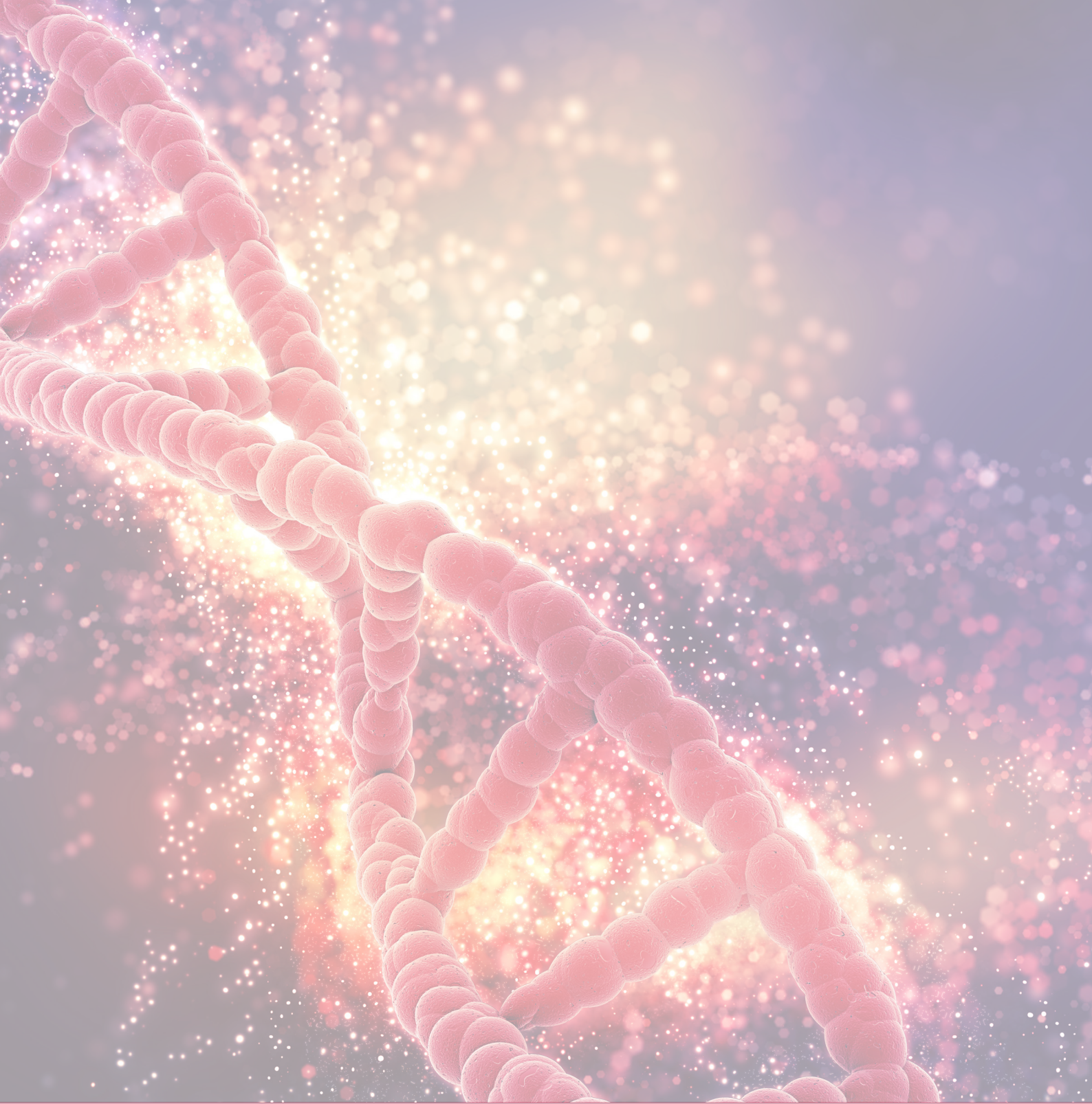
En general, en ambdós cohorts, s'han reportat EA esperats donat el perfil de seguretat dels fàrmacs anti-IL-6R, sent major en la cohort de pacients amb TCZ donat el major temps d'exposició avaluat. Els EA han sigut predominantment de severitat lleugera o moderada i han requerit la discontinuació del tractament en poques ocasions. És per aquest motiu que creiem que els resultats, tot i poder ser consistents o replicables, tenen menor rellevància clínica i, per tant, fan més improbable el desenvolupament d'aquests SNPs com a biomarcadors.

### **6.3. Limitacions**

A l'hora d'interpretar els resultats exposats cal considerar les següents limitacions. El disseny retrospectiu i la relativa petita mostra ha possiblement limitat la capacitat de trobar diverses associacions entre SNPs i resposta al tractament i/o toxicitat. Especialment, en SNPs amb baixes freqüències poblacionals d'al·lel mutats i EA infreqüents.

Cal destacar també l'absència d'un abordatge de GWAS impeding la troballa de possibles nous biomarcadors.

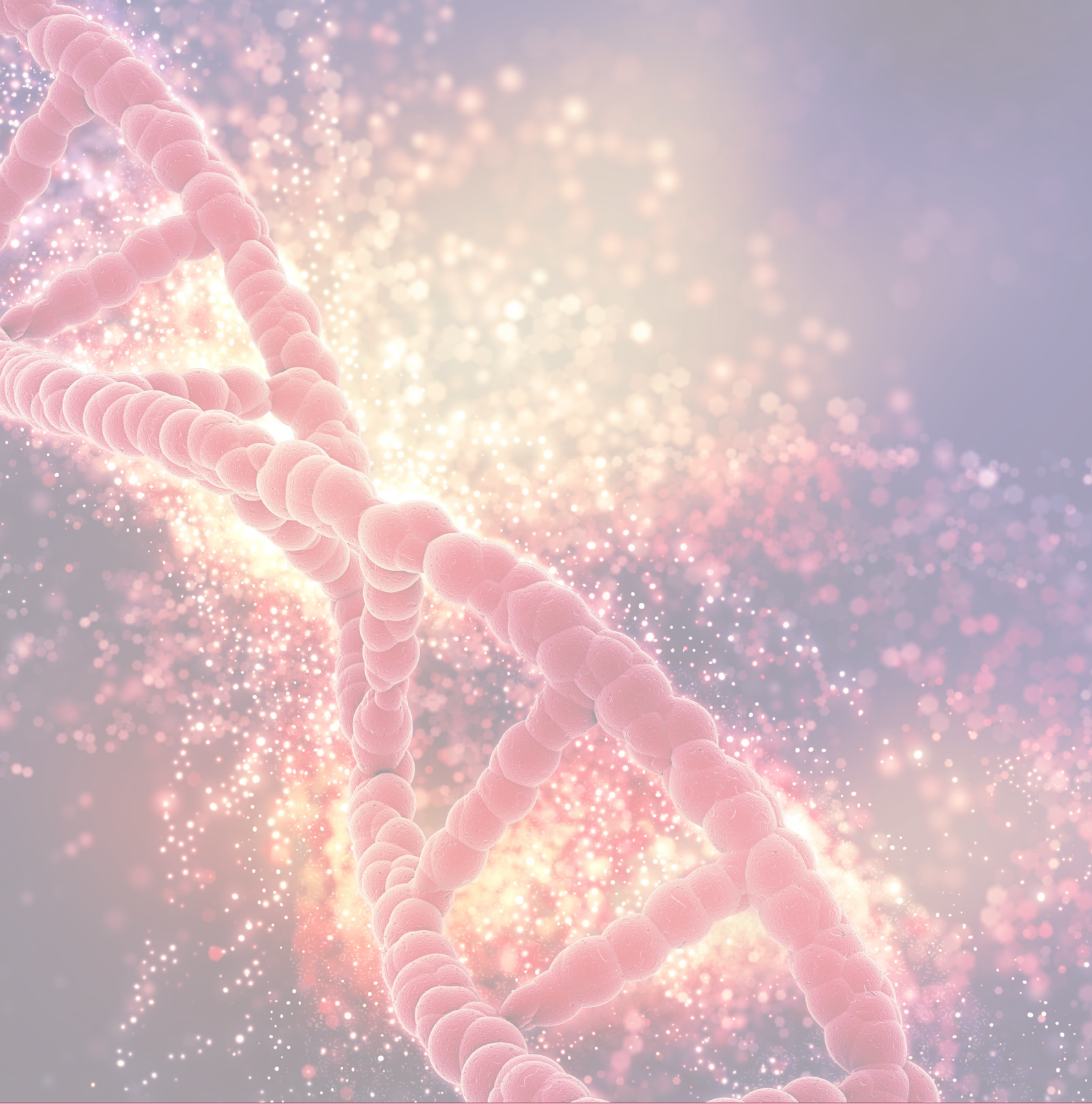
Per contra, els presents resultats destaquen per ser els primers en descriure rs4845625 com a possible biomarcador d'eficàcia amb fàrmacs anti-IL-6R i per ser el primer estudi de farmacogenètica en sarilumab. A més, l'homogeneïtat de les mostres i la consistència dels resultats obtinguts, entre ells i respecte la literatura prèvia, en suporten la validesa.



## **7. Conclusions**

- 1- Els SNPs del gen *IL6R* s'associen a diferències de resposta al tractament amb fàrmacs inhibidors d'IL-6R en pacients amb artritis reumatoide.
- 2- El SNP rs4845625 s'associa a diferències clínicament significatives en variables de resposta al tractament als 6 mesos, en pacients amb artritis reumatoide tractats tant amb tocilizumab com amb sarilumab.
- 3- Les variants genètiques rs4329505 i rs11265618 s'associen a canvis de resposta al tractament amb sarilumab als 6 mesos. Tot i no aconseguir resultats estadísticament significatius, s'observa una tendència coherent en la cohort de pacients tractats amb tocilizumab.
- 4- Gairebé tots els SNPs d'*IL6R* estudiats (rs2228145, rs4329505, rs11265618, rs4537545 i rs4845625), han estat associades a diversos efectes adversos (hepatotoxicitat, alteracions hematològiques i dislipèmia) en ambdues cohorts. Considerant la severitat d'aquests i l'efecte en la discontinuació del tractament, es pot concloure que presenten una significança clínicament limitada.
- 5- Valorant el conjunt de resultats, es proposa rs4845625 com un biomarcador farmacogenètic per a predir la resposta al tractament amb fàrmacs inhibidors d'IL-6R en pacients amb artritis reumatoide.





## **8. Línies de futur**

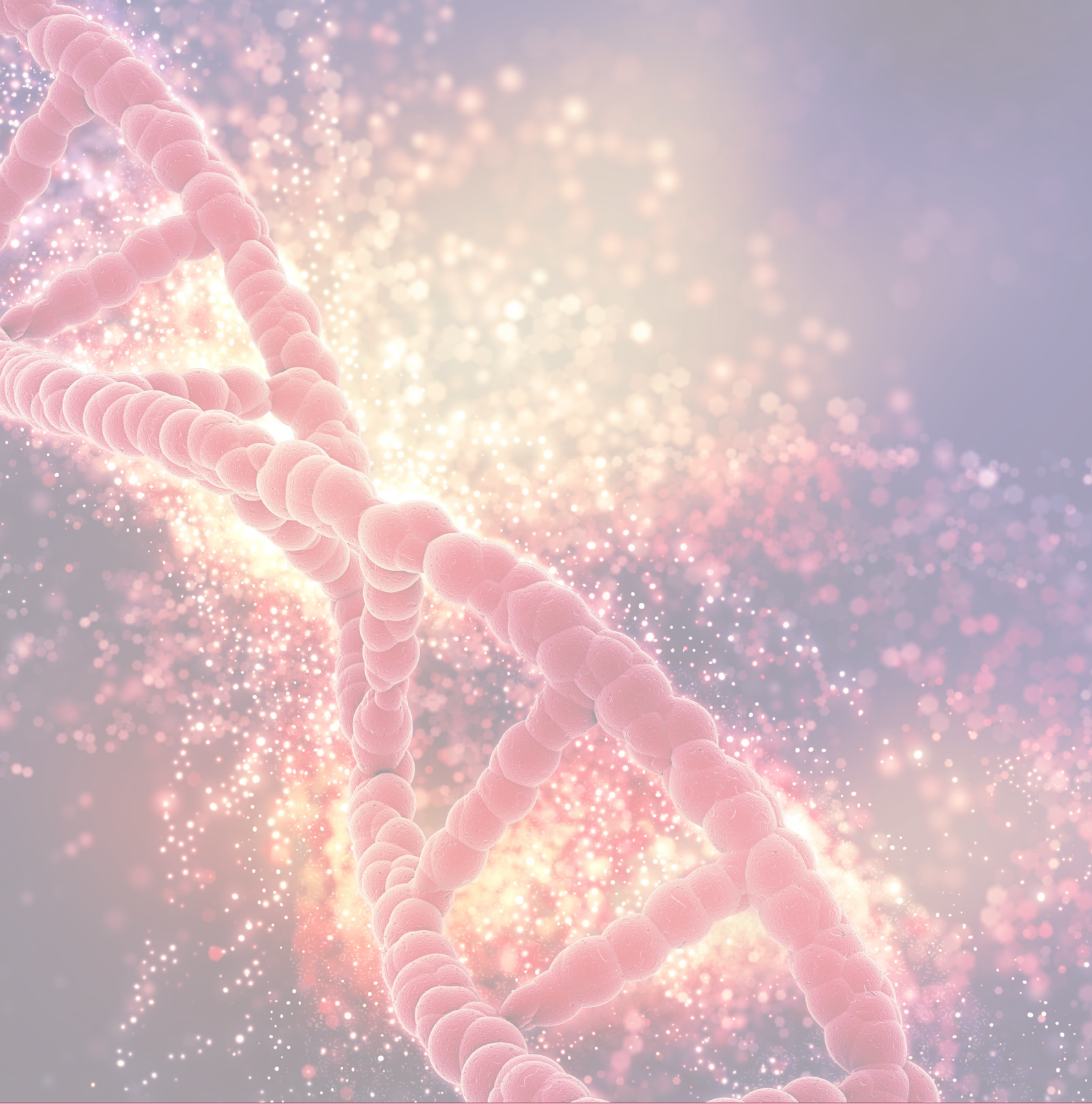
Es desprenen diverses línies d'investigació bàsica i clínica en farmacogenètica dels resultats de la present tesi.

En primer lloc, és important dotar de major base fisiopatogènica a les troballes, estudiant els canvis quantitativs i qualitativs que es produeixen en la síntesi proteica d'IL-6R quan es donen aquestes variants genètiques en *IL6R*.

També és cabdal validar els resultats amb nous estudis farmacogenètics, especialment amb rs4845625, provant de replicar aquests resultats en altres poblacions, idealment en estudis multicèntrics i amb major mostra.

Per últim, per tal d'establir la utilitat clínica dels SNPs estudiats, caldrà realitzar assajos clínics en que el tractament vingui determinat per l'estudi genètic del gen d'*IL6R*. Serà d'especial interès en cohorts d'artritis reumatoide precoç, per tal de poder avaluar quin impacte té la tria individualitzada d'un primer FAMMb en base a marcadors farmacogenètics, en qualitat de vida del pacient i en evolució de la malaltia a mitjà i llarg termini.





## **9. Bibliografia**

1. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2016 Oct;388(10055):2023–38.
2. Scott DL, Wolfe F, Huizinga TW. Rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2010 Sep;376(9746):1094–108.
3. Smolen JS, Breedveld FC, Burmester GR, Bykerk V, Dougados M, Emery P, et al. Treating rheumatoid arthritis to target: 2014 update of the recommendations of an international task force. *Ann Rheum Dis*. 2016 Jan;75(1):3–15.
4. Burmester GR, Pope JE. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis. *The Lancet*. 2017 Jun 10;389(10086):2338–48.
5. Goekoop-Ruiterman YPM, de Vries-Bouwstra JK, Allaart CF, van Zeben D, Kerstens PJSM, Hazes JMW, et al. Comparison of treatment strategies in early rheumatoid arthritis: a randomized trial. *Ann Intern Med*. 2007 Mar 20;146(6):406–15.
6. Burmester GR, Rigby WF, Van Vollenhoven RF, Kay J, Rubbert-Roth A, Kelman A, et al. Tocilizumab in early progressive rheumatoid arthritis: FUNCTION, a randomised controlled trial. *Rheum Dis [Internet]*. 2016;75:1081–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-207628>
7. Verstappen SMM, Jacobs G, Van Der Veen MJ, Heurkens AHM, Schenk Y, Ter Borg EJ, et al. Intensive treatment with methotrexate in early rheumatoid arthritis: aiming for remission. Computer Assisted Management in Early Rheumatoid Arthritis (CAMERA, an open-label strategy trial). *Ann Rheum Dis [Internet]*. 2007;66:1443–9. Available from: <http://ard.bmj.com/>
8. Quinn MA, Conaghan PG, O PJ, Karim Z, Greenstein A, Brown A, et al. Very Early Treatment With Infliximab in Addition to Methotrexate in Early, Poor-Prognosis Rheumatoid Arthritis Reduces Magnetic Resonance Imaging Evidence of Synovitis and Damage, With Sustained Benefit After Infliximab Withdrawal Results From a Twelve-Month Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Arthritis Rheum*. 2005;52(1):27–35.
9. J Bijlsma JW, J Welsing PM, Woodworth TG, Middelink LM, Pethö-Schramm A, Bernasconi C, et al. Early rheumatoid arthritis treated with tocilizumab, methotrexate, or their combination (U-Act-Early): a multicentre, randomised, double-blind, double-dummy, strategy trial. *The Lancet [Internet]*. 2016;388:343–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/>
10. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the global burden of disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014 Jul;73(7):1316–22.
11. Alamanos Y, Voulgari P V., Drosos AA. Incidence and Prevalence of Rheumatoid Arthritis, Based on the 1987 American College of Rheumatology Criteria: A Systematic Review. *Semin Arthritis Rheum*. 2006 Dec;36(3):182–8.

12. Silva-Fernández L, Macía-Villa C, Seoane-Mato D, Cortés-Verdú R, Romero-Pérez A, Quevedo-Vila V, et al. The prevalence of rheumatoid arthritis in Spain. *Sci Rep*. 2020 Dec 9;10(1):21551.
13. Viatte S, Plant D, Raychaudhuri S. Genetics and epigenetics of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2013 Mar;9(3):141–53.
14. MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K, et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum*. 2000 Jan;43(1):30–7.
15. Silman Aj, Macgregor Aj, Thomson W, Holligan S, Carthy D, Farhan A, et al. Twin Concordance Rates for Rheumatoid Arthritis: Results from a Nationwide Study. *Rheumatology*. 1993;32(10):903–7.
16. Okada Y, Wu D, Trynka G, Raj T, Terao C, Ikari K, et al. Genetics of rheumatoid arthritis contributes to biology and drug discovery. *Nature*. 2014 Feb 25;506(7488):376–81.
17. Dedmon LE. The genetics of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2020 Oct 1;59(10):2661–70.
18. Huizinga TWJ, Amos CI, van der Helm-van Mil AHM, Chen W, van Gaalen FA, Jawaheer D, et al. Refining the complex rheumatoid arthritis phenotype based on specificity of the HLA–DRB1 shared epitope for antibodies to citrullinated proteins. *Arthritis Rheum*. 2005 Nov 27;52(11):3433–8.
19. Okada Y, Eyre S, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum Dis*. 2019 Apr;78(4):446–53.
20. McInnes IB, Schett G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2011 Dec 8;365(23):2205–19.
21. Kallberg H, Padyukov L, Plenge RM, Ronnelid J, Gregersen PK, van der Helm-van Mil AHM, et al. Gene-gene and gene-environment interactions involving HLA-DRB1, PTPN22, and smoking in two subsets of rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet*. 2007 May;80(5):867–75.
22. Costenbader KH, Feskanich D, Mandl LA, Karlson EW. Smoking Intensity, Duration, and Cessation, and the Risk of Rheumatoid Arthritis in Women. *Am J Med*. 2006 Jun;119(6):503.e1-503.e9.
23. Karlson EW, Lee IM, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Hennekens CH. A retrospective cohort study of cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis in female health professionals. *Arthritis Rheum*. 1999 May;42(5):910–7.
24. Uhlig T, Hagen KB, Kvien TK. Current tobacco smoking, formal education, and the risk of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1999 Jan;26(1):47–54.
25. Vessey MP, Villard-Mackintosh L, Yeates D. Oral contraceptives, cigarette smoking and other factors in relation to arthritis. *Contraception*. 1987 May;35(5):457–64.
26. Sugiyama D, Nishimura K, Tamaki K, Tsuji G, Nakazawa T, Morinobu A, et al. Impact of smoking as a risk factor for developing rheumatoid arthritis: a meta-analysis of observational studies. *Ann Rheum Dis*. 2010 Jan;69(01):70–81.



27. Di Giuseppe D, Discacciati A, Orsini N, Wolk A. Cigarette smoking and risk of rheumatoid arthritis: a dose-response meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):R61.
28. Nelson JL, Østensen M. Pregnancy and Rheumatoid Arthritis. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 1997 Feb;23(1):195–212.
29. Straub RH. Benefit of pregnancy in inflammatory arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Jun 1;64(6):801–3.
30. Wallenius M, Skomsvoll JF, Irgens LM, Salvesen KÅ, Koldingsnes W, Mikkelsen K, et al. Postpartum onset of rheumatoid arthritis and other chronic arthritides: results from a patient register linked to a medical birth registry. *Ann Rheum Dis*. 2010 Feb;69(2):332–6.
31. SILMAN AJ. Parity Status and the Development of Rheumatoid Arthritis. *American Journal of Reproductive Immunology*. 1992 Oct 12;28(3–4):228–30.
32. Pikwer M, Orellana C, Källberg H, Pikwer A, Turesson C, Klareskog L, et al. Parity influences the severity of ACPA-negative early rheumatoid arthritis: a cohort study based on the Swedish EIRA material. *Arthritis Res Ther*. 2015 Dec 12;17(1):358.
33. Barrett JH, Brennan P, Fiddler M, Silman A. Breast-feeding and postpartum relapse in women with rheumatoid and inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*. 2000 May;43(5):1010.
34. Alpízar-Rodríguez D, Pluchino N, Canny G, Gabay C, Finckh A. The role of female hormonal factors in the development of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2016 Sep 29;kew318.
35. Bodkhe R, Balakrishnan B, Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2019 Jan 30;11:1759720X1984463.
36. Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*. 2010 Dec 7;6(12):727–30.
37. de Pablo P, Dietrich T, McAlindon TE. Association of periodontal disease and tooth loss with rheumatoid arthritis in the US population. *J Rheumatol*. 2008 Jan;35(1):70–6.
38. Li Y, Guo R, Oduro PK, Sun T, Chen H, Yi Y, et al. The Relationship Between *Porphyromonas Gingivalis* and Rheumatoid Arthritis: A Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 18;12.
39. Malmström V, Catrina AI, Klareskog L. The immunopathogenesis of seropositive rheumatoid arthritis: from triggering to targeting. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jan 5;17(1):60–75.
40. Klareskog L, Catrina AI. Lungs and citrullination. *Nat Rev Rheumatol*. 2015 May 17;11(5):261–2.
41. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 8;22(5).
42. Srirangan S, Choy EH. The role of interleukin 6 in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2010 Oct;2(5):247–56.
43. van Delft MAM, Huizinga TWJ. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun*. 2020 Jun;110:102392.

44. Zvaifler NJ. The Immunopathology of Joint Inflammation in Rheumatoid Arthritis. In 1973. p. 265–336.
45. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, Bingham CO, et al. 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* 2010 Sep;62(9):2569–81.
46. Lane SK, Gravel JW. Clinical utility of common serum rheumatologic tests. *Am Fam Physician.* 2002 Mar 15;65(6):1073–80.
47. Nielen MMJ. Antibodies to citrullinated human fibrinogen (ACF) have diagnostic and prognostic value in early arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Aug 1;64(8):1199–204.
48. Nell VPK. Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.* 2005 Dec 1;64(12):1731–6.
49. Goronzy JJ, Matteson EL, Fulbright JW, Warrington KJ, Chang-Miller A, Hunder GG, et al. Prognostic markers of radiographic progression in early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004 Jan 9;50(1):43–54.
50. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis.* 2015 Dec;74(12):2151–6.
51. van Gaalen F, Ioan-Facsinay A, Huizinga TWJ, Toes REM. The Devil in the Details: The Emerging Role of Anticitrulline Autoimmunity in Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Immunology.* 2005 Nov 1;175(9):5575–80.
52. Nielen MMJ, van Schaardenburg D, Reesink HW, van de Stadt RJ, van der Horst-Bruinsma IE, de Koning MHMT, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: A study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum.* 2004 Feb 5;50(2):380–6.
53. van Gaalen FA, Linn-Rasker SP, van Venrooij WJ, de Jong BA, Breedveld FC, Verweij CL, et al. Autoantibodies to cyclic citrullinated peptides predict progression to rheumatoid arthritis in patients with undifferentiated arthritis: A prospective cohort study. *Arthritis Rheum.* 2004 Mar 5;50(3):709–15.
54. Meyer O, Nicaise-Roland P, Santos M, Labarre C, Dougados M, Goupille P, et al. Serial determination of cyclic citrullinated peptide autoantibodies predicted five-year radiological outcomes in a prospective cohort of patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2006;8(2):R40.
55. Shi J, van Veelen PA, Mahler M, Janssen GMC, Drijfhout JW, Huizinga TWJ, et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. *Autoimmun Rev.* 2014 Mar;13(3):225–30.



56. Shi J, van de Stadt LA, Levarht EWN, Huizinga TWJ, Toes REM, Trouw LA, et al. Brief Report: Anti-Carbamylated Protein Antibodies Are Present in Arthralgia Patients and Predict the Development of Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Rheum*. 2013 Apr 28;65(4):911–5.
57. Shi J, Knevel R, Suwannalai P, van der Linden MP, Janssen GMC, van Veelen PA, et al. Autoantibodies recognizing carbamylated proteins are present in sera of patients with rheumatoid arthritis and predict joint damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Oct 18;108(42):17372–7.
58. Trouw LA, Huizinga TWJ, Toes REM. Autoimmunity in rheumatoid arthritis: different antigens—common principles. *Ann Rheum Dis*. 2013 Apr;72(suppl 2):ii132–6.
59. Edwards JC, Willoughby DA. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann Rheum Dis*. 1982 Apr 1;41(2):177–82.
60. Klippel JH DP. *Rheumatoid Synovitis and Pannus*. 2nd ed. *Rheumatology*, editor. London; 1994.
61. Lee DM, Weinblatt ME. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2001 Sep 15;358(9285):903–11.
62. van Steenberg HW, Huizinga TWJ, van der Helm-van Mil AHM. Review: The Preclinical Phase of Rheumatoid Arthritis: What Is Acknowledged and What Needs to be Assessed? *Arthritis Rheum*. 2013 Sep 26;65(9):2219–32.
63. van Steenberg HW, Aletaha D, Beart-van de Voorde LJJ, Brouwer E, Codreanu C, Combe B, et al. EULAR definition of arthralgia suspicious for progression to rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Mar;76(3):491–6.
64. Combe B, Landewe R, Daien CI, Hua C, Aletaha D, Álvaro-Gracia JM, et al. 2016 update of the EULAR recommendations for the management of early arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2017 Jun;76(6):948–59.
65. Breedveld F. The value of early intervention in RA--a window of opportunity. *Clin Rheumatol*. 2011 Mar;30 Suppl 1:S33-9.
66. Mitrović J, Hrkač S, Tečer J, Golob M, Ljilja Posavec A, Kolar Mitrović H, et al. Pathogenesis of Extraarticular Manifestations in Rheumatoid Arthritis—A Comprehensive Review. *Biomedicines*. 2023 Apr 24;11(5):1262.
67. Chua-Aguilera CJ, Möller B, Yawalkar N. Skin Manifestations of Rheumatoid Arthritis, Juvenile Idiopathic Arthritis, and Spondyloarthritides. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2017 Dec 27;53(3):371–93.
68. Szkudlarek M, Klarlund M, Narvestad E, Court-Payen M, Strandberg C, Jensen KE, et al. Ultrasonography of the metacarpophalangeal and proximal interphalangeal joints in rheumatoid arthritis: a comparison with magnetic resonance imaging, conventional radiography and clinical examination. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(2):R52.

69. Smolen JS, Landewé RBM, Bergstra SA, Kerschbaumer A, Sepriano A, Aletaha D, et al. EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2022 update. *Ann Rheum Dis*. 2023 Jan;82(1):3–18.
70. Nagy G, Roodenrijs NMT, Welsing PMJ, Kedves M, Hamar A, van der Goes MC, et al. EULAR points to consider for the management of difficult-to-treat rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2022 Jan;81(1):20–33.
71. Micu MC, Fodor D. Concepts in monitoring the treatment in rheumatoid arthritis – the role of musculoskeletal ultrasound. Part I: synovitis. *Med Ultrason*. 2015 Sep 1;17(3):367.
72. do Prado AD, Staub HL, Bisi MC, da Silveira IG, Mendonça JA, Polido-Pereira J, et al. Ultrasound and its clinical use in rheumatoid arthritis: where do we stand? *Advances in Rheumatology*. 2018 Dec 2;58(1):19.
73. Silvagni E, Zandonella Callegher S, Mauric E, Chiricolo S, Schreiber N, Tullio A, et al. Musculoskeletal ultrasound for treating rheumatoid arthritis to target—a systematic literature review. *Rheumatology*. 2022 Nov 28;61(12):4590–602.
74. Geng Y, Wang L, Zhang X, Ji L, Deng X, Zhang Z. Treat-to-target strategies aiming at additional ultrasound remission is associated with better control of disease activity and less flare in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol*. 2021 Jan 8;40(1):113–21.
75. Díaz-Torné C, Moragues C, Toniolo E, Geli C, Castellví I, Moya P, et al. Impact of ultrasonography on treatment decision in rheumatoid arthritis: the IMPULSAR study. *Rheumatol Int*. 2017 Jun;37(6):891–6.
76. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, Mcshane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The american rheumatism association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1988 Mar 29;31(3):315–24.
77. Tugwell P, Boers M. Developing consensus on preliminary core efficacy endpoints for rheumatoid arthritis clinical trials. OMERACT Committee. *J Rheumatol*. 1993 Mar;20(3):555–6.
78. Felson DT, Smolen JS, Wells G, Zhang B, van Tuyl LHD, Funovits J, et al. American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism Provisional Definition of Remission in Rheumatoid Arthritis for Clinical Trials. *Ann Rheum Dis*. 2011 Mar 3;70(3):404–13.
79. Smolen JS, Aletaha D. Scores for all seasons: SDAI and CDAI. *Clin Exp Rheumatol*. 2014;32(5 Suppl 85):S-75-9.
80. Wolfe F, Hawley DJ. Remission in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*. 1985 Apr;12(2):245–52.
81. Pinals RS, Masi AT, Larsen RA. Preliminary criteria for clinical remission in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1981 Oct 11;24(10):1308–15.
82. Felson DT. Choosing a core set of disease activity measures for rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol*. 1993 Mar;20(3):531–4.

83. Boers M, Tugwell P, Felson DT, van Riel PL, Kirwan JR, Edmonds JP, et al. World Health Organization and International League of Associations for Rheumatology core endpoints for symptom modifying antirheumatic drugs in rheumatoid arthritis clinical trials. *J Rheumatol Suppl.* 1994 Sep;41:86–9.
84. Van Riel Plcm. Provisional Guidelines for Measuring Disease Activity in Clinical Trials on Rheumatoid Arthritis. *Rheumatology.* 1992;31(12):793–4.
85. van Gestel AM, Anderson JJ, van Riel PL, Boers M, Haagsma CJ, Rich B, et al. ACR and EULAR improvement criteria have comparable validity in rheumatoid arthritis trials. American College of Rheumatology European League of Associations for Rheumatology. *J Rheumatol.* 1999 Mar;26(3):705–11.
86. Aletaha D, Ward MM, Machold KP, Nell VPK, Stamm T, Smolen JS. Remission and Active Disease in Rheumatoid Arthritis Defining Criteria for Disease Activity States. *Arthritis Rheum.* 2005;52(9):2625–36.
87. Smolen JS, Aletaha D. Rheumatoid arthritis therapy reappraisal: strategies, opportunities and challenges. *Nat Rev Rheumatol.* 2015 May 17;11(5):276–89.
88. Favalli EG, Biggioggero M, Marchesoni A, Meroni PL. Survival on treatment with second-line biologic therapy: a cohort study comparing cycling and swap strategies. *Rheumatology.* 2014 Sep 1;53(9):1664–8.
89. Wei W, Knapp K, Wang L, Chen CI, Craig GL, Ferguson K, et al. Treatment Persistence and Clinical Outcomes of Tumor Necrosis Factor Inhibitor Cycling or Switching to a New Mechanism of Action Therapy: Real-world Observational Study of Rheumatoid Arthritis Patients in the United States with Prior Tumor Necrosis Factor Inhibitor Therapy. *Adv Ther.* 2017 Aug 3;34(8):1936–52.
90. Park DJ, Choi SE, Kang JH, Shin K, Sung YK, Lee SS. Comparison of the efficacy and risk of discontinuation between non-TNF-targeted treatment and a second TNF inhibitor in patients with rheumatoid arthritis after first TNF inhibitor failure. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2022 Jan 19;14:1759720X2210914.
91. Hobl EL, Mader RM, Erlacher L, Duhm B, Mustak M, Bröll H, et al. The influence of methotrexate on the gene expression of the pro-inflammatory cytokine IL-12A in the therapy of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol.* 2011;29(6):963–9.
92. Spurlock CF, Gass HM, Bryant CJ, Wells BC, Olsen NJ, Aune TM. Methotrexate-mediated inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation by distinct pathways in T cells and fibroblast-like synoviocytes. *Rheumatology.* 2015 Jan;54(1):178–87.
93. Montesinos MC, Takedachi M, Thompson LF, Wilder TF, Fernández P, Cronstein BN. The antiinflammatory mechanism of methotrexate depends on extracellular conversion of adenine nucleotides to adenosine by ecto-5'-nucleotidase: Findings in a study of ecto-5'-nucleotidase gene-deficient mice. *Arthritis Rheum.* 2007 May 27;56(5):1440–5.

94. Sauer AV, Brigida I, Carriglio N, Aiuti A. Autoimmune Dysregulation and Purine Metabolism in Adenosine Deaminase Deficiency. *Front Immunol.* 2012;3.
95. Harrington R, Al Nokhatha SA, Conway R. <p>JAK Inhibitors in Rheumatoid Arthritis: An Evidence-Based Review on the Emerging Clinical Data</p>. *J Inflamm Res.* 2020 Sep;Volume 13:519–31.
96. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017 Nov 1;77(17):1865–79.
97. Gabay C, Emery P, van Vollenhoven R, Dikranian A, Alten R, Pavelka K, et al. Tocilizumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for treatment of rheumatoid arthritis (ADACTA): a randomised, double-blind, controlled phase 4 trial. *Lancet.* 2013 May 4;381(9877):1541–50.
98. Jones G, Wallace T, Mcintosh MJ, Brockwell L, Gómez-Reino JJ, Sebba A. Five-year Efficacy and Safety of Tocilizumab Monotherapy in Patients with Rheumatoid Arthritis Who Were Methotrexate- and Biologic-naive or Free of Methotrexate for 6 Months: the AMBITION Study. *J Rheumatol [Internet].* 2017;44(2):142–8. Available from: [www.jrheum.org](http://www.jrheum.org)
99. Hashimoto J, Garnero P, Heijde D, Miyasaka N, Yamamoto K, Kawai S, et al. Humanized anti-interleukin-6-receptor antibody (tocilizumab) monotherapy is more effective in slowing radiographic progression in patients with rheumatoid arthritis at high baseline risk for structural damage evaluated with levels of biomarkers, radiography, and BMI: data from the SAMURAI study. *Mod Rheumatol.* 2011 Feb 24;21(1):10–5.
100. Fleischmann Rm, Halland Am, Brzosko M, Burgos-Vargas R, Mela C, Vernon E, et al. Tocilizumab Inhibits Structural Joint Damage and Improves Physical Function in Patients with Rheumatoid Arthritis and Inadequate Responses to Methotrexate: LITHE Study 2-year Results. *J Rheumatol.* 2013 Feb 15;40(2):113–26.
101. Ramos-Remus C, Muriel-Vizcaino R. The OPTION trial: inhibition of the interleukin-6 receptor with tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis. *Fut Rheumatol.* 2008 Oct;3(5):429–34.
102. Scott LJ. Tocilizumab: A Review in Rheumatoid Arthritis. *Drugs.* 2017 Nov;77(17):1865–79.
103. Genovese MC, Fleischmann R, Kivitz AJ, Rell-Bakalarska M, Martincova R, Fiore S, et al. Sarilumab Plus Methotrexate in Patients With Active Rheumatoid Arthritis and Inadequate Response to Methotrexate: Results of a Phase III Study. *Arthritis & Rheumatology.* 2015 Jun 25;67(6):1424–37.
104. Fleischmann R, van Adelsberg J, Lin Y, Castelar-Pinheiro G da R, Brzezicki J, Hrycaj P, et al. Sarilumab and Nonbiologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Patients With Active Rheumatoid Arthritis and Inadequate Response or Intolerance to Tumor Necrosis Factor Inhibitors. *Arthritis & Rheumatology.* 2017 Feb 28;69(2):277–90.

105. Burmester GR, Lin Y, Patel R, van Adelsberg J, Mangan EK, Graham NMH, et al. Efficacy and safety of sarilumab monotherapy versus adalimumab monotherapy for the treatment of patients with active rheumatoid arthritis (MONARCH): a randomised, double-blind, parallel-group phase III trial. *Ann Rheum Dis*. 2017 May;76(5):840–7.
106. Rafique A, Martin J, Blome M, Huang T, Ouyang A, Papadopoulos N. AB0037 Evaluation of the binding kinetics and functional bioassay activity of sarilumab and tocilizumab to the human il-6 receptor (il-6r) alpha. *Ann Rheum Dis*. 2013 Jun 23;72(Suppl 3):A797.1-A797.
107. Ruderman EM. IL-6 inhibition in RA—déjà vu all over again? *Nat Rev Rheumatol*. 2015 Jun 28;11(6):321–2.
108. Weinshilboum R. Inheritance and Drug Response. *New England Journal of Medicine*. 2003 Feb 6;348(6):529–37.
109. Saif MW. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene (DPYD) polymorphism among Caucasian and non-Caucasian patients with 5-FU- and capecitabine-related toxicity using full sequencing of DPYD. *Cancer Genomics Proteomics*. 2013;10(2):89–92.
110. Dean L. Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. 2012.
111. Wysocki T, Paradowska-Gorycka A. Pharmacogenomics of Anti-TNF Treatment Response Marks a New Era of Tailored Rheumatoid Arthritis Therapy. 2022; Available from: <https://doi.org/10.3390/ijms23042366>
112. Dean, L. (2015). Irinotecan Therapy and UGT1A1 Genotype. In V. M. Pratt (Eds.) et. al., *Medical Genetics Summaries*. National Center for Biotechnology Information (US).
113. Cao M, Guo M, Wu DQ, Meng L. Pharmacogenomics of Methotrexate: Current Status and Future Outlook. *Curr Drug Metab*. 2018;19(14):1182–7.
114. Salazar J, Moya P, Altés A, Díaz-Torné C, Casademont J, Cerdà-Gabaroí D, et al. Polymorphisms in genes involved in the mechanism of action of methotrexate: are they associated with outcome in rheumatoid arthritis patients? *Pharmacogenomics*. 2014 Jun;15(8):1079–90.
115. Moya P, Salazar J, Arranz MJ, Díaz-Torné C, del Río E, Casademont J, et al. Methotrexate pharmacokinetic genetic variants are associated with outcome in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics*. 2016;17(1):25–9.
116. Jekic B, Maksimovic N, Damnjanovic T. Methotrexate pharmacogenetics in the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics*. 2019;20(17):1235–45.
117. Canete JD, Suarez B, Hernandez M V, Sanmarti R, Rego I, Celis R, et al. Influence of variants of Fc receptors IIA and IIIA on the American College of Rheumatology and European League Against Rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor therapy in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2009 Oct 1;68(10):1547–52.
118. Avila-Pedretti G, Tornero J, Fernández-Nebro A, Blanco F, González-Alvaro I, Cañete JD, et al. Variation at FCGR2A and Functionally Related Genes Is Associated with the Response to Anti-TNF Therapy in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2015 Apr 7;10(4):e0122088.



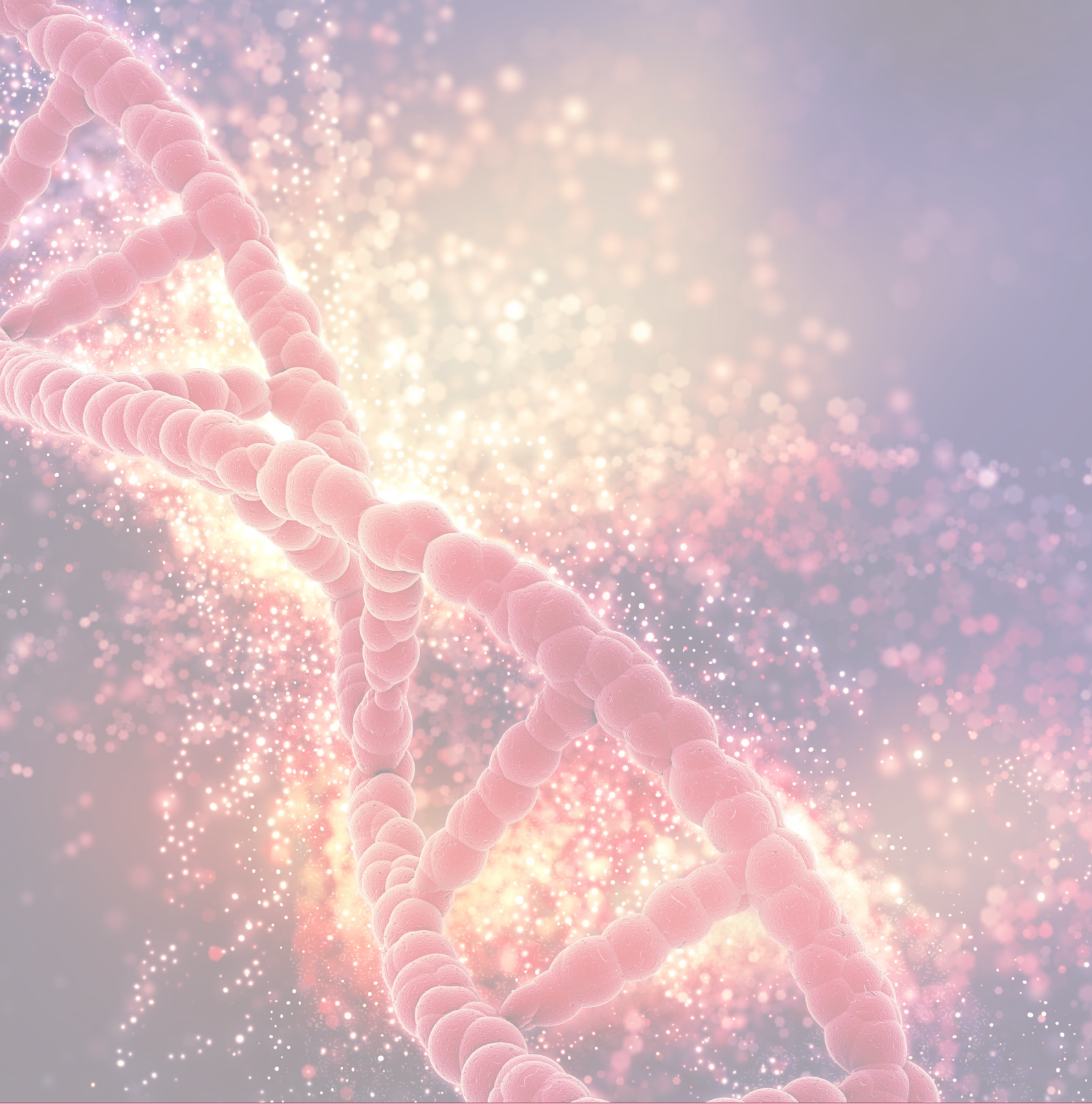
119. Ruysse-Witrand A, Rouanet S, Combe B, Dougados M, Le Loët X, Sibilia J, et al. Fcγ receptor type IIIA polymorphism influences treatment outcomes in patients with rheumatoid arthritis treated with rituximab. *Ann Rheum Dis*. 2012 Jun;71(6):875–7.
120. Quartuccio L, Fabris M, Pontarini E, Salvin S, Zabotti A, Benucci M, et al. The 158VV Fcγ receptor 3A genotype is associated with response to rituximab in rheumatoid arthritis: results of an Italian multicentre study. *Ann Rheum Dis*. 2014 Apr;73(4):716–21.
121. Jiménez Morales A, Maldonado-Montoro M, Martínez de la Plata JE, Pérez Ramírez C, Daddaoua A, Alarcón Payer C, et al. FCGR2A/FCGR3A Gene Polymorphisms and Clinical Variables as Predictors of Response to Tocilizumab and Rituximab in Patients With Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Clinical Pharmacology*. 2019 Apr 20;59(4):517–31.
122. O’Rielly DD, Roslin NM, Beyene J, Pope A, Rahman P. TNF-α –308 G/A polymorphism and responsiveness to TNF-α blockade therapy in moderate to severe rheumatoid arthritis: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacogenomics J*. 2009 Jun 14;9(3):161–7.
123. Maxwell JR, Potter C, Hyrich KL, Barton A, Worthington J, Isaacs JD, et al. Association of the tumour necrosis factor-308 variant with differential response to anti-TNF agents in the treatment of rheumatoid arthritis. *Hum Mol Genet*. 2008 Nov 15;17(22):3532–8.
124. Zeng Z, Duan Z, Zhang T, Wang S, Li G, Gao J, et al. Association between tumor necrosis factor-α (TNF-α) promoter –308 G/A and response to TNF-α blockers in rheumatoid arthritis: a meta-analysis. *Mod Rheumatol*. 2013 May 4;23(3):489–95.
125. Marotte H, Arnaud B, Diasparra J, Zrioual S, Miossec P. Association between the level of circulating bioactive tumor necrosis factor α and the tumor necrosis factor α gene polymorphism at –308 in patients with rheumatoid arthritis treated with a tumor necrosis factor α inhibitor. *Arthritis Rheum*. 2008 May 25;58(5):1258–63.
126. Ongaro A, De Mattei M, Pellati A, Caruso A, Ferretti S, Masieri FF, et al. Can tumor necrosis factor receptor II gene 676T>G polymorphism predict the response grading to anti-TNFα therapy in rheumatoid arthritis? *Rheumatol Int*. 2008 Jul 29;28(9):901–8.
127. Chatzikyriakidou A, Georgiou I, Voulgari P V., Venetsanopoulou AI, Drosos AA. Combined tumour necrosis factor- and tumour necrosis factor receptor genotypes could predict rheumatoid arthritis patients’ response to anti-TNF- therapy and explain controversies of studies based on a single polymorphism. *Rheumatology*. 2007 Mar 27;46(6):1034–5.
128. Lim SH, Kim K, Choi CI. Pharmacogenomics of Monoclonal Antibodies for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *J Pers Med*. 2022 Jul 31;12(8):1265.
129. Wang J, Bansal AT, Martin M, Germer S, Benayed R, Essioux L, et al. Genome-wide association analysis implicates the involvement of eight loci with response to tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J*. 2013 Jun 10;13(3):235–41.
130. Luxembourger C, Ruysse-Witrand A, Ladhari C, Rittore C, Degboe Y, Maillefert JF, et al. A single nucleotide polymorphism of IL6-receptor is associated with response to tocilizumab in rheumatoid arthritis patients. *Pharmacogenomics J*. 2019 Aug 16;19(4):368–74.

131. Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Plaza-Plaza JC, Calleja-Hernández M yñgel. Genetic and clinical biomarkers of tocilizumab response in patients with rheumatoid arthritis. *Pharmacol Res.* 2016 Sep;111:264–71.
132. Enevold C, Baslund B, Linde L, Josephsen NL, Tarp U, Lindegaard H, et al. Interleukin-6-receptor polymorphisms rs12083537, rs2228145, and rs4329505 as predictors of response to tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenet Genomics.* 2014 Aug;24(8):401–5.
133. Maldonado-Montoro M, Cañadas-Garre M, González-Utrilla A, Ángel Calleja-Hernández M. Influence of IL6R gene polymorphisms in the effectiveness to treatment with tocilizumab in rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* 2018 Jan 13;18(1):167–72.
134. Mori S, Terada K, Ueki Y. Tocilizumab-induced hyperbilirubinemia in Japanese patients with rheumatoid arthritis: its association with UDP glucuronosyltransferase 1A1 gene polymorphisms. *Mod Rheumatol.* 2012 Aug 13;22(4):515–23.
135. Lin N, Damask A, Boyapati A, Hamilton JD, Hamon S, Ternes N, et al. UGT1A1 genetic variants are associated with increases in bilirubin levels in rheumatoid arthritis patients treated with sarilumab. *Pharmacogenomics J.* 2022 May 11;22(3):160–5.
136. Arguinano AA, Naderi E, Ndiaye NC, Stathopoulou M, Dadé S, Alizadeh B, et al. IL6R haplotype rs4845625\*T/rs4537545\*C is a risk factor for simultaneously high CRP, LDL and ApoB levels. *Genes Immun.* 2017;18(3):163–9.
137. Smolen JS, Aletaha D. Interleukin-6 receptor inhibition with tocilizumab and attainment of disease remission in rheumatoid arthritis: The role of acute-phase reactants. *Arthritis Rheum.* 2011 Jan;63(1):43–52.
138. Diaz-Torne C, Ortiz M dels A, Moya P, Hernandez MV, Reina D, Castellvi I, et al. The combination of IL-6 and its soluble receptor is associated with the response of rheumatoid arthritis patients to tocilizumab. *Semin Arthritis Rheum.* 2018 Jun;47(6):757–64.
139. Ferreira RC, Freitag DF, Cutler AJ, Howson JMM, Rainbow DB, Smyth DJ, et al. Functional IL6R 358Ala Allele Impairs Classical IL-6 Receptor Signaling and Influences Risk of Diverse Inflammatory Diseases. *PLoS Genet.* 2013 Apr 4;9(4):e1003444.
140. Shah T, Zabaneh D, Gaunt T, Swerdlow DI, Shah S, Talmud PJ, et al. Gene-centric analysis identifies variants associated with interleukin-6 levels and shared pathways with other inflammation markers. *Circ Cardiovasc Genet.* 2013 Apr;6(2):163–70.
141. Webb TR, Erdmann J, Stirrups KE, Stitzel NO, Masca NGD, Jansen H, et al. Systematic Evaluation of Pleiotropy Identifies 6 Further Loci Associated With Coronary Artery Disease. *J Am Coll Cardiol.* 2017 Feb 21;69(7):823–36.
142. Wu G, Cheng M, Huang H, Yang B, Jiang H, Huang C. A Variant of IL6R Is Associated with the Recurrence of Atrial Fibrillation after Catheter Ablation in a Chinese Han Population. Available from: [www.plosone.org](http://www.plosone.org)
143. Deloukas P, Kanoni S, Willenborg C, Farrall M, Assimes TL, Thompson JR, et al. Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease. *Nat Genet.* 2013 Jan 2;45(1):25–33.

144. Svensson T, Kitlinski M, Engströ G, Melander O. A genetic risk score for CAD, psychological stress, and their interaction as predictors of CAD, fatal MI, non-fatal MI and cardiovascular death. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176029>
145. Lee JS, Wang J, Martin M, Germer S, Kenwright A, Benayed R, et al. Genetic variation in UGT1A1 typical of Gilbert syndrome is associated with unconjugated hyperbilirubinemia in patients receiving tocilizumab. *Pharmacogenet Genomics*. 2011 Jul;21(7):365–74.
146. Hoffman E, Rahat MA, Feld J, Elias M, Rosner I, Kaly L, et al. Effects of Tocilizumab, an Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody, on Serum Lipid and Adipokine Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *International Journal of Molecular Sciences Article* [Internet]. 2019 [cited 2022 Oct 13]; Available from: [www.mdpi.com/journal/ijms](http://www.mdpi.com/journal/ijms)
147. Lukas C, Redondin M, Pane I, Soubrier M, Houvenagel E, Sibilia J, et al. Cardiovascular events and change in cholesterol levels in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab: data from the REGATE Registry. *Clin Exp Rheumatol*. 39(3):501–7.
148. Castagné B, Viprey M, Martin J, Schott AM, Cucherat M, Soubrier M. Cardiovascular safety of tocilizumab: A systematic review and network meta-analysis. *PLoS One*. 2019 Aug 1;14(8):e0220178.
149. Kim SC, Solomon DH, Rogers JR, Gale S, Klearman M, Sarsour K, et al. Cardiovascular Safety of Tocilizumab Versus Tumor Necrosis Factor Inhibitors in Patients With Rheumatoid Arthritis: A Multi-Database Cohort Study. *Arthritis & Rheumatology*. 2017 Jun 28;69(6):1154–64.
150. Alsulaim T, Alhassan N, Khalil H, Almutlaq A. Tocilizumab Effect on Lipid Profile in Correlation to Cardiovascular Events: A Retrospective Cohort Study. *Int J Rheumatol*. 2021 Aug 12;2021:1–8.
151. Behl T, Kaur I, Sehgal A, Zengin G, Brisc C, Brisc MC, et al. The Lipid Paradox as a Metabolic Checkpoint and Its Therapeutic Significance in Ameliorating the Associated Cardiovascular Risks in Rheumatoid Arthritis Patients. *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 14;21(24).
152. Hashizume M, Yoshida H, Koike N, Suzuki M, Mihara M. Overproduced interleukin 6 decreases blood lipid levels via upregulation of very-low-density lipoprotein receptor. *Ann Rheum Dis*. 2010 Apr;69(4):741–6.
153. Hashizume M, Mihara M. IL-6 and lipid metabolism. *Inflamm Regen*. 2011;31(3):325–33.







## **10. Annexes**



## 10.1 Annex 1

Taula amb els SNPs estudiats, la seva posició genòmica i freqüències al·lèliques. En negreta es marca l'al·lel menor.

refSeg	Posició genòmica (GRCh38)	Freqüència al·lel menor	Al·lels
rs12083537	chr1:154408627	0.21	A> <b>G</b>
rs11265618	chr1:154457616	0.17	C> <b>T</b>
rs4329505	chr1:154459944	0.17	T> <b>C</b>
rs2228145	chr1:154454494	0.40	A>C
rs4537545	chr1:154446403	0.41	C> <b>T</b>
rs4845625	chr1:154449591	0.43	T> <b>C</b>

## 10.2 Annex 2

El projecte d'investigació de tesi doctoral ha rebut el suport econòmic de la beca STADA de la Societat Catalana de Reumatologia de l'any 2021.

**UAB**

Universitat Autònoma de Barcelona