

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„IULIU HAȚIEGANU” CLUJ-NAPOCA**

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Relația tratamentului
farmacologic și a polimorfismelor
genetice cu severitatea clinico
structurală în spondilita anchilozantă**

Doctorand

Ruxandra Elena Schiotis

Conducători de doctorat

Prof. Dr. Anca Dana Buzoianu

Prof. Dr. Eduardo Collantes-Estevez

Prof. Dr. Simion Șimon

CUPRINS

INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Spondilita anchilozantă	
1. 1. Considerații clinice și de diagnostic	21
1.1.1. Patogeneza	21
1.1. 2. Tabloul clinic	22
1.1. 3. Examenul clinic	23
1.1. 4. Examenul paraclinic	23
1.1. 5. Diagnosticul pozitiv	24
1.1.6. Monitorizarea evoluției bolii	25
1. 2. Tratamentul în spondilita anchilozantă	27
1.2.1. Tratamentul non-farmacologic	28
1.2.1.1. Kinetoterapia	29
1.2. 2. Tratamentul farmacologic	29
1.2.2.1. Antiinflamatoarele nesteroidiene	31
1.2.2.2. Agenții modificali ai evoluției bolii (DMARDS) și corticosteroizii în SA	
1.2.2.3. Tratamentul biologic anti TNF-alfa	32
1.2. 3. Monitorizarea clinică a răspunsului la tratamentul biologic	36
2. Factorii genetici și spondilita anchilozantă	
2. 1. Polimorfismele unice de nucleotide și farmacogenomica	37
2.1.1. Polimorfismele unice nucleotidice (SNPs)	37
2.1. 2. Farmacogenetica și farmacogenomica	38
2. 2. Rolul antigenului HLA B27 în etio-patogeneza spondilitei anchilozante	38
2. 3. Contribuția altor factorilor genetici la etio-patogenia SA	40
2. 4. Factorii genetici și prognosticul spondilitei anchilozante	41
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	45
2. Metodologie generală	47
3. Influența tratamentului cu anti-inflamatoare nesteroidiene și agenți anti TNF-alfa asupra progresiei radiologice în spondilita anchilozantă.	

3.1. Introducere	51
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	52
3.3. Material și metodă	52
3.4. Rezultate	55
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	62
4. Influența factorilor clinici și a polimorfismelor genetice asupra dezvoltării statusului funcțional sever la pacienții cu spondilită anchilozantă.	
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	66
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	69
4.5. Discuții	72
4.6. Concluzii	75
5. Factori genetici predictivi ai lipsei de răspuns terapeutic la primul agent biologic anti TNF- alfa în spondilita anchilozantă	
5.1. Introducere	77
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	78
5.3. Material și metodă	78
5.4. Rezultate	81
5.5. Discuții	90
5.6. Concluzii	93
6. Discuții generale	95
7. Concluzii generale (sinteză)	97
8. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	99
REFERINȚE	101

Cuvinte cheie: spondilita anchilozantă, SNPs, anti-inflamatoare nesteriodiene, terapie biologică, progresie radiologică, răspuns la tratament, BASFI.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Spondilita anchilozantă (SA) este caracterizată prin strânsa legătură între inflamație și osteoproliferare, fenomene a căror desfășurare este doar parțial cunoscută. Caracteristica bolii o constituie localizarea particulară a procesului inflamator care are punct de plecare la nivelul entezelor (zona de inserție a tendoanelor, ligamentelor și capsulei articulare la nivelul oaselor), diferit de celelalte reumatisme inflamatorii, în care se produce inflamația directă a capsulei articulare și în care predomină, spre deosebire de SA, procesele de eroziune și distrucție articulară. Astfel, în SA este specifică tendința la fibroză, osificare și formare de os nou.

Patogeneza SA nu este destul de bine înțeleasă. Mecanismele mediate imun sunt sugerate de aspectul histologic inflamator al țesuturilor afectate, de nivelul seric ridicat al reactanților de fază acută și de relația strânsă cu antigenul *HLA-B27*. Până în acest moment nu a fost identificat nici un agent etiologic al bolii, dar relația dintre SA și bolile inflamatorii intestinale (BII) sugerează că infecțiile bacteriene enterale pot juca un rol declanșator. Un deficit relativ în sinteza de citokine mediată de celulele T helper 1 (Th1), cum este TNF-alfa ar putea duce la persistența mai îndelungată a antigenelor bacteriene și astfel, răspunsul imun antibacterian prelungit ar putea declanșa ulterior răspuns autoimun. Mai multe studii efectuate de către Rudwaleit și Hohler sugerează că alterarea producției de TNF-alfa și IL10 poate fi parțial determinată de polimorfismele genetice.

Semnele clinice ale bolii pot varia de la rigiditatea ușoară a coloanei până la coloană vertebrală complet imobilă, cu posibilă prezență concomitentă a afectării severe bilaterale a șoldurilor, tumefierea articulațiilor periferice, sau prezența manifestărilor extra-articulare. A fost identificat că doar o proporție de 50% dintre pacienții cu boală activă prezintă nivel crescut de proteina C reactivă (CRP) și rată crescută a vitezei de sedimentare a hematiilor (VSH). Mai mult decât atât, studiile au arătat o lipsă de corelație între semnele clinice de activitate a bolii (durere lombară nocturnă, redoare matinală) cu valorile CRP și VSH.

Variabilitatea marcată în severitate prezentării clinice a pacienților cu SA poate fi relaționată cu variabilitatea contribuției factorilor genetici implicați în apariția bolii. Studiile familiale au sugerat că *HLA-B27* contribuie doar în proporție de 40% la riscul general de boală. Astfel, în ultimii ani, îmbunătățirile în genotiparea și în designul studiilor au revoluționat domeniul geneticii bolilor comune, ceea ce a

avut un impact major asupra SA, în care au fost identificate 13 gene, altele decât HLA-B, asociate cu riscul de boală. În plus, studiile de asociere genomică au demonstrat existența de loci responsabili de susceptibilitatea non-CMH pentru SA și pentru alte spondiloartropatii.

Obiectivele tratamentului farmacologic în SA sunt direcționate, pe de o parte, pentru a controla semnele și simptomele bolii (activitatea bolii) și pentru a menține funcția fizică a pacienților și, pe de altă parte, pentru a preveni distrucția structurală (progresia radiologică a bolii) cu finalitatea de a crește calitatea vieții pacienților și a menține inserția socio-economică a acestora. Astfel, în practica clinică se folosesc parametri validați internațional pentru monitorizarea cursului bolii precum: BASDAI (Bath Ankylosis Spondylitis Disease Activity Index), BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index), BASRI (Bath Ankylosing Spondylitis Radiological Index), ASDAS (Assessment of SpondyloArthritis International Society), mSASSS (modified Stoke Ankylosing Spondylitis Spine Score).

Singurele clase de medicamente care și-au dovedit eficiența în controlul manifestărilor bolii sunt anti-inflamatoarele nesteroidiene (AINS) și mai nou, agenții biologici anti TNF-alfa. Însă, conform studiilor publicate există o proporție de 30-40% dintre pacienți care nu obțin controlul clinic al bolii nici cu această nouă clasă farmacologică, situație în care fondul genetic joacă probabil un rol important. Studiile clinice au arătat că tratamentul biologic administrat timp de 2 ani nu a putut opri progresia radiologică a bolii, măsurată prin formarea de os nou la nivelul coloanei vertebrale pe radiografiile convenționale, prin comparație cu cohorta istorică de referință în SA, *Outcome in Ankylosing Spondylitis International Study* (OASIS). Însă, există o serie de date din literatură care au arătat că administrarea continuă de AINS poate reduce rata distrugerii structurale după 2 ani de tratament.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru

Chiar dacă datele din literatură au confirmat faptul că singurele clase de medicamente eficace în controlul semnelor clinice de boală sunt reprezentate de AINS - treapta întâi de tratament- și de agenții biologici anti TNF-alfa - treapta a doua de tratament - există, totuși, o proporție semnificativă de pacienți care mențin parametri înalți de activitate în ciuda tratamentului îndelungat chiar și cu agenții biologici. Pe de altă parte, efectul pe termen lung asupra progresiei radiologice în urma administrării de AINS și agenți anti TNF-alfa nu este încă bine cunoscut și caracterizat. Mai mult, majoritatea rezultatelor provin din analiza pacienților incluși în studii clinice și mai puțin din informațiile oferite din studiul pacienților din registrele de boală, care oferă date despre pacienții reali, consultați în practica clinică cotidiană.

A fost identificat că factorii genetici influențează atât susceptibilitatea pentru SA dar determină și prognosticul bolii. Studii familiale au demonstrat că severitatea funcțională și radiografică în SA are o importantă componentă genetică. Prin urmare, înțelegerea fondului genetic a severității funcționale în SA ar fi de mare interes pentru a identifica din stadii precoce acei pacienți cu risc pentru a dezvolta afectare severă a funcției fizice. Astfel, s-ar putea optimiza abordarea preventivă și terapeutică pentru fiecare pacient în parte încă de la momentul diagnosticului, prin distribuția obiectivă a tratamentelor biologice scumpe. Pe de altă parte, în SA lipsesc studiile de farmacogenomică, centrate pe genele implicate în etio-patogeneza bolii, care să analizeze rolul polimorfismelor alelice în diferențele individuale de răspuns la agenții inhibitori TNF-alfa. Luând în considerare costul și potențialele reacții adverse severe, ar fi de utilitate majoră identificarea biomarkerilor genetici răspunzători de eșecul la tratament pentru ca astfel să se poată selecta în mod prospectiv, pacienții care cel mai probabil nu vor răspunde la un astfel de tratament.

Cele trei studii ale temei de cercetare au fost aprobate de către Comisia de Etică a Spitalului Universitar "Reina Sofia", Cordoba, Spania. Fiecare pacient a semnat Consimțământul Informat la includerea în REGISPONSER, în acord cu principiile fundamentale stabilite în Declarația Drepturilor Omului de la Helsinki.

Studiul 1. Influența tratamentului cu anti-inflamatoare nesteroidiene și agenți anti TNF-alfa asupra progresiei radiologice în spondilita anchilozantă.

Obiectivul principal al acestui studiu a fost de a evalua influența pe termen lung a tratamentului cu AINS și cu blocanți ai TNF- alfa asupra ratei de distrucție structurală (progresia radiologică), într-o cohortă de pacienți cu SA ce aparțin practicii clinice cotidiene. Obiectivul secundar l-a reprezentat studiul evoluției activității bolii și a funcției fizice a pacienților în cele două grupuri de tratament.

Material și metodă

Toți pacienții incluși aparțin Registrului Spaniol de Spondiloartopatii (SpA), REGISPONSER. Din totalul pacienților cu SpA am selectat pentru acest studiu, doar pe aceia care au îndeplinit criteriile modificate de la New York pentru SA , adică cohorta REGISPONSER-AS. Pacienții din această cohortă au trebuit să îndeplinească suplimentar următoarele trei criterii de includere în studiu: a) să aibă perioada de urmărire, de la vizita de includere în REGISPONSER până la vizita de evaluare de cel puțin 3 ani; b) să aibă tratament continuu doar cu AINS și/sau c) tratament continuu cu agenți anti-TNF alfa de-a lungul celor 3 ani de urmărire.

Scorul BASRI-coloană a fost aplicat la nivelul coloanei lombare în incidețele antero-posterioară și laterală, iar la nivelul colonei cervicale doar în incidență laterală. Scorizarea radiologică a articulației șoldului s-a bazat pe același sistem de gradare ca pentru coloana vertebrală. Scorul BASRI-total reprezintă suma scorului radiologic al coloanei plus scorul radiologic al șoldurilor cu valori cuprinse între 2 și 16 pentru pacienții cu SA.

Rezultate

O sută optzeci și opt (188) de pacienți cu SA au îndeplinit criteriile de includere. Cele două grupuri au fost formate din 130 de pacienți tratați continuu cu AINS și din 58 de pacienți tratați continuu cu agenți biologici anti TNF-alfa (TB). Nu s-au înregistrat diferențe semnificative statistic între cele 2 grupuri de tratament în privința parametrilor demografici, clinici și de monitorizare a evoluției bolii cu excepția prezenței artritei periferice care a fost mai frecvent întâlnită în cohorta TB și a scorului de activitate BASDAI care a avut valori mai înalte în cohorta AINS. Antigenul *HLA- B27* a fost întâlnit aproximativ la aceeași proporție de pacienți în ambele grupuri de tratament.

La vizita de evaluare după 3 ani de monitorizare, s-a decelat creștere semnificativă a distrucției structurale în cohorta AINS, atât în ceea ce privește scorul

radiologic total cât și cel de la nivelul coloanei vertebrale (BASRI total 8.72 (\pm 4) vs. 8.18 (\pm 4.2), $p=0.001$); BASRI coloană 7.58 (\pm 3) vs. 7.20 (\pm 3.3), $p=0.009$). Cohorta pacienților cu TB nu a înregistrat progresie radiologică semnificativă statistic la vizita de evaluare. Media modificării scorului BASRI-total (mBASRI-total) după 3 ani a fost de 0.54 (\pm 1.82) unități pentru pacienții cu tratament cu AINS versus 0.23 (\pm 2.39) unități în grupul pacienților tratați cu TB, $p=0.067$. În ceea ce privește rata modificării scorului BASRI-coloană (mBASRI-coloană), diferențele înregistrate au fost mai puțin importante astfel, grupul pacienților aflați în tratament cu AINS au înregistrat o modificare a scorului cu 0.347 (\pm 1.49) unități, versus 0.33 (\pm 1.95) în cazul pacienților tratați cu TB, $p=0.113$. În modelul final, factorii predictivi ai ratei crescute de progresie radiologică după 3 ani de urmărire în ordinea descrescătoare a odds ratio (OR) au fost: valoarea bazală a scorului radiologic la nivelul coloanei 1.49 (1.04- 2.14), valoarea bazală a scorului radiologic total 0.6 (0.45-0.82) și sexul masculin al pacienților 0.45 (0.21-0.96). Am consemnat un efect clar în controlul activității inflamatorii a bolii în grupul de pacienți tratați cu TB de-a lungul celor 3 ani de studiu, reflectat în menținerea la valori joase atât a scorului BASDAI cât și ASDAS. În ceea ce privește evoluția funcției fizice a pacienților din cele 2 grupuri am găsit că după cei 3 ani de urmărire a pacienților, grupul aflat în tratament cu AINS a înregistrat o deteriorare semnificativă a statusului funcțional cuantificat prin scorul BASFI ($p<0.001$). Pacienții din lotul de tratament cu agenți biologici și-au menținut funcția fizică în cursul celor 3 ani de urmărire ($p=NS$).

Studiul 2. Influența factorilor clinici și a polimorfismelor genetice asupra dezvoltării statusului funcțional sever la pacienții cu spondilită anchilozantă.

Ținând cont că deteriorarea funcției fizice poate fi parțial controlată de tratamentul adecvat, obiectivul studiului a fost de a identifica factori de prognostic clinici și genetici ai dezvoltării statusului funcțional sever. De asemenea, am studiat dacă există o combinație de factori clinici și markeri genetici care pot prezice evoluția individuală a severității funcționale în SA.

Material și metodă

Am efectuat un studiu de asociere, transversal, pe o cohortă de pacienți spanioli diagnosticați cu SA ce au fost recrutați din rândul a 25 de spitale care au participat la înrolarea pacienților în Registrul Spaniol de Spondiloartropatii- REGISPONSER. Pacienții incluși au avut timpul de evoluție al bolii de la primele simptome de minim 10 ani. Caracteristicile bazale ale pacienților la debutul bolii au fost înregistrate drept posibili factori de prognostic pentru severitatea funcției fizice după cum urmează: datele demografice, clinice (lombalgie cronică inflamatorie, cervicalgie, entezită, dactilită), *HLA-B27*, parametri de monitorizare a bolii (BASDAI, BASFI, BASRI). Pentru a cuantifica severitatea afectării funcționale s-a standardizat scorul BASFI, ajustându-l după durata de evoluție a bolii după primele simptome, desemnat în text drept BASFI/t și am efectuat 4 analize de asociere folosind testul χ^2 . Am definit astfel drept status funcțional sever valorile BASFI/t din vârful centilelor 60 (p60), 65 (p65), 70 (p70) și 75 (p75). Valorile prag pentru statusul sever al BASFI/t pentru fiecare centilă au fost: 0.19 pentru (p60), 0.21 pentru (p65), 0.22 pentru (p70) și 0.25 pentru (p75).

ADN-ul genomic a fost izolat din mostre de salivă ale pacienților, după protocolul de extracție al producătorului, folosind kitul Oragene™ DNA Self-Collection kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada). Toate probele au fost testate pentru prezența alelei *HLA-B27* prin metoda PCR folosind primerii raportați de Olerup et al.

După o căutare bibliografică extensivă, am selectat 384 polimorfismele unice de nucleotide (SNPs) distribuite în 190 de gene pentru a fi analizate în acest studiu. Am selectat toate SNPs raportate în populația caucaziană ca fiind asociate cu SA sau alte SpA. În afara acestor SNPs, am inclus SNPs ale genelor relaționate cu alte boli autoimune și cu boli osoase, întrucât le-am considerat drept posibile polimorfisme candidate implicate în severitatea funcțională a SA. De asemenea, am inclus și tag SNPs-urile căilor metabolice aparținând celor mai importante 2 gene relaționate cu SA: *aminopeptidaza 1 asociată reticulului endoplasmatic* (ERAP1) și *receptorul IL-23R*. Genotiparea SNPs a fost făcută cu ajutorul platformei Illumina Golden (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

Fiecare SNP a fost testat pentru deviația de la echilibrul Hardy-Weinberg (HWE). Astfel, din setul de date genotipat inițial s-au exclus parametri care nu au îndeplinit condițiile necesare. Au fost excluse SNPs cu un "cloud clustering" redus, SNPs cu call-rate (r^2) <85%, SNPs cu deviație severă de la HWE ($P < 0.0001$) precum și probele cu call rate <85%, ceea ce a generat 456 probe și 344 SNPs analizate. Testarea asocierii între frecvența alelică și genotipică a SNPs studiate cu fenotipul sever al BASFI/t s-a efectuat cu ajutorul testului χ^2 . Valorile p au fost interpretate după ajustarea lor în

prealabil cu ajutorul testelor de permutare, respectiv testul single-value permutation (1000 permutări). Factorii clinici și genetici au fost ulterior studiați cu ajutorul regresiei logistice multivariate.

Rezultate

Cohorta de pacienți studiată a fost compusă din 456 de pacienți cu SA, cu vârsta medie la includerea în studiu de 50.8 ± 10.5 ani, cu o medie de vârstă de 26.1 ± 9.1 ani la debutul bolii și o vârstă medie de 34.6 ± 11.4 ani la diagnosticul bolii. Timpul mediu de evoluție al bolii de la primele simptome a fost de 24.7 ± 10.1 ani. *HLA-B27* a fost pozitiv într-o proporție de 84.9% de pacienți. Pacienții au avut valoare medie a indicelui de severitate funcțională la includerea în registru de 4.0 ± 2.8 , cu o medie a BASFI/t (ani) de 0.17 ± 0.13 . Dintre variabilele clinice bazale analizate, cervicalgia și vârsta la debutul bolii s-au asociat semnificativ statistic cu fenotipul sever al BASFI/t. Prezența lombalgiei inflamatorii la debut s-a asociat cu fenotipul funcțional sever într-o singură percentilă (p60) iar, *HLA-B27* a fost asociat cu fenotipul funcțional sever în două percentile studiate. Dintre SNPs analizate, am identificat 24 polimorfisme asociate cu fenotipul funcțional sever în cel puțin una dintre percentilele de clasificare ale pacienților. Două SNPs au arătat asociere puternică cu BASFI/t fiind găsite asociate în toate cele 4 percentile studiate: *rs2542151* al genei *protein tirosin fosfataza non-receptorilor tip 2 (PTPN2)* [p60 ($P=0.046$), p65 ($P=0.006$), p70 ($P=0.002$) și p75 ($P=0.001$)] și *rs2254441* al genei *prolin-serin-treonin fosfatazei, proteina de interacțiune 1 (PSTPIP1)* [p60 ($P=0.036$), p65 ($P=0.017$), p70 ($P=0.010$) și p75 ($P=0.001$)]. Nu am putut construi nici un model clinico-genetic predictiv al severității funcționale în SA pentru nici una dintre percentilele de severitate a BASFI/t definite p60, p65, p70, și p75, întrucât nici una din curbele ROC obținute în modelele predictive nu a atins o arie de sub curbă (AUC) peste 0.75.

Studiul 3. Factori genetici predictivi ai lipsei de răspuns terapeutic la primul agent biologic anti TNF- alfa în spondilita anchilozantă.

Obiectivul studiului a fost de a identifica dintre polimorfismele genetice candidate, factori predictivi asociați cu lipsa de răspuns la tratamentul cu primul agent biologic blocant al TNF-alfa din rândul pacienților cu SA, consultați ambulator.

Material și metodă

Am efectuat un studiu longitudinal, multicentric pe pacienții din cohorta REGISPONSER-AS, formată din 529 pacienți diagnosticați cu SA conform criteriilor modificate de la New York. Pacienții studiați au îndeplinit următorul criteriu de includere: inițierea primului agent biologic anti TNF-alfa, conform criteriilor ASAS, în intervalului de timp cuprins între două vizite programate ale REGISPONSER-AS. Decizia de a iniția un anumit agent farmacologic a depins de medicul curant, împreună cu preferința pacientului pentru un anumit produs. În prezentul studiu pacienților le-a fost permisă administrarea concomitentă de AINS sau DMARDs (sulfasalazină, meotrexat), după cum le-a fost prescris de către medicul specialist.

Am clasificat pacienții drept “responderi” dacă au atins răspunsul clinic BASDAI 50 la vizita de evaluare și “non-responderi” în cazul în care la vizita de evaluare, pacienții nu au atins răspunsul clinic BASDAI 50, în conformitate cu ghidul de recomandări a ASAS (îmbunătățire cu 50% a scorului inițial de activitate a bolii BASDAI, împreună cu opinia expertului). Analiza inițială a constat în identificarea polimorfismelor genetice asociate pacienților tratați cu agenți anti TNF-alfa care, la vizita de evaluare, nu au atins răspunsul terapeutic măsurat prin scorul BASDAI 50.

ADN-ul genomic a fost izolat din mostre de salivă ale pacienților, după protocolul de extracție al producătorului, folosind kitul Oragene™ DNA Self-Collection kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada). Toate probele au fost testate pentru prezența alelei *HLA-B27* prin metoda PCR folosind primerii raportați de Olerup et al. După o căutare bibliografică extensivă, am selectat 384 SNPs distribuite în 190 de gene pentru a fi analizate în acest studiu. Am selectat toate SNPs raportate în populația cauziană ca fiind asociate cu SA sau alte SpA. În afara acestor SNPs, am inclus SNPs ale genelor relaționate cu alte boli autoimune și cu boli osoase, întrucât le-am considerat drept posibile polimorfisme candidate implicate în lipsa de răspuns la tratamentul biologic anti TNF-alfa în SA. De asemenea, am inclus și tag SNPs-urile căilor metabolice aparținând celor mai importante 2 gene relaționate cu SA: ERAP1 și IL-23R. Genotiparea SNPs a fost făcută cu ajutorul platformei Illumina Golden (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). Analiza statistică a fost efectuată cu

ajutorul SPSS v 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) și SVS v 7.3.1 (Golden Helix Inc., Bozeman, Montana, USA).

Fiecare SNP a fost testat pentru deviația de la echilibrul Hardy-Weinberg (HWE) folosind programul Helix Tree software versiunea 7.3.1. Astfel, din setul de date genotipat inițial s-au exclus parametri care nu au îndeplinit condițiile necesare. Au fost excluse SNPs cu un "cloud clustering" redus, SNPs cu call-rate (r^2) <85%, SNPs cu deviație severă de la HWE ($P < 0.0001$) precum și probele cu call rate <85%), ceea ce a generat 456 probe și 344 SNPs analizate. Măsurarea dezechilibrului de lincaj al perechilor alelice ($r^2 > 0.8$) a fost determinată cu ajutorul versiunii 4.1 a Haploview (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). Toate SNPs raportate în acest studiu au avut frecvența alelei minore la nivelul fiecărui locus mai mare de 10%. Testarea asocierii între frecvența alelică și răspunsul la tratament s-a efectuat cu ajutorul testului χ^2 . Mărimea asocierii alelelor cu tipul de răspuns la tratament a fost exprimată prin odds ratio (OR) cu un interval de confidență de 95% (IC) (OR > 1 indică alelă de risc pentru non-răspunsul la tratament iar, OR < 1 indică alelă protectoare). Valorile p au fost obținute după ajustarea în prealabil prin teste statistice de permutare, folosind testul single-value permutation (1000 permutări). Probabilitatea lipsei de răspuns la tratament a fost analizată folosind regresia logistică. Pentru a analiza puterea predictivă a modelului genetic de non-răspuns la tratament am folosit aria de sub curba ROC (Analyse-it software v2.09, Leeds, UK).

Rezultate

Din cei 529 de pacienți ai REGISPONSER-AS, 121 de pacienți cu SA au îndeplinit criteriile de includere în acest studiu. Dintre aceștia, 68 (56.2%) au răspuns la tratament (responderi) iar 53 (43.8%) nu au răspuns la tratamentul biologic anti TNF-alfa (non-responderi) la vizita de evaluare, după aplicarea criteriului clinic de răspuns BASDAI 50, raportat la vizita de inițiere a tratamentului anti TNF-alfa.

Nu am identificat diferențe semnificativ statistice între caracteristicile bazale, clinice și demografice ale celor două grupuri de răspuns la tratament, cu excepția faptului că pacienții din grupul non-responderi au avut o vârstă mai avansată la debutul bolii (28.4 ± 8.7 vs. 24.2 ± 9.4 ; $p = 0.021$).

Din cele 345 SNPs testate pentru identificarea asocierii individuale cu tipul de răspuns la tratamentul anti TNF-alfa, 13 polimorfisme au fost semnificativ asociate

cu lipsa de răspuns la tratament, evaluată prin scorul BASDAI 50. Trei din cele 13 polimorfisme aparținând genei *CALM1* (*Calmoduline 1*) s-au găsit în dezechilibru de lincaj (tabel 1).

Tabel 1. Variantele alelice asociate cu lipsa de răspuns la tratamentul anti TNF-alfa conform criteriului de răspuns BASDAI 50.

Snp	Gena	Alela de risc OR (IC 95%)	X ² test P neajustat	X ² test P ajustat*
rs755622	<i>MIF</i>	G, 2.92 (1.41-6.03)	0.002	0.003
rs917997	<i>IL18RAP</i>	A, 2.4 (1.32- 4.35)	0.003	0.005
rs1061622	<i>TNFRSF1B</i>	G, 2.12 (1.15- 3.91)	0.014	0.009
rs4343	<i>ACE</i>	G, 1.82 (1.05- 3.13)	0.029	0.016
rs4355801	<i>TNFRSF11B</i>	A, 1.79 (1.04- 3.08)	0.031	0.051
rs6060369	<i>UQCC</i>	A, 1.77 (1.03- 3.02)	0.035	0.032
rs3740691	<i>ARFGAP2</i>	A, 1.76 (1.03- 3.02)	0.035	0.031
rs764481	<i>CYP2D6</i>	G, 1.77 (1.02- 3.09)	0.040	0.077
rs331377	<i>ASPN</i>	G, 1.7 (1.01- 2.84)	0.041	0.043
rs3213718	<i>CALM1</i>	A, 1.72 (1.01- 2.92)	0.043	0.044
rs1800896	<i>IL10</i>	A, 1.69 (1.01- 2.84)	0.044	0.029
rs2300496	<i>CALM1</i>	A, 1.68 (1.002 - 2.83)	0.048	0.055
rs2300500	<i>CALM1</i>	G, 1.68 (1.002-2.83)	0.048	0.055

Am identificat 9 polimorfisme care au arătat asociere semnificativă statistică în testul X² și acestea au fost astfel introduse sub forma genotipurilor de risc în modelul de regresie logistică multivariată pentru a identifica predictorii ai ineficienței tratamentului anti TNF-alfa. În modelul final am găsit că, rs917997 al genei *IL18RAP* (OR: 3.35, 95% IC:1.38- 8.15), rs755622 (OR: 3.14, 95% IC: 1.19- 8.22) al genei *MIF*, rs1800896 al genei *IL10* (OR: 3.09, 95% IC: 1.04- 9.15), rs3740691 (OR: 2.90, 95% IC: 1.12- 7.51) al genei *ARFGAP2* și rs1061622 (OR: 2.46, 95% IC: 1.00- 6.04) al genei *TNFRSF1B* sunt predictorii independenți ai lipsei de răspuns la tratamentul anti-TNF-alfa.

Modelul genetic obținut de non-răspuns la tratamentul biologic are o putere predictivă indicată de aria de sub curba ROC de 0.77 (95% IC: 0.68 - 0.86).

Concluzii generale

La sfârșitul celor 3 ani ai studiului, grupul pacienților tratați cu terapie biologică a avut un ritm de progresie mai lentă, fără semnificație statistică, atât la nivelul coloanei vertebrale cât și la nivelul distrucției radiologice globale.

Pacienții tratați doar cu AINS au înregistrat, la sfârșitul celor 3 ani de urmărire, progresie radiologică semnificativă statistic, atât la nivelul coloanei vertebrale cât și la nivelul distrucției radiologice globale.

În analiza de covarianță efectuată am arătat că progresia radiologică la sfârșitul celor 3 ani de monitorizare se produce indiferent de tipul de tratament administrat, AINS sau agenți biologici.

Rezultatele au arătat că tratamentul cu agenți anti TNF-alfa nu duce la o rată de progresie mai mare decât tratamentul cu AINS.

Am confirmat că distrucția structurală inițială și sexul masculin sunt factori predictivi ai progresiei radiologice în rândul pacienților cu SA.

Prezența antigenului *HLA-B27* nu a fost asociată cu rata de progresie radiologică.

Rezultatele studiului nostru confirmă că evoluția spre un status funcțional sever în SA este asociată atât cu factori clinici cât și genetici.

Raportam că vârsta avansată la debutul bolii, cervicalgia, polimorfismele *rs2542151(PTPN2)* și *rs2254441 (PSTPIP1)* reprezintă potențiali factori predictivi de evoluție spre afectare funcțională severă a pacienților cu SA.

În concordanță cu datele publicate anterior, studiul nostru a identificat că procentul pacienților care au atins criteriul clinic de răspuns la tratament BASDAI 50, după 12 luni de urmărire a fost de 56.2%.

Prezența antigenului *HLA-B27* nu a fost asociată cu tipul de răspuns la tratamentul biologic anti TNF-alfa, confirmând datele existente în literatură.

Am identificat 5 polimorfisme localizate în 5 gene diferite, drept factori de prognostic pentru lipsa răspunsului clinic la primul agent biologic administrat pacienților SA: *rs755622* al genei *factorului de inhibare a migrării macrofagului (MIF)*, *rs917997* al genei *proteinei acesorii a receptorului interleukinei 18 (IL18RAP)*, *rs1800896* al genei *interleukinei 10 (IL10)*, *rs1061622* al genei *superfamiliei factorului de necroză tumorală, 1B (TNFRSF1)* și *rs3740691* al genei *proteinei activatoare 2 a GTP-azei factorului de ribozilare a ADP (ARFGAP2)*.

Am obținut, prin combinarea celor 5 polimorfisme identificate mai sus, un model genetic robust de non-răspuns la administrarea primului agent anti TNf-alfa cu putere predictivă ridicată, indicată de aria de sub curba ROC de 0.77 (95% IC: 0.68 - 0.86).

**“IULIU HAȚIEGANU” UNIVERSITY OF MEDICINE AND
PHARMACY OF CLUJ-NAPOCA**

SUMMARY OF THE Ph.D. THESIS

**Relationship of the pharmacological
treatment and genetic polymorphisms
with clinical and structural severity in
ankylosing spondylitis**

PhD student

Ruxandra Elena Schiotis

PhD coordinators

Prof. Dr. Anca Dana Buzoianu

Prof. Dr. Eduardo Collantes-Estevez

Prof. Dr. Simion Şimon

2013

TABLE OF CONTENTS

INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	
1. Ankylosing spondylitis	
1. 1. Clinical and diagnosis considerations	21
1.1.1. Pathogenesis	21
1.1. 2. Clinical features	22
1.1. 3. Clinical examination	23
1.1. 4. Laboratory testing	23
1.1. 5. Diagnosis	24
1.1.6. Monitoring disease progression	25
1. 2. Treatment of ankylosing spondylitis	
1.2.1 Non pharmacologic treatment	28
1.2.1.1. Kinesitherapy	28
1.2. 2. Pharmacologic treatment	29
1.2.2.1. Non steroidal anti-inflammatory drugs	29
1.2.2.2. Disease modifying agents (DMARDS) and corticosteroids	31
1.2.2.3. Anti TNF-alpha agents	32
1.2. 3. Clinical monitoring of response to biological treatment	36
2. Genetic factors and ankylosing spondylitis	
2. 1. Single nucleotide polymorphisms and the pharmacogenomics	37
2.1.1. Single nucleotide polymorphisms (SNPs)	37
2.1. 2. Pharmacogenetics and pharmacogenomics	38
2. 2. The role of HLA-B27 in the etio-pathogenesis of ankylosing spondylitis	39
2. 3. Contribution of other genetic factors in the etio-pathogenesis	40
2. 4. Genetic and prognostic factors for ankylosing spondylitis	41

PERSONAL CONTRIBUTION

1. Work hypothesis/objectives	45
2. General methods and patients	47
3. Influence of NSAIDs and anti TNF alpha agents on radiographic progression in ankylosing spondylitis.	
3.1. Introduction	51
3.2. Objective	52
3.3. Patients and methods	52
3.4. Results	55
3.5. Discussion	60
3.6. Conclusions	62
4. Influence of genetic polymorphisms and clinical factors on the developing of severe functional status in patients with ankylosing spondylitis.	
4.1. Introduction	65
4.2. Objective	66
4.3. Patients and methods	66
4.4. Results	69
4.5. Discussion	72
4.6. Conclusions	75
5. Candidate single nucleotide polymorphisms predictors of treatment non-response to the first anti- tumor necrosis factor in ankylosing spondylitis.	
5.1. Introduction	77
5.2. Objective	78
5.3. Patients and methods	78
5.4. Results	81
5.5. Discussion	90
5.6. Conclusions	93
6. General Discussion	95
7. General Conclusions (synthesis)	97
8. Originality and Innovative contributions	99
REFERENCES	101

Key words: ankylosing spondylitis, SNPs, NSAIDs, biological therapy, radiological progression, response to treatment, BASFI.

CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

Ankylosing spondylitis (AS) is characterized by a close link between inflammation and new bone formation phenomena, which progress is only partially known. The characteristic of the disease is represented by the particular location of the inflammatory process that has the starting point at the enthesis (the insertion of tendons, ligaments and joint capsule to bone), unlike other inflammatory rheumatic diseases, which cause direct inflammation of joint capsule, erosions and joint destruction. Thus, in AS it is prevailing the tendency towards fibrosis and new bone formation.

Pathogenesis of AS is not enough understood. Immune-mediated mechanisms are suggested by the inflammatory lesions of tissues affected detected at histological examination by the high serum levels of acute phase reactants and by the close relationship with HLA-B27 antigen. So far it was not identified any etiological agent of the disease, but the relationship between AS and inflammatory bowel disease (IBD) suggest that enteric bacterial infections may play a trigger role. A relative deficit in the mediation by the cytokine synthesized by T helper 1 cells (Th1), such as TNF-alpha may lead to longer persistence of bacterial antigens and thus prolonged antibacterial immune response may trigger autoimmunity. Several studies conducted by Rudwaleit and Hohler suggested that impaired production of TNF-alpha and IL10 may be partly determined by genetic polymorphisms.

Clinical signs of the disease can range from mild stiffness to completely immobility of the spine, with a possible concomitant involvement of the hips, peripheral joint swelling, or presence of extra-articular manifestations. It was found that only 50% of patients with active disease have increased levels of C-reactive protein (CRP) and increased rate of erythrocyte sedimentation rate (ESR). Moreover, studies have shown a lack of correlation between clinical signs of disease activity (nocturnal back pain, morning stiffness) and CRP and ESR values.

The high variability in the severity of clinical presentation of patients with AS may be related to variability in the contribution of genetic factors involved in the disease. Family studies have suggested that HLA-B27 contributes only in 40% to the overall risk of the disease. In recent years, improvements in genotyping and study design have revolutionized the field of genetics of common diseases, which

had a major impact on AS. There were therefore identified 13 genes other than HLA-B associated with disease susceptibility. In addition, genomic association studies have also revealed non-MHC loci responsible for susceptibility towards AS and other spondyloarthropathies (SpA).

The goals of pharmacological treatment in AS are directed, on the one hand to control the signs and symptoms of disease (disease activity) and to maintain physical function of patients and, on the other hand, to prevent structural damage (radiological progression of disease) with the objective to increase the quality of life of patients and to maintain their socio-economic integration. Thus, in clinical practice internationally validated parameters are used to monitor the course of the disease, such as: BASDAI (Bath Ankylosis Spondylitis Disease Activity Index), BASFI (Bath Ankylosing Spondylitis Functional Index), Basra (Bath Ankylosing Spondylitis Radiological Index), ASDAS (Assessment of SpondyloArthritis International Society), mSASSS (Stoke Ankylosing Spondylitis modified Spine Score).

The only classes of drugs that have proven effective in controlling disease manifestations are non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and the newer anti-TNF-alpha biological agents. However, according to published studies there are 30-40% of patients who do not achieve clinical control of the disease even with this new pharmacological class, in which case genetic factors probably play a key role. Clinical studies have shown that biological treatment administered for 2 years could not stop radiological progression of the disease measured by new bone formation in the spine on conventional radiographs, compared with historical reference cohort in AS, Ankylosing Spondylitis International Outcome in Study (OASIS). However, there are some data in the literature which showed that continuous administration of NSAIDs may reduce the rate of structural damage after 2 years of treatment.

PERSONAL CONTRIBUTION

Background hypothesis

Although the evidence confirmed that the only classes of drugs effective in controlling clinical signs of disease are the NSAIDs – as first stage of treatment, and anti-TNF-alpha agents – as the second stage of treatment - there is, however, a significant proportion of patients who maintained high activity parameters in spite of long term therapy with even biological agents. On the other hand, long influence on radiological progression following the administration of NSAIDs and anti-TNF-

alpha agents is not well known and characterized. Moreover, the majority of the information was obtained from the patients included in clinical trials and less evidence about their effectiveness on real patients provided by the disease registries, is available.

It was found that genetic factors influence both susceptibility and the prognosis of AS. Family studies have shown that functional and radiographic severity in AS has an important genetic component. Therefore, understanding the genetic basis of functional severity in AS would be of major value to differentiate at early stages patients at high risk of severe functional impairment and patients with a lower risk. Thus, clinicians could better select and optimize the preventive and therapeutic approach for each patient as of the time of diagnosis of the disease by objectively distributing high cost treatments.

On the other hand, pharmacogenomic studies, focusing on genes involved in AS etiology and pathogenesis, in order to analyze the role of allelic polymorphisms in the individual difference in treatment response to TNF-alpha inhibitors, are lacking in AS. Taking into account the cost and the potential severe side effects of these agents, identification of genetic biomarkers of treatment inefficacy would be of major use for prospectively selecting patients that will most likely respond to such a treatment.

All three studies of the research theme were approved by the Ethics Committee of the University Hospital "Reina Sofia", Cordoba, Spain. Each patient signed an informed consent upon inclusion in REGISPONSER, in accordance with the fundamental principles established in the Helsinki Declaration of Human Rights.

The first study. Influence of NSAIDs and anti TNF alpha agents on radiographic progression in ankylosing spondylitis.

The objective of our study is to assess the long term influence on the rate of radiographic progression of NSAIDs and TNF- α blockers in a cohort of AS patients seen in daily clinical practice. The secondary objective was to study the evolution of disease activity and physical function of the patients in both treatment groups.

Patients and methods

All patients belong to Spanish Register of Spondyloarthropaties - REGISPONSER. Of all patients with SpA we have selected for this study, only those

who met the modified New York criteria for AS. Patients with AS had to fulfill in addition the following three inclusion criteria: a) a follow-up period since inclusion visit in REGISPONSER of at least three years b) continuous treatment only with NSAIDs at recommended dosage during 3 years and/or c) continuous treatment with a anti-TNF- α agent during 3 years.

BASRI score for spine was applied to the lumbar anterior-posterior and lateral view and to cervical spine only for lateral incidence. The scoring of hip joint was based on the same grading system as the spine. BASRI -total score is the sum of the score of the spine and radiological score of the hips and ranges are between 2 and 16 for patients with AS.

Results

One hundred eighty eight (188) AS patients fulfilled the inclusion criteria. The two treatment groups included 130 patients with continuous treatment with NSAIDs at recommended dosages and 58 patients with continuously treated with biologic therapies (BT). There was no statistical significant difference in demographic and clinical parameters between the two treatment groups at baseline with the exception of peripheral arthritis which was more frequent in BT treatment group and in BASDAI which was higher in NSAIDs group. HLA-B27 antigen was encountered in approximately the same proportion of patients in both treatment groups.

At 3 years evaluation visit, significant increase of structural damage was detected in NSAIDs cohort, both in total radiological score and in the spine score (BASRI total 8.72 (\pm 4) vs. 8.18 (\pm 4.2), p = 0.001), BASRI spine 7.58 (\pm 3) vs. 7.20 (\pm 3.3), p = 0.009). BT cohort of patients did not show statistically significant radiological progression evaluation visit. Average total change of BASRI score (mBASRI-total) after 3 years was 0.54 (\pm 1.82) units for patients taking NSAIDs versus 0.23 (\pm 2.39) units in the group treated with BT, p = 0.067. In what concerns the rate of change in BASRI spine-score (mBASRI- spine), the differences were less significant as, the group of patients treated with NSAIDs showed a change in the score of 0.347 (\pm 1.49) units versus 0.33 (\pm 1.95) in patients treated with BT, p = 0.113. In the final model, predictive factors of high radiological progression rate, by their descending order of odds ratio (OR) were: baseline radiological score in the spine 1.49 (1.04-2.14), baseline total radiological score 0.607 (0.45-0.82) and male gender 0.45 (0.21-0.96).

We saw a clear effect in controlling inflammatory disease activity in BT group of patients over the 3 years, reflected in maintaining low values of both BASDAI score and ASDAS scores. Regarding the evolution of physical function of patients in the 2 groups we found that after 3 years of follow-up treated with NSAIDs experienced a significant deterioration in functional status measured by BASFI score

($p < 0.001$). Patients in the BT treatment group maintained unchanged the physical during the 3 years of follow up ($p = \text{NS}$).

The second study. Influence of genetic polymorphisms and clinical factors on the developing of severe functional status in patients with ankylosing spondylitis.

Taking into consideration the fact that impairment of physical function may be partially controlled by the appropriate treatment, the aim of our study was to identify the baseline clinical and genetic factors that determine individual development of functional severity in AS. We also studied whether there is a combination of clinical and genetic markers that may predict the development of individual functional severity SA.

Patients and methods

We performed a cross-sectional association study on Spanish AS patients which were recruited from 25 hospitals which participated in the Spanish National Spondyloarthropathies Registry (REGISPONSER). The patients had at least 10 years of follow-up from the first symptoms of the disease. Baseline characteristics of the patients at the beginning of the disease were recorded as potential prognostic predictors. To measure functional impairment we used the BASFI score, standardized by adjusting for disease duration since first symptoms, denominated here BASFI/t. There are no validated threshold values for classifying AS patients into mild or severe categories according to their BASFI score standardized by disease duration (BASFI/t). Therefore, to define functional severity we performed four association analyses using the χ^2 . We defined as severe functional status the values of BASFI/t in the top 60th (p60), 65th (p65), 70th (p70) or 75th (p75) percentiles. The cut-off values for BASFI/t severe phenotype for each percentile were: 0.19 for p60, 0.21 for p65, 0.22 for p70, and 0.25 for p75 respectively.

Genomic DNA was isolated from saliva samples using the Oragene™ DNA Self-Collection kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada), according to the manufacturer's extraction protocol. All samples were tested for the presence of the HLA-B27 allele by conventional PCR using the primers reported by Olerup et al.

After an extensive bibliographic search we selected 384 SNPs distributed in 190 genes to be analyzed in this study. We selected all the SNPs previously reported in Caucasians as associated with AS or with other SpA. Besides those SNPs, we included some SNPs in genes described in the literature as associated to other autoimmune diseases and to bone-related disorders, since we considered them as potential candidates to be implicated in AS severity. Finally, we included tag SNPs in

genes from the metabolic pathways of the two most important genes considered to be involved in AS: ERAP1 and IL-23R. SNP genotyping was performed using the Illumina Golden gate genotyping platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)

A test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed for each SNP. Pruning of the initial genotype dataset with default parameters (exclusion of SNPs with poor genotype cloud clustering, of SNPs with call-rate <85%, of SNPs with severe deviation from HWE ($P < 0.0001$) and of samples with call rate <85%) led to 456 samples and 344 SNPs. Association test between allele and genotype frequencies and BASFI/t severe phenotype was performed by the chi-square (χ^2) test. P-values were calculated using a single-value permutation test (1000 permutations). Clinical factors and SNPs were then studied by means of multivariate logistic regression.

Results

The studied cohort included 456 AS patients (348 males and 108 females) with a mean age of 50.8 ± 10.5 years, 26.1 ± 9.1 years at disease onset and 34.6 ± 11.4 years at diagnosis. The average time of evolution, from disease onset, was 24.7 ± 10.1 years. *HLA-B27* was positive in 84.9% of the patients. Patients had mean BASFI at baseline 4.0 ± 2.8 , with mean BASFI/t (years) of 0.17 ± 0.13 .

Of the baseline clinical variables analyzed, the association with BASFI/t severe phenotype for neck pain and older age at disease onset was found to be statistically significant. A slight association was also found for low back pain (p60) and *HLA-B27*. In the allele frequencies test, from the SNPs analyzed, we identified 24 polymorphisms associated with functional severe phenotype in at least one of the patient classifications. Two SNPs showed consistent association with BASFI/t and were significantly associated in all four patient classifications: rs2542151 in the protein tyrosine phosphatase non-receptor type 2 (*PTPN2*) gene [p60 ($P=0.046$), p65 ($P=0.006$), p70 ($P=0.002$) and p75 ($P=0.001$)] and rs2254441 in the proline-serine-threonine phosphatase-interacting protein 1 (*PSTPIP1*) gene [p60 ($P=0.036$), p65 ($P=0.017$), p70 ($P=0.010$) and p75 ($P=0.001$)].

We did not find any model with a good predictive accuracy for BASFI/t for any of the patient classifications, p60, p65, p70, and p75 as none of the ROC curves of the predictive models attained an area under the curve (AUC) above 0.75.

The third study. Candidate single nucleotide polymorphisms predictors of treatment non-response to the first anti-tumor necrosis factor in ankylosing spondylitis.

The aim of our study was to identify SNPs predictors of treatment non-response to the first TNF-alpha inhibitor in Spanish AS patients from daily clinical practice.

Patients and methods

We performed a longitudinal multicenter study on AS patients enrolled in the REGISPONSER registry. Out of all REGISPONSER patients, 529 patients fulfilled the modified New York Criteria for AS (REGISPONSER AS cohort). For this study we only selected the patients with AS who started their first TNF-alpha inhibitor according to ASAS recommendation, during the interval between two REGISPONSER-AS scheduled visits. The decision to commence a particular agent depended on the decision of the attending rheumatologist together with the patient's specific preference. In this study patients could receive concomitant medication with either NSAIDs or DMARDs (sulphasalazine, methotrexate) as prescribed by their rheumatologist.

We classified patients as “responders” if they achieved BASDAI 50 clinical response at the assessment visit and “non-responders” if they failed to achieve BASDAI 50 clinical improvement at the assessment visit, according to ASAS guidelines (a 50% improvement of the initial BASDAI). The primary outcome was to identify genetic polymorphisms associated to patients who commenced TNF-alpha blockers and did not achieve BASDAI 50 improvement criteria at the assessment visit.

Genomic DNA was isolated from saliva samples using the Oragene™ DNA Self-Collection kit (DNA Genotek Inc., Ottawa, Canada), following the manufacturer's extraction protocol. After an extensive bibliographic search, we selected candidate SNPs previously reported to be associated with susceptibility or pathogenesis of AS and with other SpAs, SNPs associated with autoimmune and bone-related diseases, and SNPs from the metabolic pathways of the IL-23 receptor (IL-23R) and endoplasmic reticulum aminopeptidase 1 (ERAP1) genes. In total, 384 candidate SNPs distributed in 190 genes were analyzed in this study. SNP genotyping was performed using the Illumina Golden gate genotyping platform (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA).

A test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed for each SNP using the Helix Tree software version 7.3.1. Pruning of the initial

genotype dataset with default parameters (exclusion of SNPs with poor genotype cloud clustering, of SNPs with call-rate <85%, of SNPs with severe deviation from HWE ($P < 0.0001$), and of samples with call rate <85%) led to 456 samples and 345 SNPs being analyzed. Measures of pairwise linkage disequilibrium ($r^2 > 0.8$) were determined using Haploview version 4.1 (Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, MA). All SNPs reported in this study had minor allele frequency >10%.

An association test between allele frequencies and the treatment response groups was performed with the χ^2 test. The magnitude of allele association was expressed as odds ratio (OR) with a 95% confidence interval (CI) (OR>1 indicates a risk allele, and OR<1 indicates a protective allele). P -values were adjusted using a single value permutation test (1000 permutations). The probability of non-response was modeled using logistic regression. To analyze the predictive power of our genetic model of non-response to biological treatment, AUC-ROC was used (Analyse-it software v2.09, Leeds, UK).

Results

Among the 529 REGISPONER-AS patients, 121 AS patients fulfilled the inclusion criteria. Sixty-eight (56.2%) were responders and fifty-three (43.8%) were non-responders to anti TNF-alpha treatment at the assessment visit after applying BASDAI 50 improvement criteria compared with baseline (initiation of TNF-alpha treatment).

There were no statistically significant differences in baseline clinical and demographic characteristics between the two treatment response groups, with the exception of those patients who did not respond to anti TNF-alpha treatment which had a statistically significantly older age at disease onset (28.4 ± 8.7 vs. 24.2 ± 9.4 ; $P = 0.021$).

From the 345 SNPs tested for association with individual response to anti TNF-alpha agents, 13 polymorphisms showed significant association with treatment response status assessed with BASDAI50. Three SNPs from the *CALM1* (*Calmoduline 1*) gene were in linkage disequilibrium. After adjustment with a single value permutation test, 4 SNPs did not remain significantly associated with treatment response status, two of them were SNPs in the *CALM1* gene; therefore, 9 independent associations were finally identified (table 1).

All 9 polymorphisms that showed significant association with non-response status to biological treatment, in the allele frequencies association test were entered as genotypes in the multivariate model. We found that: rs917997 in the *IL18RAP* gene (OR: 3.35, 95% CI: 1.38- 8.15), rs755622 (OR: 3.14, 95% CI: 1.19- 8.22) in the *MIF* gene, rs1800896 in the *IL10* gene (OR: 3.09, 95% CI: 1.04- 9.15), rs3740691 (OR: 2.90, 95% CI: 1.12- 7.51) in the *ARFGAP2* gene, rs1061622 (OR: 2.46, 95% CI:

1.00- 6.04) in the *TNFRSF1B* gene, were independent predictors of non-response of the first anti-TNF-alpha agent. The genetic model obtained of non-response to treatment has a predictive power, as indicated by the ROC AUC, of 0.77 (95% CI: 0.68 - 0.86).

Table 1. Allelic association test of non-response to anti-TNF-alpha treatment in AS patients.

Snp	Gene	Risk Allele, OR(95%CI)	X ² test Unadjusted p	X ² test Adjusted p*
rs755622	<i>MIF</i>	G, 2.92 (1.41-6.03)	0.002	0.003
rs917997	<i>IL18RAP</i>	A, 2.4 (1.32- 4.35)	0.003	0.005
rs1061622	<i>TNFRSF1B</i>	G, 2.12 (1.15- 3.91)	0.014	0.009
rs4343	<i>ACE</i>	G, 1.82 (1.05- 3.13)	0.029	0.016
rs4355801	TNFRSF11B	A, 1.79 (1.04- 3.08)	0.031	0.051
rs6060369	<i>UQC</i>	A, 1.77 (1.03- 3.02)	0.035	0.032
rs3740691	<i>ARFGAP2</i>	A, 1.76 (1.03- 3.02)	0.035	0.031
rs764481	CYP2D6	G, 1.77 (1.02- 3.09)	0.040	0.077
rs331377	<i>ASPN</i>	G, 1.7 (1.01- 2.84)	0.041	0.043
rs3213718	<i>CALM1</i>	A, 1.72 (1.01- 2.92)	0.043	0.044
rs1800896	<i>IL10</i>	A, 1.69 (1.01- 2.84)	0.044	0.029
rs2300496	CALM1	A, 1.68 (1.002 - 2.83)	0.048	0.055
rs2300500	CALM1	G, 1.68 (1.002-2.83)	0.048	0.055

General conclusions

At the end of three years of the study, patients treated with biologic therapy had a slower rate of progression without statistical significance, both in the spine and in total radiological damage score.

Patients treated with NSAIDs recorded at the end of the 3 years of follow-up statistically significant radiological progression both in spine and in total radiological damage score.

In the analysis of covariance we have shown that radiological progression at the end of the 3 years of monitoring occurs regardless of the type of treatment administered NSAIDs or biological agents.

The results showed that treatment with anti-TNF-alpha agents does not lead to a higher rate of progression than treatment with NSAIDs.

We confirmed that the initial structural damage and male gender are predictive factors of high radiological progression in patients with AS.

The presence of HLA-B27 was not associated with radiological progression rate.

Our results confirm that the development of a severe functional status is associated with both clinical and genetic factors.

We report that that advanced age at onset, neck pain, polymorphisms rs2542151 (*PTPN2*) and rs2254441 (*PSTPIP1*) are potential predictors of progression to severe functional impairment in patients with AS.

In consistency with previously published data, our study found that the percentage of patients achieving clinical criteria of response BASDAI 50 after 12 months of follow-up was 56.2%.

The presence of *HLA-B27* was not associated with the type of response to anti-TNF-alpha biologic therapy, confirming existing data in the literature.

We identified five polymorphisms located in 5 different genes as prognostic factors for the lack of clinical response to the first biological agent in AS patients: rs755622 in *macrophage migration inhibitory factor (MIF)* gene, rs917997 in *interleukin 18 accessory receptor protein (IL18RAP)*, rs1800896 in *interleukin 10 (IL10)* gene, rs1061622 in *tumor necrosis factor superfamily, 1B (TNFRSF1B)* gene and rs3740691 in *ADP-ribosylation factor GTPase activating protein 2 (ARFGAP2)* gene.

We obtained by combining the above 5 polymorphisms a robust genetic model of non-response to the first anti-TNF-alpha agent with high predictive power, as indicated by the area under the ROC curve of 0.77 (95% CI: 0.68 - 0.86).