



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Dynamics of TNF during TNF inhibitor treatment

Berkhout, L.C.

**Publication date**  
2021

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Berkhout, L. C. (2021). *Dynamics of TNF during TNF inhibitor treatment*. [Thesis, externally prepared, Universiteit van Amsterdam].

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

# Appendix

English summary  
Nederlandse samenvatting  
List of publications  
Author contributions  
PhD portfolio  
Curriculum Vitae  
Dankwoord



## English Summary

### Dynamics of TNF during TNF inhibitor treatment

Tumor necrosis factor (TNF) is an important pro-inflammatory cytokine with a key role in inflammation. It elicits a wide range of cellular responses, and tight regulation of this potent cytokine is therefore of major importance. This is highlighted by the fact that TNF is an important mediator driving pathogenesis of several chronic inflammatory autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis (RA), inflammatory bowel disease (IBD) and ankylosing spondylitis (AS). Higher concentrations of circulating TNF have been observed in autoimmune disease patients compared to healthy individuals. The amount of TNF associated with disease activity. These results fit with the idea that too much TNF contributes to inflammation in chronic autoimmune diseases. Blocking TNF with TNF inhibitors (TNFi) will eliminate the surplus of TNF, leading to subsequent symptoms alleviation. TNFi were indeed a major breakthrough in the treatment of autoimmune diseases. Five different TNFi are nowadays widely used in the clinic: adalimumab, golimumab, infliximab, etanercept and certolizumab.

TNFi treatment can be that effective that, once in remission, a proportion of patients can successfully discontinue treatment. This suggests that in these patients, blocking TNF is no longer required for disease control. This led to the hypothesis that TNF levels decrease in patients who are in clinical remission. Monitoring TNF during TNFi treatment could therefore be a potential biomarker in predicting successful treatment discontinuation, and might help to personalize TNFi treatment.

In **Chapter 2** the dynamics of circulating TNF in adalimumab-treated RA patients was explored. Since TNFi significantly interfere in conventional TNF ELISAs, we first developed a so called “drug-tolerant” competition ELISA. This assay allowed the quantification of TNF in presence of large amounts of TNFi. Using this assay, we demonstrated a paradoxical increase in TNF shortly after start of adalimumab treatment. This can be explained by prolongation of the TNF half-life due to complex formation with the TNFi. Important to mention is that these high amounts of TNF were in complex and thus biologically inactive. Surprisingly, a similar increase in TNF was found in healthy volunteers after one dose of adalimumab. After the initial increase, TNF concentrations stabilized and remained remarkably stable in the majority of patients for at least two years. This was irrespective of disease activity. Hence, in contrast to what we expected, TNF levels did not decrease in patients in remission. We did find that low TNF concentrations at week four after start of adalimumab treatment associated with future anti-drug antibody (ADA) formation and a diminished clinical response. Early low TNF was also associated with less frequent

methotrexate use at baseline and less frequent remission after 52 weeks. Finally, this study highlights a conundrum with respect to treatment discontinuation. Circulating TNF concentrations typically remained high, up to even half a year after adalimumab treatment discontinuation. Overall, these findings indicate that TNF cannot be used as a biomarker for treatment discontinuation. However, early low TNF concentrations can be used as a biomarker to predict future ADA formation in the early phase of treatment, which might help to identify those patients who will most likely not respond to TNFi treatment.

The results of Chapter 2 raised new questions regarding a potential direct effect of methotrexate on TNF concentrations, in the context of ADAs. Methotrexate is an immunosuppressant that significantly reduces ADA formation, and is suggested to inhibit pro-inflammatory cytokine production. Hence, it is remarkable that patients treated with methotrexate, in addition to adalimumab, had higher TNF concentrations at week four. The direct effect of methotrexate on TNF concentrations, independent of ADAs, was investigated in more detail in etanercept-treated RA patients in **Chapter 3** (as etanercept in general does not give rise to ADAs). Circulating TNF concentrations did not associate with methotrexate-use in etanercept-treated patients. This implies that methotrexate does not have a direct effect on TNF concentrations in circulation and that the association between early low TNF and non-use of methotrexate for adalimumab is thus most likely due to ADA formation. Similar as during adalimumab treatment, TNF concentrations in etanercept-treated patients were not related with remission. Together with the results from Chapter 2 we therefore conclude that circulating TNF concentrations during TNFi treatment are not primarily associated with (suppressed) inflammation or disease activity.

**Chapter 4** comments on a study by Tanaka and colleagues. They adjusted infliximab dose based on TNF concentrations at baseline, under the assumptions that baseline TNF concentrations can be accurately measured, and that high disease activity (i.e. more inflammation) is associated with higher TNF concentrations. However, results obtained in Chapter 2 and 3 argue against these assumptions.

The dynamics in TNF during treatment with all five TNFi were summarized in **Chapter 5**. Steady-state TNF concentrations varied significantly, with the highest concentrations observed during etanercept and certolizumab treatment. The absence of clearance of TNF-drug complexes for etanercept and certolizumab was found to be important to explain the variation in drug-bound TNF concentrations. Production of TNF was not differently affected by the five TNFi. Furthermore, TNFi concentrations as low as 0.1 µg/mL were sufficient to block all TNF. This lower limit was in accordance with data from patients who discontinued TNFi treatment (Chapter 2).

In our group, the impact of ADAs on the pharmacokinetics and pharmacodynamics is mostly investigated during adalimumab treatment. Limited data was available for certolizumab, and the impact of anti-certolizumab antibodies on clinical outcome showed mixed results. The study in **Chapter 6** describes the relationship between certolizumab concentrations, ADAs, and the effective TNF neutralizing capacity in sera of RA patients. Detection of ADAs was demonstrated in the majority of certolizumab-treated patients, but did not affect the certolizumab concentration. Certolizumab was very potent in neutralizing TNF, and the certolizumab serum concentration directly correlated with the capacity to neutralize TNF. This was not affected by the detection of ADAs. Similar findings were observed for adalimumab. Together, these results indicate that measurement of TNFi concentrations, rather than ADAs, have direct clinical significance.

In conclusion, the results presented in this thesis are in contrast with the original idea that too much TNF contributes to inflammation in chronic autoimmune diseases. Our studies provide new insights in the relation between TNF concentrations and immunogenicity, which may contribute to the optimization and personalization of TNFi treatment.



## Nederlandse samenvatting

### De dynamiek van TNF tijdens behandeling met TNF blokkers

Tumor necrose factor (TNF) is een belangrijk pro-inflammatoir cytokine met een sleutelrol bij ontstekingen. Het induceert een breed scala aan cellulaire reacties en een strakke regulering van dit krachtige cytokine is daarom van groot belang. Dit wordt benadrukt door het feit dat TNF een belangrijke drijver is in de pathogenese van verschillende chronische inflammatoire auto-immuunziekten, waaronder reumatoïde artritis (RA), de ziekte van Bechterew en inflammatoire darmziekte. In patiënten met een auto-immuunziekte zijn hogere concentraties circulerend TNF waargenomen dan in gezonde personen. De hoeveelheid TNF was geassocieerd met ziekteactiviteit. Deze resultaten sluiten aan bij de gedachte dat te veel TNF bijdraagt aan ontstekingen in chronische auto-immuunziekten. Het blokkeren van TNF met TNF blokkers zal het overschot aan TNF wegnemen, wat leidt tot verlichting van symptomen. TNF blokkers waren inderdaad een belangrijke doorbraak in de behandeling van auto-immuunziekten. Vijf verschillende TNF blokkers worden tegenwoordig veel gebruikt in de kliniek: adalimumab, golimumab, infliximab, etanercept en certolizumab.

De behandeling met TNF blokkers kan zo effectief zijn dat, eenmaal in remissie, een deel van de patiënten de behandeling met succes kan stoppen. Dit suggereert dat bij deze patiënten het blokkeren van TNF niet langer nodig is om de ziekte onder controle te houden. Dit leidde tot de hypothese dat de hoeveelheid TNF zal dalen in patiënten in klinische remissie. Het monitoren van TNF tijdens behandeling met TNF blokkers zou daarom een potentiële biomarker kunnen zijn bij het voorspellen van succesvolle stopzetting van de behandeling. Bovendien zou het kunnen bijdragen aan het personaliseren van TNF blokker behandeling.

In **Hoofdstuk 2** werd in patiënten behandeld met adalimumab de dynamiek van circulerend TNF onderzocht. Omdat TNF blokkers significant interfereren met conventionele TNF ELISA's, hebben we eerst een zogenaamde "drug-tolerant" competitie ELISA ontwikkeld. Deze test maakte de kwantificering van TNF mogelijk in aanwezigheid van grote hoeveelheden TNF blokker. Met behulp van deze test hebben we een paradoxale toename van TNF aangetoond, kort na aanvang van de behandeling met adalimumab. Dit kan worden verklaard door een verlenging van de TNF halfwaardetijd, als gevolg van complex vorming met de TNF blokker. Belangrijk om te vermelden is dat deze grote hoeveelheden TNF in complex was en dus biologisch inactief. Verrassend genoeg vonden we een vergelijkbare toename in TNF in gezonde vrijwilligers na één dosis adalimumab. Na deze initiële verhoging stabiliseerde de hoeveelheid TNF en bleef het gedurende ten

minste twee jaar opmerkelijk stabiel in de meeste patiënten. Dit was onafhankelijk van de ziekteactiviteit. In tegenstelling tot wat we hadden verwacht, nam de hoeveelheid TNF dus niet af in patiënten in remissie. We vonden wel dat lage hoeveelheden TNF in week vier na aanvang van de behandeling met adalimumab werd geassocieerd met toekomstige antistof vorming en een verminderde klinische respons. Lage TNF in de vroege fase was ook geassocieerd met minder frequent gebruik van methotrexaat bij aanvang van de TNF blokker behandeling en minder frequente remissie na 52 weken. Ten slotte benadrukt deze studie een raadsel met betrekking tot het stoppen van de behandeling. Circulerend TNF bleef opvallend hoog, tot zelfs een half jaar na stoppen van adalimumab behandeling. Over het algemeen geven deze bevindingen aan dat TNF niet kan worden gebruikt als biomarker voor het stoppen van de behandeling. Lage TNF concentraties in de vroege fase kunnen echter worden gebruikt als een biomarker om toekomstige antistof vorming in de vroege behandelingsfase te voorspellen, wat zou kunnen helpen om die patiënten te identificeren die hoogstwaarschijnlijk niet zullen reageren op behandeling met TNF blokkers.

De resultaten van Hoofdstuk 2 riepen nieuwe vragen op over een mogelijk direct effect van methotrexaat op TNF concentraties, in de context van antistoffen. Methotrexaat is een ontstekingsremmer dat de vorming van antistoffen significant vermindert en er wordt gesuggereerd dat het de productie van pro-inflammatoire cytokines remt. Het is daarom opmerkelijk dat patiënten die behandeld werden met methotrexaat, naast adalimumab, hogere TNF concentraties hadden op week vier. Het directe effect van methotrexaat op TNF concentraties, onafhankelijk van antistoffen, werd in **Hoofdstuk 3** nader onderzocht in etanercept-behandelde RA patiënten (aangezien etanercept in het algemeen geen aanleiding geeft tot antistoffen). Circulerende TNF concentraties associeerde niet met het gebruik van methotrexaat in etanercept-behandelde patiënten. Dit impliceert dat methotrexaat geen direct effect heeft op TNF concentraties in circulatie, en dat de associatie tussen vroege lage TNF en het niet gebruiken van methotrexaat bij adalimumab dus hoogstwaarschijnlijk wordt verklaard door antistof vorming. Net als bij behandeling met adalimumab, was de TNF concentratie in patiënten behandeld met etanercept niet gerelateerd aan remissie. Samen met de resultaten uit Hoofdstuk 2 concluderen we daarom dat circulerende TNF concentraties tijdens behandeling met TNF blokkers niet primair geassocieerd zijn met (onderdrukte) ontsteking of ziekteactiviteit.

**Hoofdstuk 4** beschrijft een reactie op een onderzoek van Tanaka en collega's. Ze pasten de infliximab dosering aan op basis van TNF concentraties bij start van behandeling, in de veronderstelling dat TNF concentraties bij start van behandeling nauwkeurig kunnen worden gemeten, en dat hoge ziekteactiviteit (d.w.z. meer ontsteking) geassocieerd is met



hogere TNF concentraties. De resultaten die zijn verkregen in Hoofdstuk 2 en 3 pleiten echter tegen deze aannames.

De dynamiek in TNF tijdens de behandeling met alle vijf de TNF blokkers werd samengevat in **Hoofdstuk 5**. Steady-state TNF concentraties varieerden significant, waarbij de hoogste concentraties werden waargenomen tijdens behandeling met etanercept en certolizumab. De afwezigheid van klaring van TNF-etanercept en TNF-certolizumab complexen bleek belangrijk te zijn om de variatie in TNF-blokker gebonden TNF concentraties te verklaren. De productie van TNF werd niet verschillend beïnvloed door de vijf TNF blokkers. Bovendien waren TNF blokker concentraties zo laag als 0,1 µg/mL voldoende om alle TNF te blokkeren. Deze ondergrens was in overeenstemming met gegevens van patiënten die de behandeling met TNF blokkers stopzetten (Hoofdstuk 2).

In onze groep is de impact van antistoffen op de farmacokinetiek en farmacodynamiek voornamelijk onderzocht tijdens behandeling met adalimumab. Data voor certolizumab was beperkt, en de impact van anti-certolizumab antistoffen op de klinische uitkomst was variabel. De studie in **Hoofdstuk 6** beschrijft de relatie tussen certolizumab concentraties, antistoffen en het effectieve TNF neutraliserend vermogen in sera van RA patiënten. In de meeste certolizumab-behandelde patiënten werden antistoffen aangetoond, maar dit had geen invloed op de certolizumab concentratie. Certolizumab was zeer krachtig in het neutraliseren van TNF en de serumconcentratie van certolizumab hing direct samen met het vermogen om TNF te neutraliseren. Dit werd niet beïnvloed door de detectie van antistoffen. Vergelijkbare bevindingen werden waargenomen voor adalimumab. Samen geven deze resultaten aan dat meting van TNF blokker concentraties, in plaats van antistoffen, een directe klinische betekenis heeft.

Concluderend, de resultaten die in dit proefschrift worden gepresenteerd zijn in tegenstelling tot de oorspronkelijke gedachte dat te veel TNF bijdraagt aan ontstekingen bij chronische auto-immuunziekten. Onze studies bieden nieuwe inzichten in de relatie tussen TNF concentraties en immunogeniciteit, wat mogelijk kan bijdragen aan de optimalisatie en personalisatie van behandeling met TNF blokkers.



## List of publications

**LC Berkhout**, MJ l'Ami, EH Vogelzang, F Hooijberg, S Kruithof, MH Hart, AEH Bentlage, D Thomas, S Vermeire, G Vidarsson, A ten Brinke, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens

Formation and clearance of TNF-TNF inhibitor complexes during TNF inhibitor treatment.

*Manuscript in preparation*

**LC Berkhout**, MJ l'Ami, CLM Krieckaert, EH Vogelzang, D Kos, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens

The effect of methotrexate on tumor necrosis factor concentrations in etanercept-treated rheumatoid arthritis patients.

*Rheumatology (Oxford)* 2020; 59 (7)

**LC Berkhout**, EH Vogelzang, MH Hart, FC Loeff, L Dijk, NIL Derksen, R Wieringa, WA van Leeuwen, CLM Krieckaert, A de Vries, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens  
The effect of certolizumab drug concentration and anti-drug antibodies on TNF neutralization.

*Clinical and Experimental Rheumatology* 2020; 38 (2)

**LC Berkhout\***, MJ l'Ami\*, GJ Wolbink, T Rispens

Comment on 'Sustained discontinuation of infliximab with a raising-dose strategy after obtaining remission in patients with rheumatoid arthritis: the RRRR study, a randomized controlled trial' by Tanaka *et al.*

*Annals of the Rheumatic Diseases* 2019; [Epub ahead of print]

**LC Berkhout\***, MJ l'Ami\*, J Ruwaard, MH Hart, P Ooijevaar-de Heer, K Bloem, MT Nurmohamed, RF van Vollenhoven, M Boers, DF Alvarez, CH Smith, GJ Wolbink, T Rispens

Dynamics of circulating TNF during adalimumab treatment using a drug-tolerant TNF assay.

*Science Translational Medicine* 2019; 11 (477): eaat3356

\* equally contributed



## Author contributions

### **Chapter 2 Dynamics of circulating TNF during adalimumab treatment using a drug-tolerant TNF assay**

Authors: LC Berkhout, MJ l'Ami, J Ruwaard, MH Hart, P Ooijevaar-de Heer, K Bloem, MT Nurmohamed, RF van Vollenhoven, M Boers, DF Alvarez, CH Smith, GJ Wolbink, T Rispens

Study design: LCB, MJIA, GJW, TR

Data acquisition: LCB, MJIA, JR, MHH, PO-dH, KB

Data analysis: all authors

Writing of manuscript: LCB, MJIA, GJW, TR

### **Chapter 3 The effect of methotrexate on tumor necrosis factor concentrations in etanercept-treated rheumatoid arthritis patients**

Authors: LC Berkhout, MJ l'Ami, CLM Krieckaert, EH Vogelzang, D Kos, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens

Study design: LCB, MJIA, GJW, TR

Data acquisition: LCB, MJIA, DK

Data analysis: all authors

Writing of manuscript: LCB, MJIA, GJW, TR

### **Chapter 4 Comment on 'Sustained discontinuation of infliximab with a raising-dose strategy after obtaining remission in patients with rheumatoid arthritis: the RRRR study, a randomized controlled trial' by Tanaka *et al.***

Authors: LC Berkhout, MJ l'Ami, GJ Wolbink, T Rispens

Writing of manuscript: LCB, MJIA, GJW, TR

### **Chapter 5 Formation and clearance of TNF-TNF inhibitor complexes during TNF inhibitor treatment**

Authors: LC Berkhout, MJ l'Ami, EH Vogelzang, F Hooijberg, S Kruithof, MH Hart, AEH Bentlage, D Thomas, S Vermeire, G Vidarsson, A ten Brinke, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens

Study design: LCB, GJW, TR

Data acquisition: LCB, MJIA, EHV, FH, SK, MHH, AEHB

Data analysis: all authors

Writing of manuscript: LCB, GJW, TR

**Chapter 6 The effect of certolizumab drug concentration and anti-drug antibodies on TNF neutralization**

Authors: LC Berkhout, EH Vogelzang, MH Hart, FC Loeff, L Dijk, NIL Derksen, R Wieringa, WA van Leeuwen, CLM Krieckaert, A de Vries, MT Nurmohamed, GJ Wolbink, T Rispens

Study design: LCB, EHV, GJW, TR

Data acquisition: LCB, EHV, MHH, LD, NILD, RW, WAvL, CLMK

Data analysis: LCB, EHV, FCL, Adv, CLMK, MTN, GJW, TR

Writing of manuscript: LCB, EHV, GJW, TR

## PhD portfolio

### PhD training

| <i>Courses</i>   | <b>Year</b> | <b>ECTS</b> |
|--|-------------|-------------|
| Sanquin Science Course                                     | 2016        | 0.5         |
| Scientific English Writing                                 | 2016        | 3           |
| Pharmacokinetics   | 2017        | 1.5         |
| Advanced Immunology  | 2017        | 2.5         |
| <br><i>Seminars, meetings and masterclasses</i>            |             |             |
| Immunopathology Department meetings                        | 2015-2019   | 5           |
| Journal Club   | 2015-2019   | 2           |
| Sanquin Seminars   | 2015-2019   | 5           |
| Landsteiner Lectures and guest speaker seminars            | 2015-2019   | 2.5         |
| Sanquin Science Day (3x poster)                            | 2016-2018   | 0.5         |
| <br>Masterclass: Biologics - towards personalized medicine |             |             |
| Annual ARC Amstel Symposium, The Netherlands (oral)        | 2017-2020   | 2           |
| TDM Symposium, The Netherlands                             | 2018        | 0.8         |
| <br><i>Conferences</i>                                     |             |             |
| ENII Summer School – Advanced Immunology (poster)          | 2016        | 2           |
| NVVI & British Society for Immunology (BSI) (poster)       | 2016        | 1.25        |
| AI&II PhD retreat (2x oral)                                | 2017-2018   | 2           |
| European League against Rheumatism (EULAR) (poster 3x)     | 2018        | 2.5         |
| European Congress of Immunology (ECI) (poster)             | 2018        | 2.5         |
| Dutch Society for Rheumatology (NVR) (oral)                | 2018        | 1.2         |
| Protein & Antibody Engineering Summit (PEGS) (poster)      | 2019        | 2           |
| Winterschool NVVI (poster)                                 | 2019        | 1           |
| <br><b>Teaching</b>  |             |             |
| Computer course assistant – Immunology                     | 2018-2019   | 1           |
| MSc student Elisabeth de Zeeuw (6 months)                  | 2018        | 3           |
| MSc student Miriam Nieto Solis (5 months)                  | 2018-2019   | 2.5         |

**Parameters of Esteem**

*Grants*

|                                 |      |
|---------------------------------|------|
| ENII Summer School Travel Grant | 2016 |
| NVVI Travel Grant               | 2019 |
| AI&II Travel Grant              | 2019 |

*Awards*

|                                  |      |
|----------------------------------|------|
| Sanquin Science Day poster award | 2018 |
|----------------------------------|------|



## Curriculum Vitae

Lea Berkhout, helft van een tweeling, is op 5 juni 1992 geboren in Hoorn. In 2010 behaalde zij haar VWO diploma en daarna begon zij aan de Vrije Universiteit te Amsterdam met de bacheloropleiding Gezondheid en Leven. Haar bachelor stage liep ze op de afdeling Centrum voor Experimentele en Moleculaire Geneeskunde van het Academisch Medisch Centrum in Amsterdam. Zij werd begeleid door Dr. Daan de Boer en Dr. Cornelis van 't Veer en onderzocht de rol van co-receptoren van het antistolling proteïne C systeem in allergische astma. In 2013 behaalde zij haar bachelor cum laude, en vervolgde zij haar opleiding aan de Vrije Universiteit met een master Biomedische wetenschappen. Tijdens haar eerste masterstage droeg zij bij aan de ontwikkeling van een sluimerende *Mycobacterium marinum* stam onder leiding van Dr. Suzanna Commandeur en Prof. Dr. Wilbert Bitter op de afdeling Medische Microbiologie en Infectiepreventie aan de Vrije Universiteit. Vervolgens schreef zij haar literatuurstudie over de rol van microdeeltjes in longziekten aan de afdeling Longziekten in het Academisch Medisch Centrum onder leiding van Dr. Marlous Sneeboer. Haar masteropleiding rondde zij in 2015 cum laude af met een masterstage die plaatsvond bij Janssen in Leiden waar zij onder leiding van Richard Voorzaat en Graham Whyteside onderzoek deed naar expressie en stabiliteit van een RSV F en G fusie eiwit. Aansluitend begon zij haar promotieonderzoek bij Sanquin Amsterdam op de afdeling Immunopathologie onder begeleiding van Dr. Theo Rispens en Dr. Gertjan Wolbink. Hier onderzocht zij de rol van TNF tijdens behandeling met TNF blokkers in reumatische aandoeningen. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in dit proefschrift.





