

Il RANK Ligando quale target terapeutico nel trattamento delle pazienti anziane con osteoporosi

RANK Ligand as a therapeutic target in the treatment of older patients with osteoporosis

L.J. DOMINGUEZ, G. DI BELLA, P. DAMIANI, M. BELVEDERE, M. BARBAGALLO

Cattedra di Geriatria, Università di Palermo

Cortical and trabecular bone undergo a continuous and balanced remodeling process, which consists of a phase of resorption, mediated by osteoclasts, and a phase of neof ormation mediated by osteoblasts. The activity of both, osteoblasts and osteoclasts, is regulated by the osteocytes, which are the most abundant cells in bone tissue. An imbalance of this process with an excessive resorption activity causes a loss of bone mass and microarchitectural deterioration of the skeleton, with consequent reduction of bone strength and increased risk of fractures. The ligand for the "Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B" (RANK-L), a protein expressed by osteoblasts, plays a fundamental role in the formation, activation and survival of osteoclasts, through interaction with its receptor RANK, expressed on the surface of osteoclasts. The discovery of the role of RANK-L in the pathogenesis of osteoporosis has led to study the effects of its inhibition as a new approach and specific antiresorptive therapy. In several preclinical models of postmenopausal osteoporosis, the inhibition of RANK-L has prevented the loss of bone mass and deterioration of bone microarchitecture and has been associated with increased bone strength at both vertebral and femoral skeletal sites. In humans, subcutaneous administration, every 6 months, of a fully human monoclonal antibody directed specifically against RANK-L (denosumab) has determined, in the course of randomized controlled clinical trials, significant and continuous increases in bone mineral density (BMD) over time at all skeletal sites - trabecular and cortical - examined (lumbar spine, femoral neck and distal radius), and rapid, marked and prolonged reductions in markers of bone turnover in women with osteopenia or postmenopausal osteoporosis. Inhibition of RANK-L with this monoclonal antibody has been shown to significantly reduce the risk of vertebral (-68%), non-vertebral (-20%), and femoral (-40%) fractures, after 3 years of treatment in postmenopausal women with osteoporosis. The extension of these studies to five years has confirmed the effects of treatment with denosumab on BMD, on the inhibition of bone remodeling and on fracture risk. The frequency and type of adverse events reported were similar to that of placebo or treatment with bisphosphonates, indicating a good tolerability profile. These data suggest that the specific inhibition of RANK-L represents an innovative therapeutic approach for reducing the risk of fragility fractures.

Key words: Bone remodeling • RANK • RANKL • Denosumab • Osteoblast • Osteoclast • Osteocyte

Introduzione

Il rimodellamento osseo è un processo complesso che coinvolge numerose cellule, fattori di crescita e citochine. Questo processo permette la crescita dello scheletro nelle prime fasi della vita e partecipa alla omeostasi minerale di calcio, fosforo e magnesio.

Nell'adulto giovane, il rimodellamento osseo è in equilibrio tra formazione e riassorbimento attraverso il controllo dell'attività degli osteoblasti e degli osteoclasti da parte degli osteociti. Nell'osteoporosi e nell'invecchiamento questo si sbilancia a favore del riassorbimento, con una conseguente perdita ossea.

La via di segnale osteoprotegerina/attivatore del recettore del fattore nucleare kappa-B/RANK ligando (OPG/RANK/RANK-L) costituisce un fondamentale meccanismo di modulazione del rimodellamento osseo e rappresenta una innovativa possibilità nel trattamento dell'osteoporosi e nella riduzione del rischio di fratture da fragilità. In questo articolo si esamineranno brevemente le variazioni di questo equilibrio partendo dal rimodellamento osseo in condizioni fisiologiche, così come le opzioni terapeutiche di recente disponibilità basate sulla modulazione del segnale OPG/RANK/RANK-L.

Fisiologia ossea e rimodellamento

L'osso è un tessuto connettivo altamente specializzato che fornisce sostegno e protezione agli organi vitali, agisce come un sito per l'ancoraggio dei muscoli, come luogo della ematopoiesi nel midollo osseo e come un serbatoio di ioni minerali essenziali. L'osso è un tessuto dinamico, in grado di rinnovarsi e rimodellarsi in risposta a diversi stimoli, come gli ormoni, le forze meccaniche e l'invecchiamento. Il tessuto osseo è un materiale relativamente solido e leggero, formato per la maggior parte di fosfato di calcio nella forma di idrossiapatite di calcio, dando al tessuto osseo la sua caratteristica rigidità. L'osso ha anche un notevole grado di elasticità che dipende principalmente dalla presenza di collagene. Il tessuto osseo è composto di cellule vive e morte incorporate nella matrice mineralizzata formata da collagene di tipo I, proteoglicani, e diverse proteine non collagene, tra cui l'osteocalcina, l'osteopontina, la proteina Gla, la trombospondina, la fibronectina, e le sialoproteine ossee. È anche un ricco deposito

di fattori di crescita (i.e. fattori di crescita simili all'insulina [IGFs], fattori di crescita dei fibroblasti [FGFs], fattori di crescita derivati dalle piastrine [PDGFs], e varie proteine morfogenetiche [BMPs])¹. A livello macroscopico, ci sono due tipi di osso: corticale (80% della massa ossea, principalmente nelle ossa lunghe) e trabecolare (20% della massa ossea, che si trova nella metafisi ed epifisi delle ossa lunghe e all'interno delle vertebre). L'osso trabecolare è rimodellato più rapidamente, ed è quindi più rapidamente influenzato dalle condizioni associate a un aumento del turnover osseo². La capacità del tessuto osseo di adattarsi ai diversi stimoli è resa possibile grazie alla sua complessa composizione. Le cellule specializzate contenute nella matrice ossea includono osteoclasti, osteoblasti, osteociti e cellule di rivestimento.

Il processo di rimodellamento osseo avviene durante tutta la vita nelle unità multicellulari di base (BMU), composte da cellule ossee e da matrice. Il rimodellamento osseo è un processo altamente organizzato, con il quale il tessuto osseo soddisfa i bisogni strutturali e metabolici. Esso consente allo scheletro di rispondere alla riparazione delle sollecitazioni meccaniche e di prevenire i microdanni ossei, di mantenere la qualità ossea e permette il rilascio dei fattori di crescita e dei minerali essenziali (calcio, fosforo e magnesio) nella circolazione. Dal punto di vista evolutivo, è stato suggerito che il rimodellamento osseo è stato fondamentale per lo sviluppo della ghiandola mammaria durante la gravidanza e per la propagazione dei mammiferi³. Il rimodellamento osseo inizia con la differenziazione dei precursori ematopoietici per formare osteoclasti, favorita dall'azione degli osteoblasti, per via del contatto diretto cellula a cellula o attraverso il rilascio di fattori solubili. Ai fini di garantire l'equilibrio tra degradazione e neoformazione di matrice ossea, questi due processi sono strettamente accoppiati. L'accoppiamento è reso possibile dalla cross-talk tra cellule ossee e attraverso il rilascio dei diversi fattori di crescita e citochine. Il regolatore principale della differenziazione osteoclastica è il RANK-L, una proteina di membrana e solubile che si lega al suo recettore (RANK) espresso nelle cellule della linea osteoclastica⁴ (Fig. 1). Il RANK-L è prodotto dagli osteoblasti e dai linfociti T attivati⁵. La formazione degli osteoclasti è limitata dalla osteoprotegerina (OPG), una citochina prodotta dagli osteoblasti e dalle cellule stromali⁶ che agisce come "falso recettore" legando il RANK-L.

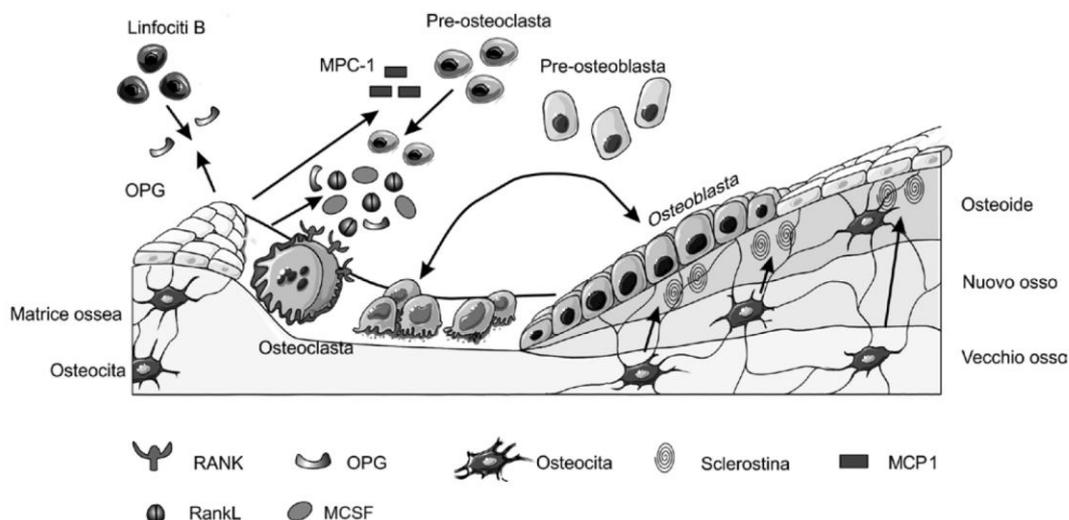


Fig. 1. Rimodellamento osseo mediato dalla via di segnale OPG / RANK / RANK-L in una unità multicellulare di base. Il precursore degli osteoclasti matura verso una cellula multinucleata sotto l'influenza di numerosi fattori, tra cui ormoni, citochine, e fattori di crescita. La cellula multinucleata si differenzia verso un osteoclasta attivo in presenza di MCSF e RANK-L. Una volta attivato, l'osteoclasta inizia a degradare la superficie ossea, formando una lacuna. OPG, il "falso recettore" di RANK-L, inibisce il legame tra RANK-L e RANK, portando alla apoptosi degli osteoclasti. In seguito, la formazione ossea inizia con la maturazione dei pre-osteoblasti in osteoblasti, che costituiranno il nuovo tessuto osseo. MCSF: macrophage colony stimulating factor; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1.

La formazione di nuovo osso, una volta avviata il riassorbimento, è sostenuta da vari fattori di crescita, tra cui l'IGF-I, IGF-II, bFGF, PDGF e TGFs, che vengono rilasciati dagli osteoclasti e dalla matrice ossea, e che agiscono sugli osteoblasti ⁷.

OSTEOCLASTI

Queste sono cellule giganti, polinucleate, che riassorbono l'osso e derivano dalla fusione delle cellule ematopoietiche della linea monocito/macrofagica. Gli osteoclasti sono in genere localizzati nelle depressioni di riassorbimento note come "lacune di Howship", e sono caratterizzati da una elevata espressione di proteasi, come la fosfatasi acida tartrato resistente (TRAP), la catepsina K, e le metalloproteinasi di matrice, sulla superficie del "ruffled border" (membrana plasmatica contorta, a causa del movimento delle vescicole ricche di pompe protoniche), che è orientato verso la superficie ossea per facilitare la rimozione della matrice ossea ⁸; gli osteoclasti hanno anche la capacità di acidificare le lacune di riassorbimento attraverso l'azione delle pom-

pe di H⁺-ATPasi localizzate nella membrana. La differenziazione e l'attività osteoclastiche sono controllate da due regolatori principali prodotti dalle cellule stromali del midollo osseo e dagli osteoblasti: il RANK-L e il fattore stimolante delle colonie di macrofagi (M-CSF) ⁹.

OSTEOBLASTI

Queste cellule derivano dalle cellule staminali mesenchimali pluripotenti e la loro funzione principale è la sintesi e l'organizzazione della matrice ossea (osteoide). Essi hanno un reticolo endoplasmatico molto sviluppato e un apparato di Golgi adatto a produrne grandi quantità di collagene di tipo I e di proteine leganti il calcio (per esempio, osteocalcina e osteopontina). Una volta che la matrice è depositata, gli osteoblasti esprimono la fosfatasi alcalina ad alti livelli, il che porta alla mineralizzazione della matrice; di conseguenza, il collagene di tipo I e la fosfatasi alcalina sono indicatori della attività osteoblastica ¹⁰. La differenziazione degli osteoblasti da precursori mesenchimali e la loro maturazione sono strettamente regolate da fattori di trascr-

zione, come Runx2/Cbfa1 (fattore di trascrizione osso-specifica, necessario per la formazione ossea), e da diverse citochine e fattori di crescita come le BMP, i TGFs e i FGFs ¹¹.

OSTEOCITI

Sono le cellule più abbondanti nel tessuto osseo, rappresentano circa il 90% delle cellule ossee nello scheletro adulto, possono vivere fino a 50 anni e il loro numero diminuisce con l'età ¹². Gli osteociti sono osteoblasti completamente differenziati che si sono incorporati nella matrice ossea mineralizzata, ma è incerto se essi mantengono la capacità di sintetizzare matrice ossea. Gli osteoblasti differenziati possono anche diventare cellule di rivestimento, che sono piatte e proteggono l'osso dall'ambiente extracellulare. Gli osteociti maturi sono cellule a forma dendritica con lunghe protrusioni citoplasmatiche e giunzioni comunicanti ("gap junctions") fatti da emicanali di connexina 43, che consentono l'interconnessione tra osteociti adiacenti e con le celle della superficie ossea (i.e., osteoblasti, osteoclasti e cellule di rivestimento) ¹³. Essi formano una rete cellulare di canalicoli o "sincitium" contenente il liquido extracellulare osseo, che agisce come il mezzo attraverso il quale i segnali raggiungono tutte le cellule ossee ¹⁴. Gli osteociti sono i "direttori di orchestra" del modellamento e del rimodellamento dell'osso in quanto agiscono come meccanocettori nel rilevare i carichi meccanici e i microdanni e nell'avviare una risposta appropriata a tali fenomeni ¹⁵. Gli osteociti esprimono sia fattori promotori della mineralizzazione (i.e. Dmp1 e Phex) che fattori inibitori della mineralizzazione e della formazione ossea (i.e. sost/sclerostina e MEPE/OF45), per mantenere l'equilibrio e preservare la massa ossea. Inoltre, gli osteociti sembrano svolgere un importante ruolo nella regolazione degli osteoclasti, inibendo sia il riassorbimento che l'attivazione osteoclastica. È stato dimostrato che dopo un carico meccanico, gli osteociti inviano segnali inibenti l'attivazione osteoclastica ¹⁶. Il carico meccanico comprime il liquido extracellulare provocando flussi che attivano vie di segnale a valle, come la MAPK, segnali di calcio e di ossido nitrico ¹⁷. Infatti, il carico meccanico è fondamentale per la definizione della forma e della salute ossea come dimostrato dalla perdita veloce di massa ossea che si verifica negli astronauti e nei pazienti immobilizzati ¹⁵. Viceversa, gli osteociti danneggiati, apoptotici o morti, soprattutto se senza carica,

sembrano inviare segnali non identificati verso i preosteoclasti e gli osteoclasti sulla superficie ossea, capaci di avviare il riassorbimento osseo. Pertanto, gli osteociti regolano la formazione e la mineralizzazione ossea e inibiscono il riassorbimento osteoclastico, mentre hanno anche la capacità di trasmettere dei segnali di attivazione osteoclastica in determinate condizioni. Due studi indipendenti hanno recentemente indicato gli osteociti, e non gli osteoblasti e preosteoblasti, come i maggiori produttori di RANK-L ^{18 19}. Questa importante scoperta, cioè che gli osteociti possano essere i principali responsabili della osteoclastogenesi, attribuisce a queste cellule una capacità unica di modulare, momento per momento, il rimodellamento osseo. Pertanto gli osteociti sarebbero in grado di controllare sia il numero delle BMU tramite RANK-L, che l'equilibrio tra riassorbimento e formazione all'interno di tali unità per mezzo della sclerostina. Una maggiore comprensione dei segnali e dei meccanismi che controllano la produzione di RANK-L e di sclerostina negli osteociti apre interessanti prospettive di ricerca.

LA VIA DI SEGNALE OPG/RANK/RANK-L

La scoperta della via di segnale comprendente queste tre proteine ha svelato importanti nozioni sulla regolazione cellulare del rimodellamento e della formazione ossea. L'OPG è stata la prima delle tre proteine ad essere individuata nel 1997 da diversi gruppi di ricerca ^{4 20 21}. I topi knock-out per OPG sviluppano una osteoporosi severa, mentre i topi che sovraesprimono OPG mostrano una osteopetrosi. L'OPG è un membro della famiglia dei recettori del TNF (tumor necrosis factor), ma è atipico, in quanto è una proteina messa in circolazione senza dominio transmembrana. Essa contiene quattro domini omologhi per l'accoppiamento con il suo obiettivo, ovvero il RANK-L. L'OPG è prodotta da diverse cellule, tra cui gli osteoblasti, le cellule endoteliali, le cellule di muscolo vascolare liscio, le cellule linfoidi e altri tipi di cellule. Il RANK-L è un altro membro della famiglia del TNF, prodotto dagli osteoblasti e dalle cellule T attivate ed è stato scoperto durante la ricerca di un ligando per l'OPG. I topi knock-out per RANK-L, sviluppano osteopetrosi e alterata eruzione dei denti a causa di una carenza di osteoclasti maturi ²². Il M-CSF e il RANK-L hanno attività complementari: il M-CSF aumenta la riserva di precursori degli osteoclasti, mentre il RANK-L si lega al suo recettore RANK, espresso sui precursori degli

osteoclasti e sugli osteoclasti maturi, aumenta la differenziazione degli osteoclasti, promuove la loro attivazione e inibisce la loro apoptosi⁷. RANK, ovvero il recettore di RANK-L, come la OPG, è un recettore della famiglia del TNF. I topi knock-out per RANK hanno un fenotipo simile ai topi knock-out per RANK-L, cioè, presentano osteopetrosi, alterata eruzione dentale e una mancanza di linfonodi²³.

Il rimodellamento osseo si avvia dopo che il RANK-Ligando si lega al suo recettore RANK al fine di indurre la differenziazione, attivazione e sopravvivenza degli osteoclasti; viceversa, la OPG agisce come un "falso recettore" per il RANK-L e inibisce l'attivazione degli osteoclasti e il riassorbimento²⁴. L'equilibrio tra RANK-L, RANK e OPG è quindi essenziale per modulare la osteoclastogenesi e il rimodellamento osseo, e sono molteplici i fattori coinvolti nella regolazione di questo equilibrio (Fig. 1).

REGOLAZIONE DELLA VIA DI SEGNALE OPG / RANK / RANK-L

Diversi fattori (citochine, ormoni, fattori di crescita) interagiscono con questa via di segnale. Numerose citochine partecipano nella regolazione della via OPG / RANK / RANK-L promuovendo o inibendo il riassorbimento osseo. L'IL-1 è una citochina pro-riassorbitiva che aumenta RANK e RANK-L con risultati contrastanti sulla OPG. L'IL-7, l'IL-17, e il TNF- α aumentano il RANK-L e sono pertanto considerati agenti pro-riassorbitivi, mentre IL-4, IL-13, e l'interferone- γ sono considerati agenti anti-riassorbitivi sopprimendo la osteoclastogenesi²⁵.

Tra gli ormoni, gli estrogeni hanno un ruolo fondamentale nella regolazione del rimodellamento osseo e la loro azione di stimolazione della secrezione di OPG è confermata da diversi studi^{26,27}, così come la downregulation della espressione di RANK-L²⁸. Gli studi che valutano *in vitro* l'azione degli androgeni sulla OPG sono meno chiari e mostrano risultati contraddittori, ad esempio una sovraespressione in osteoblasti murini²⁹ e una ridotta espressione in osteoblasti umani³⁰. In entrambi questi studi, il RANK-L non era influenzato dagli androgeni anche se un recente studio ha dimostrato un aumento della espressione di RANK-L in topi orchiettomizzati che tornava alla normalità dopo terapia con testosterone³¹.

Per quanto riguarda l'ormone paratiroideo (PTH), è stata dimostrata una ridotta espressione della OPG e un aumento del RANK-L dopo somministrazione di PTH, sia intermittente che

continua, in cellule del midollo osseo e in osteoblasti murini³². Tuttavia, risultati contrastanti sono stati riscontrati in tessuto osseo umano *in vivo* in donne sottoposte a intervento chirurgico per neoplasia della mammella, dove non è stato dimostrato alcun cambiamento della espressione di OPG o di RANK-L. In ogni caso, i livelli più elevati di PTH erano correlati a bassi livelli sia di OPG che di RANK-L mRNA³³. Un altro studio che includeva donne di ogni età ha anch'esso dimostrato che la OPG sierica era negativamente correlata al PTH³⁴.

Tra i fattori di crescita, l'IGF-1 è noto come regolatore importante del turnover osseo che diminuisce con l'età³⁵. Uno studio ha dimostrato una correlazione negativa tra IGF-1 e OPG, e positiva con il RANK-L³⁶. I limiti principali di questo studio (come in altri studi sulla via di segnale OPG / RANK / RANK-L) sono stati l'uso dei livelli sierici che non rispecchiano esattamente i livelli di RANK-L nel microambiente osseo e che sono molto difficili da definire dato che le metodiche analitiche hanno una sensibilità limitata. Un altro studio effettuato su topi ha dimostrato che l'IGF-1 è in grado di stimolare la espressione di RANK-L e di M-CSF negli animali giovani, ma sembra che questo effetto si perda con l'invecchiamento³⁵. Un altro fattore di crescita studiato è il fattore derivato dal pigmento epiteliale (PEDF), un potente inibitore della angiogenesi la cui espressione nel tessuto osseo è stata dimostrata, così come la sua azione positiva sulla differenziazione degli osteoblasti. Il PEDF sembra stimolare l'espressione di OPG in osteoblasti e in preosteoclasti, e sopprimere l'espressione di RANK-L e, di conseguenza, la differenziazione osteoclastica³⁷.

L'INVECCHIAMENTO E LA VIA DI SEGNALE OPG / RANK / RANK-L

Alcuni studi in topi invecchiati hanno mostrato che con l'età i livelli di RANK-L mRNA aumentano mentre quelli di OPG mRNA diminuiscono^{38,39}. Nell'uomo, gli studi riportano consistentemente un aumento dell'OPG con l'età in entrambi i sessi^{34,40,41}. Tale aumento è stato osservato sia in soggetti sani che in pazienti con artrite reumatoide, morbo di Paget osseo e osteoporosi²⁵. Diversamente, ci sono risultati fortemente contrastanti per quanto riguarda il RANK-L durante l'invecchiamento nell'uomo.

Alcuni studi *in vitro* in osteoblasti umani hanno indicato che gli estrogeni inducono la produzione di OPG^{27,42}. Viceversa, studi condotti in don-

ne in postmenopausa hanno trovato che i livelli di OPG aumentano dopo la menopausa²⁵ e si riducono con la terapia ormonale sostitutiva⁴³. Gli studi sul rapporto tra l'OPG e i markers di riassorbimento osseo durante la menopausa sono anche essi contraddittori, con lavori che mostrano una lieve correlazione negativa tra questi parametri⁴⁴ e altri studi che riportano una relazione positiva^{45,46}, trovata anche negli uomini⁴⁶. Gli studi sul rapporto tra i livelli di OPG, la BMD e le fratture vertebrali sono anch'essi discrepanti. In alcuni studi, non è stata trovata alcuna associazione tra BMD e OPG dopo correzione per età e BMI^{34,44}, mentre altri lavori mostrano una correlazione inversa tra OPG e BMD^{47,48}. La relazione tra OPG e fratture è ugualmente incongrua. Infatti, sia livelli bassi⁴⁹ che alti⁵⁰ di OPG sono stati associati con le fratture vertebrali.

Gli studi sul RANK-L nelle donne in postmenopausa hanno risultati ancora più contrastanti perché il metodo di misurazione dei livelli sierici di RANK-L è meno sensibile di quello utilizzato per l'OPG. In relazione ai livelli di RANK-L nelle donne in postmenopausa, sono stati descritti incrementi²⁸, riduzioni⁴⁰ o nessun effetto³³. Alcuni lavori non hanno trovato alcuna associazione tra RANK-L e BMD^{45,51} mentre altri trovano una correlazione inversa^{48,52}.

Negli uomini la situazione è simile, cioè, è stato rilevato un consistente aumento dei livelli di OPG con l'età^{34,46-48}, invece la relazione tra gli ormoni sessuali e l'OPG è controversa, con studi che mostrano una correlazione positiva tra testosterone libero e OPG³⁴ e altri studi che mostrano una correlazione negativa⁴⁶ e riduzione della OPG dopo terapia sostitutiva con testosterone in uomini ipogonadici²⁶. Per quanto riguarda la relazione tra i livelli di OPG e la BMD vertebrale negli uomini, sono state riportate sia correlazioni positive⁵³ che negative^{46,47}, o anche nessuna correlazione⁴⁸. Il rapporto tra OPG e markers di rimodellamento osseo è ugualmente poco chiara, con studi che riportano una correlazione positiva tra OPG e osteocalcina e negativa con i markers di riassorbimento osseo⁵⁴ e studi che mostrano un'associazione negativa tra OPG e osteocalcina⁴⁷ e positiva tra OPG e markers di riassorbimento osseo⁴⁶. Uno studio ha mostrato che il RANK-L sierico era negativamente correlato con l'età, mentre l'mRNA nel microambiente osseo era positivamente correlato all'età e ai markers di rimodellamento osseo⁵⁵. In un ampio studio recente, non è stata trovata alcuna correlazione tra il RANK-L e l'età, e neanche

con la BMD o la perdita di BMD dopo 6 anni di follow-up⁴⁸. Viceversa, nello studio "Rancho Bernardo" è stata riportata una correlazione negativa tra RANK-L e BMD negli uomini⁵³.

In definitiva, molti studi sulla OPG e il RANK-L nell'uomo riportano risultati contraddittori. Questa non omogeneità può derivare anche dal fatto che le metodiche utilizzate per quantificare il RANK-L sierico non sono molto sensibili, tanto che in un recente studio soltanto il 63% dei pazienti aveva il RANK-L rilevabile⁴⁸. Altra problematica è legata al fatto che solo pochi studi hanno esaminato l'espressione di OPG e RANK-L nell'osso. Entrambe sono molecole attive a livello locale e le concentrazioni sieriche possono non riflettere la situazione locale ossea reale. Infine, anche per le difficoltà sopra menzionate, non sono stati stabiliti valori sierici di riferimento per OPG e RANK-L.

DENOSUMAB

Denosumab è un anticorpo monoclonale completamente umano di tipo IgG₂ con un'affinità molto elevata e specifica per il RANK-L. Legandosi a RANK-L, come avviene in condizioni fisiologiche con la OPG, denosumab inibisce la maturazione, l'attivazione e la sopravvivenza degli osteoclasti (Fig. 2). L'effetto del denosumab quale primo inibitore del RANK-L crea una nuova categoria di agenti antiassorbitivi. In confronto con i bisfosfonati, questo anticorpo viaggia nel torrente circolatorio senza accumularsi a livello osseo ed ha un effetto rapidamente reversibile. Inoltre, non essendo eliminato per via renale può rappresentare un vantaggio nei pazienti nefropatici, nei quali i bisfosfonati sono controindicati.

Negli studi preclinici, denosumab non sopprimeva il riassorbimento osseo in topi normali a causa della sua specificità per il RANK-L umano. Invece in topi knock-in chimerici (con espressione di RANK-L umano/murino), denosumab ha provocato una significativa riduzione del riassorbimento osseo associata ad un aumento della massa ossea sia corticale che trabecolare⁵⁶. In uno studio di fase I, una singola iniezione sottocutanea di denosumab in donne sane in postmenopausa ha provocato una rapida, intensa e prolungata riduzione dei markers di riassorbimento osseo in confronto con il placebo⁵⁷. Uno studio di fase II sugli effetti di denosumab a diversi dosaggi per un periodo di 12 mesi vs. placebo e vs. alendronato in donne in postmenopausa con bassa BMD ha dimostrato un au-

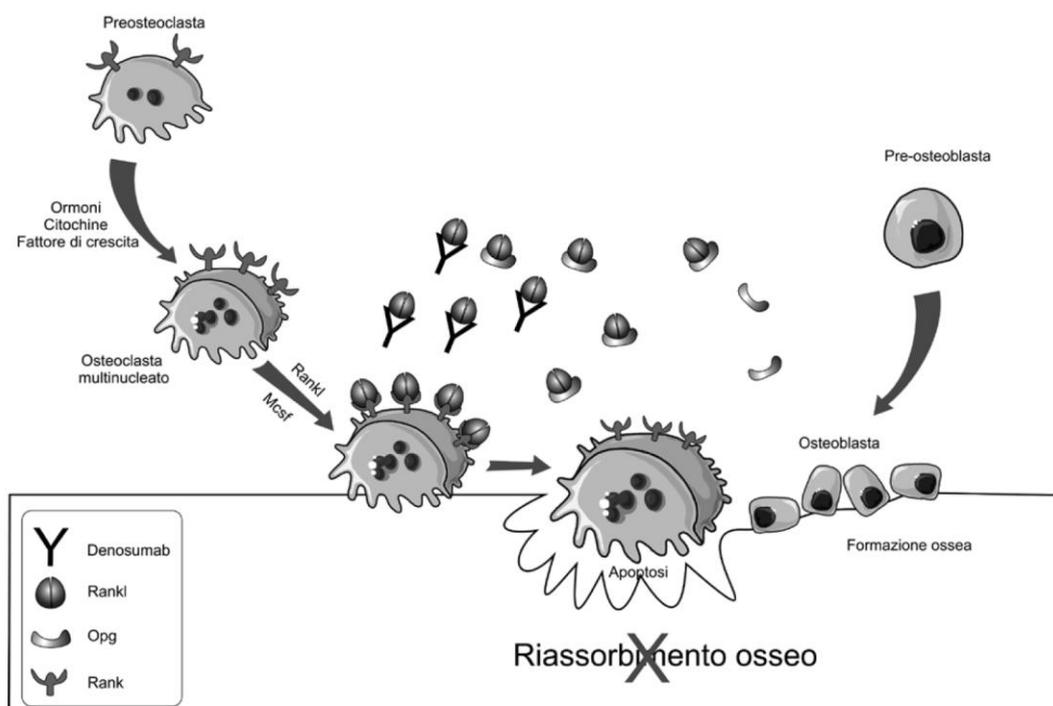


Fig. 2. Meccanismo di azione del denosumab, anticorpo specifico contro RANK-L che inibisce il legame tra RANK-L e RANK portando ad una ridotta differenziazione degli osteoclasti, alla loro inattivazione e all'apoptosi degli osteoclasti maturi.

mento della BMD vertebrale, femorale e del terzo distale del radio. I risultati sulla BMD erano superiori al placebo e pari o superiori a quelli dell'alendronato settimanali. Ancora una volta, una rapida diminuzione dei markers di riassorbimento osseo è stata osservata dopo l'iniezione di denosumab⁵⁸. In uno studio di estensione, questi risultati sono stati confermati dopo terapia per 24 mesi⁵⁹. Negli studi di fase I e II, la dose di 60 mg s.c. ogni 6 mesi sembrava essere la dose più efficace ed è stata quindi valutata in studi di fase III. Un primo trial randomizzato e controllato vs. placebo (n = 332) con somministrazione di denosumab per oltre 2 anni in donne osteopeniche in postmenopausa ha mostrato un significativo aumento della densità minerale ossea in tutti i distretti esaminati. In modo parallelo, i markers del turnover osseo (C-telopeptide [CTX1], fosfatasi acida tartrato-resistente [TRAP], e propeptide N-terminale del procollagene di tipo 1 [P1NP]) sono stati significativamente soppressi⁶⁰. Un successivo ampio studio di fase III (*Fracture REDuction Evaluation of Denosumab*

in Osteoporosis every 6 Months = FREEDOM), è stato condotto in una popolazione di 7868 donne in postmenopausa affette da osteoporosi, che hanno ricevuto 60 mg di denosumab ogni 6 mesi (n = 3933) o un placebo (n = 3935) per un periodo di 36 mesi (3 anni). Lo studio pubblicato su NEJM ha dimostrato la efficacia della terapia con denosumab nel ridurre significativamente le nuove fratture vertebrali (-68%), femorali (-40%), e non vertebrali (-20%)⁶¹. Tutti i partecipanti che hanno completato lo studio FREEDOM (sia quelli che avevano fatto terapia che quelli che avevano fatto il placebo) sono poi stati invitati a far parte di uno studio di estensione per continuare a valutare la efficacia e la sicurezza della terapia con denosumab fino a dopo 10 anni di terapia. Al momento sono stati pubblicati i risultati della estensione dopo ulteriori 2 anni di terapia con denosumab (gruppo di terapia a lungo termine, 5 anni) e quelli del braccio che aveva fatto placebo per tre anni nello studio iniziale e che hanno iniziato successivamente, la terapia con denosumab per 2 anni

(gruppo cross-over). Un totale di 4550 donne sono state arruolate nello studio di estensione (2343 in terapia a lungo termine e 2207 nel gruppo cross-over). I markers di rimodellamento osseo si sono mantenuti bassi nel gruppo di terapia a lungo termine e si sono rapidamente ridotti nel gruppo crossover. Nel gruppo che ha completato 5 anni di terapia la BMD è aumentata ulteriormente con guadagno totale di 13,7% a livello vertebrale e 7,0% a livello femorale. Nel gruppo cross-over, la BMD è aumentata di 7,7% a livello vertebrale e di 4,0% a livello femorale dopo i 2 anni di terapia con denosumab. La incidenza annuale di fratture in entrambi i gruppi era inferiore all'incidenza osservata nel gruppo placebo originale del FREEDOM, e inferiore anche al modello statistico prospettico di una coorte "virtuale non trattata"⁶². Anche i nuovi risultati preliminari dell'estensione del FREEDOM nei pazienti che hanno completato 6 anni continuativi di terapia con denosumab hanno mostrato una riduzione sostenuta dei markers di rimodellamento associata ad un aumento continuo della BMD. L'incidenza di fratture è rimasta bassa nel gruppo trattato a lungo termine⁶³. Sono stati recentemente pubblicati anche i risultati dell'estensione del precedente studio di fase II sopra menzionato⁵⁸. Essi mostrano come la terapia continuativa con denosumab per 8 anni è stata associata ad incrementi continui della BMD ed a persistenti riduzioni dei markers di rimodellamento osseo⁶⁴, a ulteriore conferma della efficacia a lungo termine della terapia.

Di particolare interesse in ambito geriatrico sono i risultati delle analisi del sottogruppo di pazienti con più alto rischio di fratture arruolate nello studio FREEDOM, cioè, quelle con fratture vertebrali multiple o severe, di età superiore a 75 anni e/o con una BMD femorale inferiore a -2,5 DS. In queste pazienti, la terapia con denosumab per 3 anni ha ridotto la incidenza di nuove fratture vertebrali e femorali, confermando l'efficacia di tale terapia in pazienti con diversi gradi di rischio fratturativo. Il rischio di fratture femorali è stato ridotto fino a valori simili a quelli della popolazione a basso rischio, nella quale le fratture femorali erano rare. La riduzione significativa del rischio di frattura femorale si è verificato già nel primo anno di terapia, risultato mai ottenuto con altra terapia antirassorbitiva, e consistente con lo spiccato e rapido aumento della BMD (già dal primo mese) documentata con la terapia con denosumab⁶⁵. A supporto e conferma di questi incoraggianti

risultati, un sottostudio dello studio FREEDOM ha mostrato un aumento significativo della BMD volumetrica usando QCT a livello vertebrale e femorale. Nella regione femorale l'aumento era prominente nell'osso corticale, risultato che può spiegare la riduzione significativa delle fratture femorali e delle fratture non vertebrali nelle pazienti trattate con denosumab⁶⁶.

Un recente studio ha investigato l'efficacia e sicurezza di denosumab 60 mg s.c. ogni 6 mesi vs. placebo in un gruppo di uomini con bassa BMD. Anche se la numerosità dei partecipanti a questo studio era molto inferiore (120 uomini nel gruppo trattato e 120 nel gruppo placebo) ai trials effettuati nelle donne, un primo report a 12 mesi ha mostrato una buona tollerabilità, una riduzione dei markers di rimodellamento osseo e un incremento della BMD significativo a livello vertebrale e femorale⁶⁷.

Per quanto riguarda la sicurezza e la tollerabilità, gli studi di fase I e II hanno mostrato complessivamente una frequenza simile degli eventi avversi per denosumab vs. placebo e vs. alendronato. Tuttavia, un lieve e transitorio aumento non dose-dipendente e asintomatico del PTH sierico associato con una diminuzione del calcio sierico è stato osservato sotto terapia con denosumab⁶⁸, per cui è consigliabile controllare la calcemia prima di iniziare la terapia e, se necessario, associare una adeguata supplementazione di calcio e vitamina D. Negli studi di fase III, il profilo di sicurezza osservato non ha rilevato differenze significative tra il placebo e denosumab⁶¹. Gli eventi avversi osservati durante i 3 anni di estensione sono stati simili a quelli riportati per il gruppo originale di placebo e terapia con denosumab del FREEDOM. Solo in due casi del gruppo cross-over si è verificata osteonecrosi della mandibola, e due nel gruppo long-term. Entrambi i casi del gruppo cross-over sono guariti completamente e senza ulteriori complicazioni; uno di questi soggetti continua ad assumere denosumab.

Un caso di frattura atipica è stato segnalato nel gruppo cross-over alla fine dell'anno 6 e un altro nel gruppo long-term durante l'anno 7. L'incidenza di neoplasie e di infezioni (i.e. cellulite, erisipela) è stata bassa senza tendenza ad aumentare nel tempo; si è verificato un solo caso di una infezione cutanea severa nel gruppo cross-over⁶². Anche nello studio di estensione a 8 anni (studio di fase II), la terapia con denosumab ha dimostrato una buona tollerabilità con un profilo di eventi avversi simile a quello

riportato in studi precedenti di più breve durata e anche consistente con l'invecchiamento della popolazione in esame durante gli 8 anni di follow-up⁶⁴.

L'analisi dei dati dello studio FREEDOM (donne tra 60 e 90 anni di età) ha dimostrato come la terapia con denosumab non influisce sulla riparazione della frattura o su altre complicanze post-frattura anche quando la terapia viene iniziata entro un giorno dall'evento fratturativo⁶⁹.

Un problema rilevante nella terapia delle malattie croniche, tra cui l'osteoporosi, è quello relativo alla aderenza terapeutica. I risultati di uno studio randomizzato, cross-over, con follow-up di due anni, in donne con osteoporosi postmenopausale, hanno mostrato che l'aderenza e la persistenza della terapia con denosumab, tramite iniezione s.c. ogni 6 mesi, era significativamente maggiore in confronto con la terapia orale con alendronato settimanale⁷⁰.

Per quanto riguarda il confronto con altre terapie, nello studio di fase II i markers di rimodellamento osseo sono diminuiti più rapidamente e in maniera più pronunciata dopo terapia con denosumab rispetto all'alendronato⁵⁸. Inoltre, una volta sospesa la terapia, gli effetti sul rimodellamento osseo sembrano essere completamente reversibili⁷¹. In confronto con alendronato e placebo, denosumab ha dimostrato di essere il trattamento più efficace nel migliorare le proprietà meccaniche del collo femorale⁷². Uno studio di non-inferiorità è stato condotto confrontando testa a testa denosumab e alendronato in 1189 donne in postmenopausa con un T-score uguale o inferiore a -2.0 DS⁷³. Essi hanno ricevuto 60 mg in iniezione s.c. di denosumab ogni 6 mesi vs. placebo per via orale settimanale oppure alendronato 70 mg per via orale settimanale vs. placebo per via s.c. ogni 6 mesi. I risultati hanno mostrato un aumento significativamente maggiore della BMD nel gruppo in trattamento con denosumab in confronto con l'alendronato. L'aumento della BMD a livello femorale totale nel gruppo trattato con denosumab è stata del 3,5% a 12 mesi rispetto a 2,6% nel gruppo trattato con alendronato. Anche negli altri siti scheletrici esaminati è stato dimostrato un aumento significativo della BMD con la terapia di denosumab. I markers del turnover osseo CTX1 e P1NP sono risultati significativamente diminuiti nel gruppo denosumab vs. alendronato, con una riduzione massima del P1NP a 3 mesi nel gruppo in terapia con denosumab rispetto ad una diminuzione massima a

9 mesi nel gruppo trattato con alendronato. Tuttavia, la riduzione mediana del CTX1 era simile per entrambi i gruppi di trattamento a 12 mesi di terapia⁷³. Analogamente, dati preliminari hanno mostrato come la terapia con denosumab 60 mg s.c. ogni 6 mesi è risultata associata ad un aumento maggiore della BMD a livello femorale (collo e totale) e vertebrale in confronto con ibandronato 150 mg/mese p.o.⁷⁴ e in confronto con risedronato 150 mg/mese p.o.⁷⁵ così come ad una riduzione più intensa dei markers di rimodellamento osseo.

Inoltre, a differenza della combinazione di teriparatide con bisfosfonati, la combinazione di teriparatide con denosumab ha mostrato di essere associata a un aumento della BMD a livello femorale e vertebrale maggiore rispetto alla somministrazione di questi farmaci da soli⁷⁶. Quest'ultima combinazione somministrata contemporaneamente ha mostrato gli incrementi maggiori di BMD femorale mai dimostrati per altra terapia alternativa il che la rende un'opzione da considerare nei pazienti anziani ad alto rischio di frattura femorale.

Altri risultati in casi clinici mirati sono stati riportati con l'uso di denosumab. In un paziente di 86 anni con malattia di Paget nel quale i bisfosfonati erano controindicati dovuto alla presenza di una insufficienza renale severa (clearance della creatinina di 11 mL/min) la terapia con denosumab è risultata efficace⁷⁷. In 4 paziente con una forma di osteogenesi imperfetta poco responsiva ai bisfosfonati (tipo OI-IV) e con iperattivazione della via RANK/RANK-L, la terapia con denosumab è stata ben tollerata ed è risultata in una riduzione significativa dei markers di rimodellamento osseo. Di conseguenza, il denosumab potrebbe essere una nuova opzione terapeutica anche in questo tipo di pazienti⁷⁸.

Conclusioni

Il rimodellamento osseo è un determinante fondamentale della massa ossea e della salute dell'osso, che dipende in gran parte dall'equilibrio tra OPG e RANK-L. La via di segnale OPG / RANK / RANK-L ha un ruolo fondamentale nella modulazione del turnover osseo ed interessa numerosi fattori che interagiscono tra di loro. Gli effetti catabolici del RANK-L sono bloccati dall'OPG, che impedisce la sua attivazione e pertanto limita la differenziazione, l'attività e la sopravvivenza degli osteoclasti. Gli studi clinici

con denosumab, anticorpo umano anti-RANK-L, hanno dimostrato la sua capacità di incrementare la massa ossea attraverso una rapida, marcata e reversibile soppressione dei processi di riassorbimento osteoclastico e di diminuire il

rischio di fratture da fragilità con un rapporto rischio/beneficio favorevole. Nel paziente anziano, nel quale le fratture sono una rilevante causa di mortalità, morbilità e disabilità, il denosumab rappresenta una innovativa opzione terapeutica.

L'osso corticale e trabecolare subiscono un continuo e bilanciato processo di rimodellamento, che consiste di una fase di riassorbimento mediata dagli osteoclasti e di una fase di neoformazione mediata dagli osteoblasti. L'attività degli osteoclasti e degli osteoblasti è regolata dagli osteociti che sono le cellule più abbondanti nello scheletro. Uno squilibrio di questo processo con una eccessiva attività di riassorbimento, comporta una perdita di massa ossea e un deterioramento della microarchitettura scheletrica, con conseguente riduzione della resistenza ossea e aumento del rischio di frattura. Il ligando del "Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B" (RANK-L), una proteina espressa dagli osteoblasti, gioca un ruolo fondamentale nella formazione, attivazione e sopravvivenza degli osteoclasti, tramite l'interazione con il suo recettore RANK, espresso sulla superficie degli osteoclasti. La scoperta del ruolo del RANK-L nella patogenesi dell'osteoporosi ha portato a studiare gli effetti della sua inibizione come un nuovo e specifico approccio anti-riassorbitivo. In numerosi modelli preclinici di osteoporosi postmenopausale, l'inibizione del RANK-L ha prevenuto la perdita di massa ossea e le alterazioni della microarchitettura dell'osso ed è stata associata a un aumento della resistenza ossea a livello sia vertebrale che femorale. Nell'uomo, la somministrazione sottocutanea, ogni 6 mesi, di un anticorpo monoclonale interamente umano

diretto specificamente contro il RANK-L ha determinato, nel corso di studi clinici randomizzati e controllati, significativi e continui incrementi della densità minerale ossea (BMD) nel tempo a livello di tutti i siti scheletrici trabecolari e corticali esaminati (vertebre lombari, collo del femore e radio distale) e rapide, marcate e prolungate riduzioni dei markers di rimodellamento osseo in donne con osteopenia o con osteoporosi postmenopausale. L'inibizione del RANK-L con questo anticorpo monoclonale ha dimostrato di ridurre in modo significativo il rischio di fratture vertebrali (-68%), non vertebrali (-20%) e di femore (-40%) nel corso di 3 anni di trattamento in donne con osteoporosi postmenopausale. La estensione di questi studi a cinque anni ha confermato gli effetti della terapia con denosumab sulla BMD, sulla inibizione del rimodellamento osseo e sul rischio fratturativo. La frequenza e la tipologia degli eventi avversi riportati è risultata simile a quella del placebo o del trattamento con bisfosfonati, indicando un buon profilo di tollerabilità. Questi dati suggeriscono che l'inibizione specifica del RANK-L rappresenta un ulteriore e innovativo approccio terapeutico per la riduzione del rischio di fratture da fragilità.

Parole chiave: Rimodellamento osseo • RANK • RANKL • Denosumab • Osteoblasta • Osteoclasta • Osteocita

BIBLIOGRAFIA

- 1 Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism (2008). 7th Edition. www.0 1 April 2011.
- 2 Seeman E, Delmas PD. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. N Engl J Med 2006;354:2250-61.
- 3 Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM. RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. Annu Rev Immunol 2002;20:795-823.
- 4 Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:3597-602.
- 5 Udagawa N. The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. J Bone Miner Metab 2003;21:337-43.
- 6 Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell 1998;93:165-76.
- 7 Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature 2003;423:337-42.
- 8 Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. Science 2000;289:1504-8.
- 9 Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? Am J Pathol 2007;170:427-35.
- 10 Murshed M, Harmey D, Millan JL, et al. Unique coexpression in osteoblasts of broadly expressed genes accounts for the spatial restriction of ECM mineralization to bone. Genes Dev 2005;19:1093-104.
- 11 Ducy P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. Science 2000;289:1501-4.
- 12 Manolagas SC, Parfitt AM. What old means to bone. Trends Endocrinol Metab 2010;21:369-74.
- 13 Knothe Tate ML, Adamson JR, Tami AE, et al. The osteocyte. Int J Biochem Cell Biol 2004;36:1-8.
- 14 Knothe Tate ML. "Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective. J Biomech 2003;36:1409-24.
- 15 Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. Ann NY Acad Sci 2007;1116:281-90.
- 16 Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone 2008;42:606-15.
- 17 Rubin J, Rubin C, Jacobs CR. Molecular pathways

- mediating mechanical signaling in bone. *Gene* 2006;367:1-16.
- ¹⁸ Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nat Med* 2011;17:1231-4.
- ¹⁹ Xiong J, Onal M, Jilka RL, et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med* 2011;17:1235-41.
- ²⁰ Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309-19.
- ²¹ Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, et al. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137-42.
- ²² Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, et al. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999;397:315-23.
- ²³ Dougall WC, Glaccumm, Charrier K, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 1999;13:2412-24.
- ²⁴ Liu C, Walter TS, Huang P, et al. Structural and functional insights of RANKL-RANK interaction and signaling. *J Immunol* 2010;184:6910-9.
- ²⁵ Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev* 2008;29:155-92.
- ²⁶ Khosla S, Atkinson EJ, Dunstan CR, et al. Effect of estrogen versus testosterone on circulating osteoprotegerin and other cytokine levels in normal elderly men. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:1550-4.
- ²⁷ Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone* 2003;32:136-41.
- ²⁸ Eghbali-Fatourehchi G, Khosla S, Sanyal A, et al. Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. *J Clin Invest* 2003;111:1221-30.
- ²⁹ Chen Q, Kaji H, Kanatani M, et al. Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells. *Horm Metab Res* 2004;36:674-8.
- ³⁰ Hofbauer LC, Hicok KC, Chen D, et al. Regulation of osteoprotegerin production by androgens and anti-androgens in human osteoblastic lineage cells. *Eur J Endocrinol* 2002;147:269-73.
- ³¹ Proell V, Xu H, Schuler C, et al. Orchiectomy upregulates free soluble RANKL in bone marrow of aged rats. *Bone* 2009;45:677-81.
- ³² Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology* 1999;140:3552-61.
- ³³ Seck T, Diel I, Bismar H, et al. Serum parathyroid hormone, but not menopausal status, is associated with the expression of osteoprotegerin and RANKL mRNA in human bone samples. *Eur J Endocrinol* 2001;145:199-205.
- ³⁴ Kudlacek S, Schneider B, Woloszczuk W, et al. Serum levels of osteoprotegerin increase with age in a healthy adult population. *Bone* 2003;32:681-6.
- ³⁵ Cao JJ, Kurimoto P, Boudignon B, et al. Aging impairs IGF-I receptor activation and induces skeletal resistance to IGF-I. *J Bone Miner Res* 2007;22:1271-9.
- ³⁶ Zhao HY, Liu JM, Ning G, et al. Relationships between insulin-like growth factor-I (IGF-I) and OPG, RANKL, bone mineral density in healthy Chinese women. *Osteoporos Int* 2008;19:221-6.
- ³⁷ Akiyama T, Dass CR, Shinoda Y, et al. PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:789-94.
- ³⁸ Cao JJ, Wronski TJ, Iwaniec U, et al. Aging increases stromal/osteoblastic cell-induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. *J Bone Miner Res* 2005;20:1659-68.
- ³⁹ Cao J, Venton L, Sakata T, et al. Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 mice. *J Bone Miner Res* 2003;18:270-7.
- ⁴⁰ Pulsatelli L, Dolzani P, Silvestri T, et al. Soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB Ligand (sRANKL)/osteoprotegerin balance in ageing and age-associated diseases. *Biogerontology* 2004;5:119-27.
- ⁴¹ Nabipour I, Larijani B, Vahdat K, et al. Relationships among serum receptor of nuclear factor-kappaB ligand, osteoprotegerin, high-sensitivity C-reactive protein, and bone mineral density in postmenopausal women: osteoimmunity versus osteoinflammatory. *Menopause* 2009;16:950-5.
- ⁴² Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* 2005;20:2224-32.
- ⁴³ Han KO, Choi JT, Choi HA, et al. The changes in circulating osteoprotegerin after hormone therapy in postmenopausal women and their relationship with oestrogen responsiveness on bone. *Clin Endocrinol* 2005;62:349-53.
- ⁴⁴ Rogers A, Saleh G, Hannon RA, et al. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4470-5.
- ⁴⁵ Mezquita-Raya P, De la Higuera M, Garcia DF, et al. The contribution of serum osteoprotegerin to bone mass and vertebral fractures in postmenopausal women. *Osteoporos Int* 2005;16:1368-74.
- ⁴⁶ Khosla S, Arrighi HM, Melton LJ, 3rd, et al. Correlates of osteoprotegerin levels in women and men. *Osteoporos Int* 2002;13:394-9.
- ⁴⁷ Oh KW, Rhee EJ, Lee WY, et al. Circulating osteoprotegerin and receptor activator of NF-kappaB ligand system are associated with bone metabolism in middle-aged males. *Clin Endocrinol* 2005;62:92-8.
- ⁴⁸ Jorgensen L, Vik A, Emaus N, et al. Bone loss in relation to serum levels of osteoprotegerin and nuclear factor-kappaB ligand: the Tromso Study. *Osteoporos Int* 2010;21:931-8.
- ⁴⁹ Chiba Y, Onouchi T, Ikeda T, et al. Implications of measuring soluble receptor activators of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone metabolism of elderly women. *Gerontology* 2009;55:275-80.

- ⁵⁰ Jorgensen HL, Kusk P, Madsen B, et al. *Serum osteoprotegerin (OPG) and the A163G polymorphism in the OPG promoter region are related to peripheral measures of bone mass and fracture odds ratios.* J Bone Miner Metab 2004;22:132-8.
- ⁵¹ Liu JM, Zhao HY, Ning G, et al. *Relationships between the changes of serum levels of OPG and RANKL with age, menopause, bone biochemical markers and bone mineral density in Chinese women aged 20-75.* Calcif Tissue Int 2005;76:1-6.
- ⁵² Uemura H, Yasui T, Miyatani Y, et al. *Circulating profiles of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in post-menopausal women.* J Endocrinol Invest 2008;31:163-8.
- ⁵³ Stern A, Laughlin GA, Bergstrom J, et al. *The sex-specific association of serum osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand with bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo study.* Eur J Endocrinol 2007;156:555-62.
- ⁵⁴ Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. *Serum osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover.* Osteoporos Int 2005;16:417-23.
- ⁵⁵ Findlay D, Chehade M, Tsangari H, et al. *Circulating RANKL is inversely related to RANKL mRNA levels in bone in osteoarthritic males.* Arthritis Res Ther 2008;10:R2.
- ⁵⁶ Kostenuik PJ, Nguyen HQ, McCabe J, et al. *Denosumab, a fully human monoclonal antibody to RANKL, inhibits bone resorption and increases BMD in knock-in mice that express chimeric (murine/human) RANKL.* J Bone Miner Res 2009;24:182-95.
- ⁵⁷ Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, et al. *A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women.* J Bone Miner Res 2004;19:1059-66.
- ⁵⁸ McClung MR, Lewiecki EM, Cohen SB, et al. *Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density.* N Engl J Med 2006;354:821-31.
- ⁵⁹ Lewiecki EM, Miller PD, McClung MR, et al. *Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD.* J Bone Miner Res 2007;22:1832-41.
- ⁶⁰ Bone HG, Bolognese MA, Yuen CK, et al. *Effects of denosumab on bone mineral density and bone turnover in postmenopausal women.* J Clin Endocrinol Metab 2008;93:2149-57.
- ⁶¹ Cummings SR, San Martin J, McClung MR, et al. *Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis.* N Engl J Med 2009;361:756-65.
- ⁶² Papapoulos S, Chapurlat R, Libanati C, et al. *Five years of denosumab exposure in women with postmenopausal osteoporosis: results from the first two years of the FREEDOM extension.* J Bone Miner Res 2012;27:694-701.
- ⁶³ Brown JP, Bone HG, Chapurlat R, et al. *Six years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the first three years of the FREEDOM extension.* American College of Rheumatology 2011, abstract 18.
- ⁶⁴ McClung MR, Lewiecki EM, Geller ML, et al. *Effects of denosumab on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover: 8-year results of a phase 2 clinical trial.* Osteoporos Int 2013;24:227-35.
- ⁶⁵ Boonen S, Adachi JD, Man Z, et al. *New vertebral and hip fractures in postmenopausal women at high risk.* J Clin Endocrinol Metab 2011;96:1727-36.
- ⁶⁶ McClung MR, Zanchetta JR, Hoiseth A, et al. *Denosumab densitometric changes assessed by quantitative computed tomography at the spine and hip in postmenopausal women with osteoporosis.* J Clin Densitometry: Assessment of Skeletal Health 2012;May 8. [Epub ahead of print]
- ⁶⁷ Orwoll E, Teglbjærg CS, Langdahl BL, et al. *A randomized, placebo-controlled study of the effects of denosumab for the treatment of men with low bone mineral density.* J Clin Endocrinol Metab 2012;97:3161-9.
- ⁶⁸ Lewiecki EM. *Denosumab - an emerging treatment for postmenopausal osteoporosis.* Expert Opin Biol Ther 2010;10:467-76.
- ⁶⁹ Adami S, Libanati C, Boonen S, et al. *Denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis does not interfere with fracture-healing.* J Bone Joint Surg Am 2012;94:1-7.
- ⁷⁰ Freemantle N, Satram-Hoang S, Tang ET, et al. *Final results of the DAPS (Denosumab Adherence Preference Satisfaction) study: a 24-month, randomized, crossover comparison with alendronate in postmenopausal women.* Osteoporos Int 2011;23:317-26.
- ⁷¹ Geusens P. *Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis - focus on denosumab.* Clin Interv Aging 2009;4:241-50.
- ⁷² Beck TJ, Lewiecki EM, Miller PD, et al. *Effects of denosumab on the geometry of the proximal femur in postmenopausal women in comparison with alendronate.* J Clin Densitom 2008;11:351-9.
- ⁷³ Brown JP, Prince RL, Deal C, et al. *Comparison of the effect of denosumab and alendronate on bone mineral density and biochemical markers of bone turnover in postmenopausal women with low bone mass: a randomized, blinded, phase 3 trial.* J Bone Miner Res 2009;24:153-61.
- ⁷⁴ Recknor C, Czerwinski E, Bone H, et al. *A randomized open-label study to evaluate the safety and efficacy of denosumab and ibandronate in postmenopausal women sub-optimally treated with daily or weekly bisphosphonates.* J Bone Miner Res 2012;27(Suppl 1):S121.
- ⁷⁵ Roux C, Fahrleitner-Pammer A, Ho PR, et al. *Denosumab compared with risedronate in postmenopausal women suboptimally adherent with alendronate therapy: efficacy and safety results from a randomized open-label study.* J Bone Miner Res 2012;27(Suppl 1):S484.
- ⁷⁶ Leder B, Uihlein A, Neer R, et al. *The effects of combined denosumab and teriparatide administration on bone mineral density in postmenopausal women: the DATA (Denosumab And Teriparatide Administration) study.* J Bone Miner Res 2012;27(Suppl 1):S31.
- ⁷⁷ Schwarz P, Qvist Rasmussen A, Kvist TM, et al. *Paget's disease of the bone after treatment with denosumab: a case report.* Bone 2012;50:1023-5.
- ⁷⁸ Semler O, Netzer C, Hoyer-Kuhn H, et al. *First use of the RANKL antibody denosumab in Osteogenesis Imperfecta Type VI.* J Musculoskelet Neuronal Interact 2012;12:183-8.