

Anna Pietrzak¹, Sławomir Michalak^{2,3}, Wojciech Kozubski¹

Znaczenie kliniczne przeciwciał przeciw interferonowi beta u chorych na stwardnienie rozsiane

Clinical utility of anti-interferon-beta antibodies in patients with multiple sclerosis

¹ Katedra i Klinika Neurologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska

² Zakład Neurochemii i Neuropatologii, Katedra Neurologii, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu, Poznań, Polska

³ Zespół Kliniczno-Badawczy Chorób Neuroimmunologicznych, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN, Poznań, Polska

Adres do korespondencji: Anna Pietrzak, Oddział Kliniczny Neurologii z Pododdziałem Udarowym, Szpital Kliniczny im. H. Świąćckiego UM w Poznaniu, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań, tel.: +48 61 869 15 35, +48 503 166 127, e-mail: apiet@o2.pl

Streszczenie

Leczenie stwardnienia rozsianego interferonem beta wiąże się z ryzykiem rozwoju odpowiedzi immunologicznej przeciw temu białku. Polega ona na produkcji przeciwciał wiążących lub neutralizujących interferon beta. Przeciwciała wiążące są wykrywalne u większości leczonych i nie wpływają na skuteczność terapii. Jednocześnie duże badania kliniczne dostarczają dowodów na to, że przeciwciała neutralizujące zmniejszają, a w wysokich mianach znoszą działanie interferonu, co przekłada się na wzrost częstości rzutów oraz liczby nowych i wzmacniających się ognisk w badaniach rezonansu magnetycznego, a nawet przyspieszenie postępu niesprawności. Częstość występowania przeciwciał neutralizujących zależy od preparatu i drogi podania oraz dotyczy od 2 do 42% osób leczonych; maksimum osiąga między 6. a 24. miesiącem terapii. Przeciwciała neutralizujące mogą być obecne przejściowo (po ich zaniknięciu skuteczność interferonu powraca do poziomu wyjściowego), ale wysokie miano zapowiada ich wieloletnie utrzymywanie się, nawet po odstawieniu leku. Opracowano różne sposoby wykrywania przeciwciał neutralizujących – od metod wykorzystujących efekt cytopatyczny do tych opartych na indukcji genu reporterowego lucyferazy. Poszukuje się wiarygodnych markerów aktywności interferonu beta *in vivo*, które mogłyby uzupełniać oznaczenie przeciwciał. Przez wiele lat zagadnieniu przeciwciał przeciwinterferonowych towarzyszyły kontrowersje, które wynikały z trudności metodologicznych w badaniu ich znaczenia klinicznego. Obecnie, w świetle zgromadzonych danych, eksperci europejscy zgodnie zalecają powtarzane przesiewowe badanie miana przeciwciał neutralizujących u chorych leczonych interferonem i uwzględnienie wyników przy podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

Słowa kluczowe: interferon beta, przeciwciała neutralizujące, stwardnienie rozsiane

Abstract

Treatment of multiple sclerosis with interferon-beta involves the risk of the development of immunological response to this protein. The response consists in the production of antibodies that bind or neutralise interferon-beta. The binding antibodies are detectable in the majority of the treated patients and do not influence the efficacy of treatment. Simultaneously, large clinical studies provide evidence that the neutralising antibodies reduce and in high titres suppress the effect of interferon, which causes the frequency of exacerbations and the number of new and intensified outbreaks in magnetic resonance imaging to increase. What is more, it may even result in the accelerated progression of disability. The incidence of the neutralising antibodies depends on the preparation as well as the route of administration and concerns from 2 to 42% of the treated patients; it reaches its maximum between the 6th and the 24th month of treatment. The neutralising antibodies may be present temporarily (once they disappear, the efficacy of interferon returns to its initial level), yet a high titre predicts their long-term persistence, even after the drug has been discontinued. Various ways of detecting the neutralising antibodies have been devised – from methods that take advantage of a cytopathic effect to those based on the induction of a luciferase reporter gene. Reliable markers of the *in vivo* activity of interferon-beta that may complement marking of the antibodies are being sought. For many years, the issue of anti-interferon antibodies was accompanied by controversy that resulted from methodological difficulties in studying their clinical utility. At present, in view of the gathered data, European experts unanimously recommend a repeated screening examination of the neutralising antibody titre for patients treated with interferon and considering the results when making therapeutic decisions.

Key words: interferon-beta, neutralising antibodies, multiple sclerosis

WSTĘP

Od ponad 20 lat interferon beta (IFN β) pozostaje lekiem pierwszego wyboru w postaci rzutowo-remisyjnej stwardnienia rozsianego (*multiple sclerosis*, MS). Również od dwóch dekad wiadomo, że część chorych leczonych interferonem rozwija przeciwko niemu odpowiedź immunologiczną w postaci przeciwciał wiążących (*binding antibodies*, BAB) i neutralizujących (*neutralizing antibodies*, NAb). Istnieją dowody na to, iż przeciwciała neutralizujące mogą osłabiać efekty leczenia interferonem. W ostatnich latach pojawiło się wiele nowych opcji leczenia MS. Z tego powodu przeciwciała przeciw interferonowi – jako potencjalna zapowiedź niepowodzenia leczenia IFN β i hipotetyczna przesłanka do zmiany leku – budzą zainteresowanie.

W niniejszej pracy podsumowano stan wiedzy na temat przeciwciał przeciw IFN β , a następnie przedstawiono aktualne wytyczne dotyczące znaczenia przeciwciał antyinterferonowych w praktyce klinicznej.

PRZECIWCIAŁA PRZECIW IFN β

Pozajelitowe podanie obcego białka często powoduje immunizację i dramatyczne konsekwencje kliniczne, o czym wiadomo od pierwszych prób leczenia ludzi surowicami zwierzęcymi. W tych sytuacjach powstawanie przeciwciał przeciw lekowi jest spodziewaną reakcją na obcy epitop, ale przy wielokrotnej ekspozycji nawet białka identyczne z ludzkimi mogą powodować immunizację – skutek przełamania tolerancji na własny antygen.

Dostępne preparaty IFN β zawierają rekombinowany interferon. IFN β -1a, uzyskiwany w wyniku produkcji przez komórki jajowe chomika chińskiego, ma sekwencję aminokwasów identyczną z ludzką cząsteczką i podobną glikozylację. IFN β -1b to białko produkowane przez *Escherichia coli*, nieglikozylowane, różniące się dwoma aminokwasami od ludzkiego i wykazujące mniejszą aktywność biologiczną. Badania kliniczne zgodnie wykazują, że IFN β -1b jest bardziej immunogenny niż IFN β -1a. Jak się wydaje, większa immunogenność i mniejsza aktywność IFN β -1b wynika nie ze zmienionej sekwencji aminokwasów, ale z braku glikozylacji, który sprzyja tworzeniu agregatów. Liczba i skład agregatów zdają się korelować z immunogennością danego preparatu (Barnard *et al.*, 2013). Wyższa immunogenność IFN β -1b może też wynikać z większej ilości podawanego białka, uwarunkowanej niższą aktywnością biologiczną.

Przeciwciała przeciw IFN β wykazują aktywność krzyżową, więc te indukowane przez IFN β -1a wiążą również IFN β -1b i *vice versa* (Ross *et al.*, 2000).

Zaobserwowano związek między drogą podania a częstością immunizacji. W badaniach klinicznych preparaty podawane podskórnie wykazują większą immunogenność niż te podawane domięśniowo. Przedmiotem dyskusji pozostaje, czy zjawisko to jest uwarunkowane drogą podania, czy też rodzajem preparatu.

Korelacja między dawką leku a występowaniem NAb jest niejasna. W przypadku preparatu IFN β -1a podawanego podskórnie obserwowano, że większa dawka (44 μ g) stosowana trzy razy w tygodniu wywoływała immunizację rzadziej niż dawka 22 μ g [Francis *et al.*, 2005; Malucchi *et al.*, 2008; Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group, 2001]. Takiej zależności nie stwierdzono w przypadku IFN β -1b (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996). Z kolei w badaniach porównujących 30 i 60 μ g IFN β -1a podawanego domięśniowo wyższa dawka ponad dwukrotnie częściej wywoływała produkcję NAb (Clanet *et al.*, 2002). Większa częstość wstrzyknięć również indukuje częstsze występowanie przeciwciał (Ross *et al.*, 2000).

Kliniczny przebieg choroby nie wpływa na skłonność do immunizacji. Częstość występowania NAb w badaniach klinicznych nie zależała istotnie od wieku pacjentów, czasu trwania choroby przed włączeniem IFN β , wyniku w skali EDSS (Expanded Disability Status Scale – Rozszerzona skala niewydolności ruchowej Kurtzkiego), zmian w rezonansie magnetycznym, częstotliwości rzutów w ciągu 2 lat przed rozpoczęciem leczenia ani steroidoterapii przed leczeniem IFN β -1b (Francis *et al.*, 2005; The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996). W pojedynczych badaniach stwierdzono istotny statystycznie związek między wytwarzaniem NAb a starszym wiekiem w momencie rozpoznania MS (Rudick *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2012) i płcią żeńską (Kappos *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2012) (trend). W badaniu dotyczącym wtórnie postępującego MS (Polman *et al.*, 2003) pacjenci NAb-(+) byli starsi, mieli mniej rzutów w 2 latach poprzedzających badanie i chorowali od dłuższego czasu. Grupa ta cechowała się mniejszym udziałem kobiet. Warto zauważyć, że są to jednocześnie cechy powszechnie wiązane z gorszym rokowaniem w zakresie przebiegu choroby.

METODY OZNACZANIA PRZECIWCIAŁ PRZECIW IFN β

Podział przeciwciał przeciwinterferonowych wynika z metod ich wykrywania. Przeciwciała swoiste względem IFN β określa się mianem przeciwciał wiążących (BAB). Obecność i miano BAB można oznaczyć standardowymi metodami serologicznymi. Są to:

- test immunoenzymatyczny (*enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA) (ryc. 1);
- radioimmunoprecypitacja (*radioimmunoprecipitation assay*, RIPA);
- Western blot;
- chromatografia powinowactwa.

Wśród BAB wydziela się frakcję zdolną do hamowania aktywności interferonu *in vitro*, nazywaną przeciwciałami neutralizującymi (NAb). Odróżniają się one wiązaniem

z epitopami interferonu bezpośrednio oddziałującymi z jego receptorem. Ponieważ jednak masa cząsteczkowa IgG jest ponad siedmiokrotnie większa od masy IFN β , prawdopodobnie wszystkie BAb w pewnym stopniu zaburzają oddziaływanie IFN β na receptor, a od swoistości epitopowej i siły wiązania zależy, jak wyraźny jest to efekt. W związku z tym NAb są nie tyle jakościowo odmienną podgrupą BAb, ile raczej frakcją o aktywności antyinterferonowej wystarczająco wysokiej, by wykryły ją odczyn laboratoryjny.

Wykrywanie NAb opiera się na wykazywaniu ich zdolności do zahamowania działania IFN β w hodowli komórek *in vitro*. W odczynie efektu cytopatycznego (*cytopathic effect assay*, CPE) wykorzystuje się działanie przeciwwirusowe IFN β . Do wrażliwej na wirusa hodowli komórkowej dodawany jest IFN β , a następnie bada się surowicę i wirusa. Jeśli badana surowica zawiera NAb, komórki nie zostaną ochronione przez IFN β i wykażą zmiany cytopatyczne. W celu standaryzacji miano przeciwciał oblicza się według metody Kawade, a powszechnie używane progowe miano, przy którym wynik oznaczenia uznaje się za dodatni, wynosi 20 NU/ml (Grossberg *et al.*, 2001). Światowa Organizacja Zdrowia uznaje CPE za złoty standard wykrywania NAb. Jest to jednak test czaso- i pracochłonny.

W celu przyspieszenia i ujednoczenia pomiarów opracowano odczynny wykorzystujące oznaczanie białka MxA (*myxovirus resistance protein A*, MxA), produkowanego wyłącznie w odpowiedzi na IFN klasy I. Badanie zahamowania wydzielania mRNA MxA pod wpływem badanej surowicy charakteryzuje się największą czułością w wykrywaniu NAb (Bertolotto *et al.*, 2007).

Powstał również odczyn z komórkami transfekowanymi genem raportującym, jakim jest gen lucyferazy – umieszczony za promotorem indukowanym wcześniej i wybiórczo przez IFN β (Lam *et al.*, 2008) (ryc. 2). Lucyferaza to enzym, który podczas reakcji ze swoim substratem,

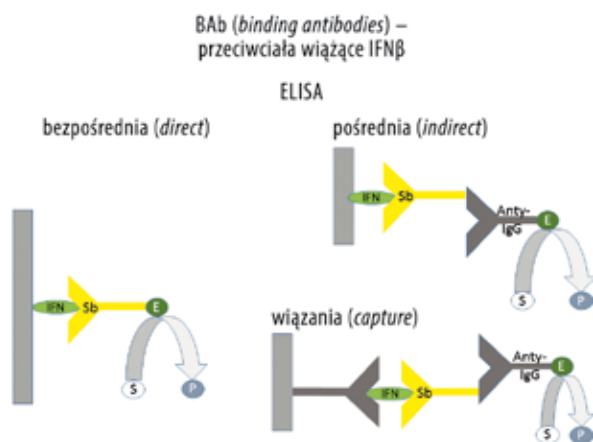
lucyferyną, wywołuje luminescencję. Do hodowli komórek dodaje się IFN β , badaną surowicę, a następnie lucyferynę, po czym mierzy się chemiluminescencję.

W Zakładzie Neurochemii i Neuropatologii Katedry Neurologii w Poznaniu wdrożono analizy BAb za pomocą własnej techniki ELISA oraz NAb z zastosowaniem testu wykorzystującego gen reporterowy lucyferazy (*luciferase reporter gene assay*) – *iLite™ antibeta*. W badaniach porównujących obie metody dla BAb uzyskano 50-procentową czułość i 87-procentową swoistość, a dla NAb – 80-procentową czułość i 81-procentową swoistość (Michalak, 2015) (ryc. 1, 2).

CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA PRZECIWCIAŁ PRZECIW IFN β I DYNAMIKA ICH MIANA

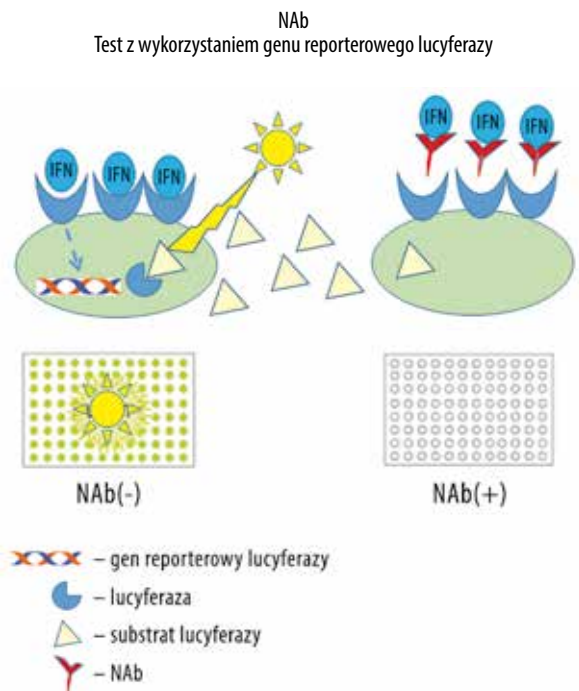
BAb wykrywa się u niespełna 0,1% zdrowych osób i podobnego odsetka chorych na MS nigdy nieleczonych IFN β , a ponadto nawet w 35% preparatów mieszanych ludzkich IgG (Ross *et al.*, 2000). Częstość i dynamika wytwarzania przeciwciał u chorych leczonych IFN β są odmiennie dla różnych preparatów IFN β -1a i IFN β -1b.

BAb pojawiają się wcześniej – często w ciągu pierwszych 3 miesięcy leczenia IFN β -1b. Po 12 miesiącach terapii IFN β -1b, IFN β -1a podskórnie i IFN β -1a domięśniowo BAb-pozytywnych jest odpowiednio 97%, 58% i 33% chorych (Ross *et al.*, 2000). BAb w wysokich mianach wydają się zapowiadać wystąpienie przeciwciał neutralizujących (Perini *et al.*, 2004). Z czasem miana BAb nierzadko obniżają się równoległe ze wzrostem aktywności NAb. Zjawisko to może odpowiadać „dojrzewaniu” powinowactwa (Ross *et al.*, 2000).



IFN – interferon; Sb – surowica badana; **anty-IgG** – przeciwciała przeciw ludzkim immunoglobulinom; E – enzym; S – substrat; P – produkt.

Ryc. 1. Metody ELISA służące do wykrywania BAb



Ryc. 2. Metoda wykrywania NAb z zastosowaniem reporterowego genu lucyferazy

Obecność NAb można stwierdzić już w 3. miesiącu leczenia, ale zazwyczaj wykrywa się je między 6. a 18. miesiącem (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996; Ross *et al.*, 2000; Sorensen *et al.*, 2005), przy czym podczas terapii IFN β -1b pojawiają się wcześniej (Ross *et al.*, 2000). Między 6. a 24. miesiącem leczenia odnotowuje się największą częstość występowania NAb (Rudick *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2012). Jeżeli w ciągu 24 miesięcy przyjmowania IFN β chory nie wytworzy NAb, zazwyczaj pozostaje Nab-ujemny (Sorensen *et al.*, 2005).

Dane dotyczące częstości występowania NAb są rozbieżne z powodu stosowania odmiennych metod oznaczania przeciwciał i różnych definicji statusu NAb(+). Dla IFN β -1a podawanego domięśniowo jest to od 2 do 6% (Clanet *et al.*, 2002; Rudick *et al.*, 1998), dla IFN β -1a podawanego podskórnie – od 14 do 24% [PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 2001; Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group, 2001], a dla IFN β -1b – od 28 do 42% (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996; Polman *et al.*, 2003).

Wytwarzanie NAb może być zjawiskiem przejściowym i minąć mimo kontynuacji leczenia IFN β , szczególnie w przypadku niskiego miana przeciwciał. W badaniu klinicznym IFN β -1b (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996) 60% chorych NAb(+) uzyskiwało w czasie dalszej obserwacji (do 5 lat) przynajmniej jeden wynik ujemny – przy czym jeśli wcześniej miano NAb przekraczało 500 NU/ml, zdarzało się to rzadko. W badaniu OPTIMS dawka IFN β -1b podniesiona do 375 μ g zwiększała prawdopodobieństwo zaniku NAb (Durelli *et al.*, 2009). W badaniu duńskim (Sorensen *et al.*, 2005) większość chorych definitywnie NAb(+), z dwoma kolejnymi oznaczeniami dodatnimi, pozostawała dodatnia, ale 33% z nich w czasie czteroletniej obserwacji powróciło do statusu definitywnie ujemnego – z przynajmniej dwoma kolejnymi oznaczeniami ujemnymi. Prawdopodobieństwo serokonwersji do NAb(-) było istotnie większe dla IFN β -1b niż dla IFN β -1a s.c. W badaniu klinicznym IFN β -1a s.c. PRISMS-4 (Francis *et al.*, 2005) odsetek serokonwersji do NAb(-) w czasie czteroletniej obserwacji wynosił średnio 22% (19,9% dla niższej i 25,5% dla wyższej dawki). W badaniu SPECTRIMS [Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group, 2001], dotyczącym IFN β -1a podawanego podskórnie we wtórnie postępującej postaci MS, w ciągu 3 lat przeciwciała utraciło aż 30,2% i 66,7% leczonych odpowiednio dawką 22 lub 44 μ g.

Wysokie miano NAb zapowiada ich wieloletnie utrzymywanie się, nawet mimo przerwania leczenia interferonem. Miano >100 TRU zmierzone po 24. miesiącu terapii IFN β

silnie koreluje z przetrwaniem NAb (Gneiss *et al.*, 2004). Zaobserwowano, że przetrwałe NAb występują częściej u leczonych IFN β -1a podskórnie niż IFN β -1b lub IFN β -1a domięśniowo (van der Voort *et al.*, 2010).

EFEKT KLINICZNY NAB

Nie wykazano, aby izolowane występowanie NAb wpływało na skuteczność leczenia MS interferonem β . Udokumentowanie wpływu NAb na efekt leczenia jest trudne, ponieważ:

1. przeciwciała pojawiają się z opóźnieniem, a zatem ich działanie nie ujawnia się przy krótkiej obserwacji;
2. NAb występują tylko u części chorych, przez co moc badań nie zawsze wystarcza do wykazania zależności;
3. część chorych powraca do statusu NAb(-) lub fluktuuje między NAb(+) a NAb(-);
4. w badaniach używane są różne definicje statusu NAb(+), techniki oznaczania NAb, progi wysokości mian i sposoby analizy okresów NAb(+) i NAb(-).

Mimo powyższych problemów wyniki badań prospektywnych dowodzą, że NAb zmniejszają, a w wysokich mianach niweczą efekt terapeutyczny IFN β . Wyraża się to wzrostem częstości rzutów i pogorszeniem wyników neuroobrazowania w rezonansie magnetycznym; w niektórych badaniach stwierdzono nawet przyspieszenie postępu choroby. Opisane różnice zaczynają się pojawiać w 2.–3. roku leczenia, czyli nieco później niż wykrywalne NAb.

Związek NAb z liczbą rzutów (*relapse rate*, RR) wykazano w wielu badaniach randomizowanych. W trzyletnim badaniu pilotażowym oceniającym skuteczność IFN β -1b w postaci rzutowo-remisyjnej MS (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996) w grupie leczonej większą dawką (8 MIU) między 19. a 24. oraz 25. a 30. i łącznie między 13. a 36. miesiącem terapii roczna RR była wyraźnie większa u chorych NAb(+) niż NAb(-) (odpowiednio: 1,39 vs 0,63; 1,19 vs 0,35; 1,08 vs 0,56), ale podobna jak w grupie placebo (odpowiednio: 1,17; 0,92; 1,06). W tym badaniu chory, u którego stwierdzono NAb, był traktowany jako NAb-dodatni przez cały czas obserwacji, bez względu na to, czy w danym okresie rzeczywiście wykrywano u niego przeciwciała („raz dodatni – zawsze dodatni”). Spodziewano się, że gdyby uwzględnić okresy NAb(+) i NAb(-) w porównaniu między pacjentami i u pojedynczego chorego, wpływ przeciwciał mógłby się okazać wyraźniejszy. Z tego powodu przeprowadzono ponowną analizę danych (Petkau *et al.*, 2004), w której wykazano zależne od miana NAb zwiększenie częstości rzutów w okresach NAb(+) przy obu dawkach IFN β -1b. Różnica nie była widoczna w dwuletnim badaniu pilotażowym IFN β -1a podawanego podskórnie (PRISMS), ale ujawniła się w przedłużeniu tego badania (PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISMS-4, 2001), czyli w roku trzecim i czwartym (0,81 vs 0,5). Obserwacje te potwierdziła powtórna analiza (Francis *et al.*, 2005).

W badaniu IFN β -1a *i.m.* (Rudick *et al.*, 1998) nie udowodniono statystycznie istotnego wpływu statusu NAb na wynik leczenia. Mogło to wynikać z niskiego odsetka chorych NAb(+), wynoszącego około 5%. Większe badanie, porównujące dawki 30 i 60 μ g (Kappos *et al.*, 2005), wykazało, że RR u chorych NAb(+) była o 39% wyższa niż u pacjentów NAb(-).

Badania kliniczne dotyczące wtórnie postępującego MS wykazały, choć niespójnie, zwiększoną częstość rzutów w okresach NAb(+). W badaniu europejskim oceniającym zastosowanie IFN β -1b (Polman *et al.*, 2003) nie stwierdzono związku NAb z RR w porównaniu przekrojowym, ale w analizie podłużnej pojawienie się przeciwciał powodowało wzrost częstości rzutów o 45%, gdy porównano okres przed wykryciem i po wykryciu NAb. Kiedy w analizie uwzględniono wszystkie zmiany statusu przeciwciał, efekt był mniej wyraźny i nieistotny statystycznie. Z kolei w badaniu SPECTRIMS, w którym użyto IFN β -1a [Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group, 2001], różnice w RR między chorymi NAb(+) i NAb(-) były nieistotne statystycznie; jedynie porównanie z placebo sugerowało utratę efektu IFN β w grupie NAb(+) leczonej dawką 44 μ g.

Również prospektywne badania nierandomizowane udowadniają wpływ NAb na częstość rzutów. W części z nich porównano częstość rzutów w zależności od statusu NAb u danego chorego (analiza podłużna). W pięcioletnim badaniu (Sorensen *et al.*, 2003) obejmującym wszystkich duńskich chorych leczonych IFN β , u których obowiązkowo co 6 miesięcy oznaczano NAb, częstość rzutów w okresach NAb-dodatnich (0,64–0,70) okazała się istotnie wyższa niż w okresach NAb-ujemnych (0,43–0,46). W badaniu włoskim (Perini *et al.*, 2004) porównano RR przed pojawieniem się NAb i NAb oraz po ich pojawieniu się. Istotny związek ze wzrostem częstości rzutów wykazano przy mianie NAb >100 NU/ml, szczególnie przy jednoczesnym występowaniu NAb i NAb w wysokich mianach. W innych badaniach porównywano chorych NAb(+) z chorymi NAb(-) (analiza przekrojowa) i zaobserwowano wyższą RR u chorych NAb(+) (Malucchi *et al.*, 2004; Sato *et al.*, 2012).

Paolicelli i wsp. (2013) wykazali wzrost RR w okresach NAb(+) w porównaniu z okresami NAb(-), a także, przy użyciu parowania metodą *propensity score*, ogólnie większą (o około 60%) RR u pacjentów NAb(+).

Dosyć nieoczekiwane było spostrzeżenie, że w pierwszych 6–12 miesiącach leczenia chorzy, którzy w przyszłości wytworzyli NAb, doświadczają rzadszych rzutów niż pacjenci stale NAb(-) (Clanet *et al.*, 2002; The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996; Polman *et al.*, 2003; PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISMS-4, 2001). Próbowano to wyjaśnić m.in. przedłużeniem okresu półtrwania IFN β w wyniku wiązania z przeciwciałami o niskim powinowactwie.

Udokumentowanie wpływu NAb na progresję choroby było trudniejsze. Spośród wyżej przytoczonych badań randomizowanych tylko jedno wykazało istotną statystycznie zależność. Nie jest to zaskakujące, skoro sam efekt IFN β okazał się w tych badaniach trudny do wykazania. We wspomnianym czteroletnim badaniu (Kappos *et al.*, 2005) wśród pacjentów NAb(+) zaobserwowano większe średnie pogorszenie wyniku EDSS niż wśród chorych NAb(-). W kilku małych prospektywnych badaniach nierandomizowanych obserwowano częstsze (Malucchi *et al.*, 2004) i bardziej nasilone (Perini *et al.*, 2004) pogorszenia w skali EDSS w grupie NAb(+). W sześcioletnim badaniu pacjentów leczonych domięśniowo podawanym IFN β -1a (Tomassini *et al.*, 2006) wytworzenie NAb w pierwszym roku leczenia zapowiadało postęp niesprawności w ciągu 5 lat.

Działanie NAb – podobnie jak efekty leczenia interferonem – wcześniej, wyraźniej i bardziej powtarzalnie ujawnia się w obrazie rezonansu magnetycznego niż w przebiegu klinicznym. W większości wyżej wymienionych badań pojawienie się NAb wiązało się z większą aktywnością choroby (częstszym występowaniem zmian wzmacniających się po podaniu gadolinowego środka kontrastującego) i większym gromadzeniem kontrastu przez zmiany w sekwencji T2. Obserwowano to także w badaniach, w których nie wykazano wpływu NAb na przebieg kliniczny [Polman *et al.*, 2003; Rudick *et al.*, 1998; Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group, 2001]. Liczba i dynamika przyrostu zmian w rezonansie magnetycznym korelują z odległym rokowaniem, dlatego można podejrzewać, że wpływ NAb na obraz rezonansu przełoży się na pogorszenie obrazu klinicznego w dłuższej obserwacji.

Leczenie IFN β może być wskazane już na etapie izolowanego zespołu klinicznego (*clinically isolated syndrome*, CIS). W badaniu BENEFIT, porównującym IFN β -1b z placebo u chorych z CIS, NAb wystąpiły u 31,8% badanych. Nie wykazano, by ich obecność korelowała ze zwiększeniem RR, szybszą progresją do klinicznie jawnego MS czy postępem niesprawności. Chorzy z niskimi mianami NAb cechowali się niższą RR. Obecność NAb wiązała się natomiast z większą liczbą zmian w rezonansie magnetycznym, co oznaczało wzrost prawdopodobieństwa rozpoznania MS według kryteriów McDonalda (Hartung *et al.*, 2011).

U licznych chorych NAb zanikają podczas kontynuacji leczenia. Częstość rzutów zmniejsza się wtedy do poziomu nie wyższego niż przed pojawieniem się przeciwciał, co odpowiada przywróceniu skuteczności IFN β (Petkau *et al.*, 2004). Istnieją doniesienia mówiące o cięższym przebiegu klinicznym choroby nawet po kilku latach od przerwania terapii IFN β u osób z przetrwałymi NAb (van der Voort *et al.*, 2010). U pacjentów z NAb rzadziej występują działania niepożądane IFN β (The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group, 1996).

AKTYWNOŚĆ IFN β *IN VIVO*

W obliczu dowodów na istnienie związku NAb ze spadkiem skuteczności IFN β , a jednocześnie trudności technicznych związanych z ich oznaczaniem (np. konieczność wykorzystywania żywych hodowli komórkowych) poszukiwano metod oceny aktywności IFN β *in vivo*; dodatkowo żywiono nadzieję, że mogłyby one lepiej korelować z wynikami leczenia.

IFN β działa przez receptor IFNAR, za pośrednictwem ścieżki JAK/STAT indukujący ekspresję wielu genów, których produkty – w postaci mRNA lub białka – można oznaczać w komórkach krwi obwodowej. Proponowano wiele markerów aktywności IFN β u chorych na MS, m.in. β -2 mikroglobulinę, neopterynę, wiperynę, IFIT1 oraz wspomniane już MxA (Pachner *et al.*, 2009; Polman *et al.*, 2010). MxA jest jednym z najlepiej zbadanych markerów; ze względu na swoistość brak indukcji MxA koreluje z całkowitym brakiem działania IFN β na poziomie ekspresji genów (Polman *et al.*, 2010). Po podaniu IFN β obserwuje się wzrost stężenia mRNA MxA i białka MxA. Odpowiedź ta jest słabsza u pacjentów, u których wykryto NAb; supresja okazuje się tym silniejsza, im większe miano przeciwciał (Pachner *et al.*, 2009). Przy szczególnie wysokich mianach odpowiedź MxA zanika, niemniej jednak badacze podają rozbieżne wartości mian, przy których to obserwowali (od 45 do 600 NU/ml) (Polman *et al.*, 2010). Wykazano, że brak odpowiedzi MxA po podaniu IFN β koreluje z większą częstością rzutów (van der Voort *et al.*, 2009). Jak się wydaje, mRNA MxA jest nieco lepszym predyktorem ryzyka nowych rzutów niż NAb (Malucchi *et al.*, 2008). Może też wskazywać na inne przyczyny braku działania interferonu, np. wysycenie receptorów dla IFN, brak współpracy chorego albo zwiększone stężenie rozpuszczalnego receptora IFN.

ZALECENIA

Nie opracowano dotąd polskich zaleceń dotyczących oznaczania NAb. Program lekowy Narodowego Funduszu Zdrowia nie uwzględnia tego zagadnienia.

W ostatniej dekadzie powstało kilka propozycji międzynarodowych wytycznych. Najnowsze zalecenia Europejskiej Federacji Towarzystw Neurologicznych (*European Federation of Neurological Societies*, EFNS) opublikowano w 2011 roku (Sørensen *et al.*, 2011). Brzmiały one następująco:

1. Przed wykonaniem analizy NAb można zastosować – jako badanie przesiewowe – test oceniający występowanie BAB.
2. Analizy BAB i NAb powinny być przeprowadzane w wyspecjalizowanych laboratoriach. Złotym standardem jest walidacja wobec CPE lub badanie MxA. Obliczenia miana przeciwciał trzeba prowadzić metodą Kawade.
3. Zalecane jest badanie chorych leczonych IFN β na obecność NAb podczas pierwszych 24 miesięcy leczenia.

4. W przypadku chorych pozostających w tym czasie NAb(–) można zaniechać analiz, ale należy do nich powrócić, jeśli wzrasta aktywność choroby.
5. U chorych NAb(+) analizy powinny być powtarzane co 3–6 miesięcy.
6. Leczenie IFN β należy przerwać u pacjentów z utrzymującymi się wysokimi mianami NAb (>100 TRU dla IFN β -1b).

PODSUMOWANIE

Oznaczanie obecności przeciwciał przeciw interferonowi powinno zostać wprowadzone do praktyki klinicznej po uprzedniej walidacji stosowanych metod laboratoryjnych. Utrzymywanie się przeciwciał neutralizujących może stanowić istotne wskazanie do zmiany IFN β na inny lek, a nieobecność NAb – wesprzeć decyzję o kontynuacji leczenia interferonem. Powtarzanie oznaczeń NAb w trakcie leczenia IFN pozwala na wzmocnienie ich znaczenia klinicznego. Ocena wpływu NAb na skuteczność leczenia powinna uwzględniać obraz kliniczny (liczbę rzutów, wynik w EDSS), aktywność choroby w obrazie rezonansu magnetycznego oraz wpływ IFN β na parametry laboratoryjne – liczbę leukocytów i płytek krwi – odzwierciedlające niepożądane działania leku.

Konflikt interesów

Autorzy nie zgłaszają żadnych finansowych ani osobistych powiązań z innymi osobami lub organizacjami, które mogłyby negatywnie wpłynąć na treść publikacji oraz rościć sobie prawo do tej publikacji.

Piśmiennictwo

- Barnard JG, Babcock K, Carpenter JF: Characterization and quantitation of aggregates and particles in interferon- β products: potential links between product quality attributes and immunogenicity. *J Pharm Sci* 2013; 102: 915–928.
- Bertolotto A, Sala A, Caldano M *et al.*: Development and validation of a real time PCR-based bioassay for quantification of neutralizing antibodies against human interferon-beta. *J Immunol Methods* 2007; 321: 19–31.
- Clanet M, Radue EW, Kappos L *et al.*; European IFN β -1a (Avonex) Dose-Comparison Study Investigators: A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon β -1a in relapsing MS. *Neurology* 2002; 59: 1507–1517.
- Durelli L, Barbero P, Cucci A *et al.*; OPTIMS Trial NAb Sub-Study Group: Neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients treated with 375 μ g interferon- β -1b. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 387–397.
- Francis GS, Rice GP, Alsop JC *et al.*; PRISMS Study Group: Interferon β -1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology* 2005; 65: 48–55.
- Gneiss C, Reindl M, Lutterotti A *et al.*: Interferon-beta: the neutralizing antibody (NAb) titre predicts reversion to NAb negativity. *Mult Scler* 2004; 10: 507–510.
- Grossberg SE, Kawade Y, Kohase M *et al.*: The neutralization of interferons by antibody. II. Neutralizing antibody unitage and its relationship to bioassay sensitivity: the tenfold reduction unit. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 743–755.

- Hartung HP, Freedman MS, Polman CH *et al.*: Interferon β -1b-neutralizing antibodies 5 years after clinically isolated syndrome. *Neurology* 2011; 77: 835–843.
- The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. *Neurology* 1996; 47: 889–894.
- Kappos L, Clanet M, Sandberg-Wollheim M *et al.*: Neutralizing antibodies and efficacy of interferon β -1a: a 4-year controlled study. *Neurology* 2005; 65: 40–47.
- Lam R, Farrell R, Aziz T *et al.*: Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure neutralizing antibodies to IFN β in multiple sclerosis patients. *J Immunol Methods* 2008; 336: 113–118.
- Malucchi S, Gilli F, Caldano M *et al.*: Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2008; 70: 1119–1127.
- Malucchi S, Sala A, Gilli F *et al.*: Neutralizing antibodies reduce the efficacy of β IFN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 2031–2037.
- Michalak S: Przeciwciała wiążące i neutralizujące interferon beta u chorych na stwardnienie rozsiane. 11th Danube Teaching Course, Kazimierz 13–15 maja 2015 r.
- Pachner AR, Warth JD, Pace A *et al.*: INSIGHT investigators: Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon beta: the INSIGHT study. *Neurology* 2009; 73: 1493–1500.
- Paolicelli D, D'Onghia M, Pellegrini F *et al.*: The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon β -treated relapsing multiple sclerosis: a 5 year post-marketing study. *J Neurol* 2013; 260: 1562–1568.
- Perini P, Calabrese M, Biasi G *et al.*: The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* 2004; 251: 305–309.
- Petkau AJ, White RA, Ebers GC *et al.*: IFNB Multiple Sclerosis Study Group: Longitudinal analyses of the effects of neutralizing antibodies on interferon beta-1b in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2004; 10: 126–138.
- Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F *et al.*: Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9: 740–750.
- Polman C, Kappos L, White R *et al.*: European Study Group in Interferon β -1b in Secondary Progressive MS: Neutralizing antibodies during treatment of secondary progressive MS with interferon β -1b. *Neurology* 2003; 60: 37–43.
- PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group: PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon- β -1a in relapsing MS. *Neurology* 2001; 56: 1628–1636.
- Ross C, Clemmesen KM, Svenson M *et al.*: Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol* 2000; 48: 706–712.
- Rudick RA, Simonian NA, Alam JA *et al.*: Incidence and significance of neutralizing antibodies to interferon beta-1a in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Neurology* 1998; 50: 1266–1272.
- Sato DK, Nakashima I, Fukazawa T *et al.*: Neutralizing antibodies are associated with a reduction of interferon- β efficacy during the treatment of Japanese multiple sclerosis patients. *Tohoku J Exp Med* 2012; 228: 85–92.
- Secondary Progressive Efficacy Clinical Trial of Recombinant Interferon-Beta-1a in MS (SPECTRIMS) Study Group: Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: clinical results. *Neurology* 2001; 56: 1496–1504.
- Sørensen PS, Deisenhammer F, Duda P *et al.*: Use of anti-interferon beta antibody measurements in multiple sclerosis. In: Gilhus NE, Barnes MR, Brainin M (eds.): *European Handbook of Neurological Management*. 2nd ed., vol. 1, Wiley-Blackwell, Oxford, UK 2011.
- Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C *et al.*: Danish Multiple Sclerosis Study Group: Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005; 65: 33–39.
- Sorensen PS, Ross C, Clemmesen KM *et al.*: Danish Multiple Sclerosis Study Group: Clinical importance of neutralising antibodies against interferon beta in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2003; 362: 1184–1191.
- Tomassini V, Paolillo A, Russo P *et al.*: Predictors of long-term clinical response to interferon beta therapy in relapsing multiple sclerosis. *J Neurol* 2006; 253: 287–293.
- van der Voort LF, Gilli F, Bertolotto A *et al.*: Clinical effect of neutralizing antibodies to interferon beta that persist long after cessation of therapy for multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2010; 67: 402–407.
- van der Voort LF, Visser A, Knol DL *et al.*: Lack of interferon-beta bioactivity is associated with the occurrence of relapses in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2009; 16: 1049–1052.