

Multipl Sklerozda Anti-İnterferon-Beta Antikorları

Anti-İnterferon-Beta Antibodies in Multiple Sclerosis: Review

Bülent ÇAKAL^a

^aDeneyel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE),
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul

Geliş Tarihi/Received: 11.06.2013
Kabul Tarihi/Accepted: 09.01.2014

Yazışma Adresi/Correspondence:

Bülent ÇAKAL
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi,
Deneyel Tıp Araştırma Enstitüsü (DETAE),
İstanbul,
TÜRKİYE/TURKEY
bulentcakal@yahoo.com

ÖZET Günümüzde biyoteknolojik metotlar ile üretilen 250'den fazla biyofarmasötik, farklı spektrumdaki hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır. Bu ilaçların klinik yararlarına karşın potansiyel immünojenisitetleri nedeniyle hastaların bir kısmında özellikle nötralizan etkinliğe sahip anti-drog antikorları (ADA)'nın sentezlenmesi tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilen önemli faktörlerden biridir. ADA'lara ilişkin gerek bilimsel gerekse klinik veri ve deneyimler özellikle multipl skleroz (MS)'da anti-İnterferon-beta (IFN β) antikorları üzerinde yoğunlaşmıştır. IFN β , MS tedavisinde en sık tercih edilen birinci basamak hastalık modifiye edici tedavi uygulaması olmasına karşın, hastaların bir kısmında tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyebilen anti-IFN β antikorları gelişebilmektedir. Bu nedenle IFN β tedavisi süresince özellikle yüksek titre ve kalıcı nitelikteki nötralizan antikor (NAb) tespit edilen MS'li hastalarda tedavinin sonlandırılarak, IFN β dışında alternatif tedavi seçenekleri ile yeni bir tedavinin düzenlenmesi gerektiği öne sürülmektedir. Buna karşın gerek bu amaçla kullanılacak laboratuvar yöntemleri gerekse IFN β 'nın özellikle uzun dönemli tedavi etkinliği üzerinde NAb'ların olumsuz etkisinin gösterilmesine ilişkin konularda henüz tam bir uzlaşma yoktur. Bu derlemede, IFN β 'nın MS'de etki mekanizmaları, anti-IFN β antikorlarının immünolojik özellikleri ve laboratuvar tanısı ile biyolojik ve klinik önemine ilişkin bilimsel literatürün gözden geçirilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Multipl skleroz; interferon-beta; antikorlar, nötralizan; mikrovirus rezistans proteinler

ABSTRACT Today, more than 250 biopharmaceutical agents produced by biotechnological methods are used for the treatment of the diseases in highly different spectrums. Despite the clinical benefits of these drugs, one of the most important factors which impair the effectiveness of the therapy in some patients is the production of antidrug antibodies (ADAs) with neutralizing capacity due to their potential immunogenicity. Both scientific and clinical experiences regarding ADAs are concentrated in multiple sclerosis (MS) and especially on anti-İnterferon-beta (IFN β) antibodies. Although IFN β is the most preferred first-line immunomodulatory treatment in MS, in some of the patients the production of ADAs may impair the therapeutic effect of IFN β . Hence, in MS patients with especially persistent and high-titer neutralizing antibodies (NAb), it is recommended that IFN β treatment should be stopped and a switch to an alternative non-IFN β therapy should be considered. However, there is still no clear-cut consensus on neither laboratory methods used for this purpose nor the negative impact of NABs on the therapeutic effects of IFN β for particularly extended periods of treatment. In this review, to overview the mechanisms of action of IFN β in MS, the immunological properties of anti-IFN β antibodies, and the laboratory diagnosis in addition to their biological and clinical importance is aimed in the light of the relevant literature.

Key Words: Multiple sclerosis; interferon-beta; antibodies, neutralizing; myxovirus resistance proteins

Multipl skleroz (MS), tüm dünya da farklı klinik alt tipleri ile birlikte yaklaşık 2,5 milyon insanı etkileyen, kompleks genetik ve çevresel faktörlerin kontrolünde oluşan, doğal ve kazanılmış immün yanıtlar ile nöral metabolizmayı kontrol eden mekanizmaların karşılıklı etkileşimi ile şekillenen, organa özgün, inflamasyon, demiyelinizasyon ve aksonal hasarın oluşturduğu nörodejenerasyon ve değişik derecelerde özürllülük ile karakterize T hücre aracılı otoimmün bir hastalık olarak değerlendirilmektedir.¹⁻³ Başta viral enfeksiyonlar olmak üzere diğer çevresel faktörlerin de bu heterojen otoimmün mekanizmaların oluşmasında etkin rol oynadığı genel kabul görmektedir.⁴ Bu nedenle hastalığın patogeneğinde birden çok gen ve aynı şekilde birden çok çevresel faktörün karşılıklı etkileşimi belirleyici olmaktadır.⁵

1990'lı yıllardan beri rekombinant interferon-beta (rIFN β), MS tedavisinde immünmodülatör etkinliği dolayısıyla en sık tercih edilen birinci basamak hastalık modifiye edici tedavi uygulaması olmasına karşın, hastaların yalnız bir bölümünde etkili olabilmekte, hastaların önemli bir bölümünde ise (%30-50) tedaviye istenilen düzeyde yanıt alınmamakta, tedaviye rağmen klinik aktivite devam edebilmektedir.⁶⁻⁸ Patogenetik nedenler dışında, tedavi yanısızlığının önemli nedenlerinden birinin ise rIFN β preparatlarının potansiyel immünojenisiteleleri nedeniyle kendilerine karşı sentezlenen IgG tipinde anti-IFN β antikorları olduğu belirtilmektedir.⁹⁻¹⁶ Özellikle nötralizan [Neutralizing antibodies (NAb)] etkiye sahip anti-IFN β antikorlarının IFN β 'nın reseptör ilişkili aktivasyonuna engel olarak, IFN β 'nın biyolojik ve tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkilediği, bu nedenle MS'li hastalarda anti-IFN β antikorlarının neden olabildiği tedavi başarısızlığının önlenmesi ve daha etkin tedavi seçeneklerinin zamanında uyarlanması amacıyla, anti-IFN β antikorları ve/ya bu antikorlar ile ilişkili in vivo-biyolojik aktivite kaybının belirlenmesini içeren laboratuvar yöntemleri ile tanı ve izleminin yararlı ve gerekli olduğu, özellikle yüksek titre ve kalıcı nitelikteki nötralizan antikorlar ve/veya tam biyoaktivite kaybı tespit edilen hastalarda ise tedavinin sonlandırılarak IFN β dışında yeni bir tedavinin düzenlenmesi gerektiği öne sürülmektedir.^{6,7,9-11,17-19}

Buna karşın; konunun Amerikalı ve Avrupalı tarafları arasında, MS'li hastalarda IFN β tedavisi sırasında oluşan NAb ve/veya biyolojik aktivite kaybına ilişkin laboratuvar verilerinin klinik uyarlanıma ilişkin konularda henüz tam bir uzlaşma mevcut değildir.^{20,21} Eleştiriler ağırlıklı olarak: 1- NAb ve/veya biyoaktivite kaybı varlığında IFN β tedavisinin değiştirilmesi yönündeki yaklaşımı sürekli destekler nitelikteki bilimsel ve klinik verilerin henüz tam ve yeterli düzeyde olmadığı, bu amaçla yapılan çalışmaların bilimsel kanıt düzeylerinin daha çok sınıf I ve II düzeyinde olduğu; 2- NAb'ların ve/veya biyolojik aktivite düzeylerinin tespitinde kullanılan laboratuvar metodlarının hangi hastalarda, ne zaman, hangi sıklıkla isteneceği ve standardizasyonları ile laboratuvar verilerinin pozitif eşik değerleri; 3-özellikle NAb'ların hastaların uzun dönemdeki klinik sonuçları üzerindeki etkisinin tartışmalı olduğu ve nihayet NAb'ların kötü klinik seyir üzerindeki etkisinin açık olmadığı yönünde yoğunlaşmaktadır.²⁰⁻²³

■ rIFN β , MS'DE KLİNİK KULLANIM VE İMMÜNMODÜLATÖR MEKANİZMALAR

TİP I İNTERFERONLAR

IFN'ler, ilk defa 1957 yılında Alick Isaacs ve Jean Lindenman tarafından influenza virüsleri ile inkübe edilmiş tavuk yumurtası embriyonlarının koryoallontoik membranlarından elde edilen kültür üst sıvısında influenza virüs enfeksiyonlarına karşı viral interferansın gözlenmesi ile elde edilen çalışmalar sonucu keşfedilmiştir.²⁴ Daha sonra yapılan çalışmalarda interferansın hücrelerce sentezlenen biyolojik ürünlerle gerçekleştiği, IFN'lerin farklı genler ile sentezinin düzenlendiği, antiviral aktivite dışında antitümöral, anti anjiyogenik, anti proliferatif, apoptotik protein ve genleri aktive edici, tersine antiapoptotik gen ve proteinlerin inhibe edici, hücre büyüme inhibitörü ve immün düzenleyicilik gibi organizmanın yararına olan normal immünolojik fonksiyonları yanında, paradoksal olarak organizmaya zarar verici nitelikteki pro-inflamatuar ve otoimmün patolojileri de teşvik eden çok yönlü immünobiyolojik etkinliklere sahip olduğu gösterilmiştir.²⁵⁻²⁹ Son 50 yıldır büyüyen si-

tokin ailesi olarak kabul edilen IFN'ler; özellikle tip I IFN'ler hepatit B virüs ve hepatit C virüs gibi kronik viral enfeksiyonlardan MS'ye ve bazı kanser türlerini de içeren farklı yelpazedeki hastalıkların tedavisinde klinik kullanım alanına sahiptir.²⁶ Amino asit sekans farklılıkları ve dizilimlerine göre Tip I, II ve III IFN'ler olmak üzere üç gruba ayrılır. Tip I IFN'ler; insanda dokuzuncu kromozomda lokalize olup, lökosit, makrofaj ve dendritik hücrelerce sentezlenmekte, 13 farklı genle düzenlenen IFN- α , fibroblastlarca sentezlenen tek bir genle düzenlenen IFN β ile IFN- ω , - ϵ , - δ , - κ 'i içeren en büyük grubu oluşturmaktadır.²⁵ IFN- α ve IFN β viral enfeksiyonlara karşı immün yanıtta direkt olarak indüklenmesine karşın, IFN- ω , - ϵ , - δ , - κ 'nin rolleri az bilinmekte ve daha çok gebelik sürecinde maternal tanıma ve immün düzenlemede rol aldıkları düşünülmektedir. IFN- α ve IFN β 'nın amino asit sekansları arasında %30 oranında benzerlik mevcuttur.^{25,27}

Tip II IFN'ler, tek üyeli olup ilk defa 1965 yılında keşfedilmiş, insanda 12. kromozomda lokalize ve bir genle kontrol edilen, mitojenik aktiviteli T hücreleri ve NK hücrelerden salınan IFN γ ya da immün IFN olarak adlandırılan sitokinlerdir.²⁸ Enfeksiyonlardan korunmadaki fonksiyonları yanında hipersensitivite reaksiyonları ve otoimmün patolojilerde immün hücrelerin aktivasyonu ve immün yanıtların oluşmasında en önemli endojen düzenleyici lenfokin olarak kabul edilmelerine karşın henüz visseral leishmaniasis ile kronik granülomatöz hastalık tedavisinde sınırlı klinik kullanıma sahiptirler.²⁸ Son yıllarda keşfedilen tip III IFN'lerden IFN λ ise biyolojik etkinlik açısından tip I IFN'lere benzemekle beraber, genel olarak daha sınırlı sayıdaki hücre ve dokularda sentezlenmekte, kendi arasında ise IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A), IFN λ 3'i (IL-28B) içeren alt gruplara ayrılarak adlandırılmakta enfeksiyondan korunmada ve immün yanıtlar üzerindeki rolleri ile biyolojik özellikleri hakkında veriler henüz yetersiz olmakla birlikte, özellikle enterovirüs enfeksiyonlarına karşı viral replikasyonu engelleyici enzimlerin transkripsiyonunu aktive ederek koruyucu nitelikteki antiviral immün yanıtların oluşmasında spesifik rolleri olabileceği belirtilmektedir³⁰

rIFN β VE GENEL ÖZELLİKLERİ

Doğal IFN β , 166 amino asitten oluşan, 25 kDa ağırlığında, glikozile formda, 17. amino asit pozisyonunda sistein içermeyen bir proteindir.³¹ IFN β preparatları rekombinant gen teknolojisi ile üretilmekte, rIFN β -1a insan genlerinden sekanslanarak bir memeli hücresi olan hamster over hücrelerinde sentezlenen glikozile halde ve insan IFN β molekülüne ait 166 aminositlik tüm sekansı içeren 23 kDa'luk bir peptittir. rIFN β -1b ise bir bakteri (*Escherichia coli*) hücresinde rekombinant gen teknolojisi kullanılarak sentez edilen 165 amino asitik moleküler ağırlığı 18,5 kDa olan bir peptit olup, glikozile formda değildir. İnsan IFN β molekülünden proteinin 17. amino asit pozisyonunda serin yerine sistein mutasyonu ve N terminal 1 pozisyonunda da metionin delesyonunu içeren iki amino asit modifikasyonu ile ayrılır.^{31,32}

rIFN β MS'DE KLİNİK KULLANIM VE İMMÜNMODÜLATÖR MEKANİZMALARI

İlk rIFN β sentezi 1980 yılında Weissmann ve ark. tarafından insan lökositlerinden izole edilen IFN β genlerinin, pBR322 vektörüne klon olarak *E. coli*'ye transformasyonu ile gerçekleştirilmiştir.³³ IFN β 'nın MS'de tedavi amacıyla ilk kez kullanımı ise 1982 yılında Jacobs ve ark. tarafından immünmodülatör etkinliğinden ziyade, MS'nin etiopatogenezindeki virüslerin olası rolleri nedeniyle, IFN β 'nın antiviral etkinliği baz alınarak insan fibroblastlarından izole edilen IFN β 'nın 10 MS'li hastaya intratekal uygulaması sonrası kontrol gruba göre hastalarda karakteristik klinik semptom ve atakların önemli ölçüde azaldığının tespit edilmesi ile başlamıştır.³⁴

MS tedavisinde asıl hedef, primer fazda hastalığın aktivitesi ve progresyonunun önlenmesi ve/veya yavaşlatılması ile nörodejenerasyonla karakterize sekonder progresif faza geçişin ve gelecek özürülülüğün engellenmesi, sonuçta akson ve miyelinin korunmasıdır.³⁵ Günümüzde bu amaçla en sık tercih edilen tedavi stratejisini, hastalık modifiye edici tedavi seçenekleri oluşturmaktadır (Disease-modifying treatments).^{36,37} 1993 yılından beri MS tedavisinde onay almış dört farklı ticari rIFN β preparatı klinik kullanıma sahiptir. Bunlar; IFN- β -1a (i.m. Avonex® and s.c. Rebif®) ve IFN- β -1b (s.c.

Betaseron®, s.c. Extavia®)'dir. IFNβ preparatlarının MS'de tedavi etkinliğini belirlemek amacıyla yapılan çok merkezli, çift kör, randomize kontrollü klinik çalışmalarda, kullanımdaki rekombinant IFNβ preparatlarının plasebo grubuna göre, relaps oranında ortalama %30, MR aktivitesi ve yükünde ise ortalama %50-70 oranlarında azalma sağladığı, hastaların progresyon ve özürllülük hızının yavaşlaması ile yaşam kalitesi ve süresinin uzatılması yönünde tedavi etkinliğine sahip olduğu gösterilmiştir.³⁸⁻⁴²

Genel olarak MS'deki immünpatogenezin, başta miyelin bazık protein (MBP) olmak üzere, miyelin oligodendrosit glikoprotein ve diğer miyelin proteinleri gibi self antijenlere karşı, spesifik otoreaktif T hücrelerinin otoimmün aktivasyonu sonucu başladığı kabul edilmektedir.⁴³ Oluşan otoimmün sürece adezyon molekülleri, kostimülör moleküller (B7,CD40), inflammatuar sitokinler, B hücreleri, mononükleer hücreler gibi diğer hücre ve sitokinlerin de bir "domino" etkisi ile katılmasıyla, periferdeki bu inflammatuar sürecin kan beyin bariyeri (KBB)'ni aşarak santral sinir sistemi (SSS)'ne taşınması takip eder.⁴⁴ Hastalığın sonraki aşamasında astrosit ve mikroglia gibi SSS hücrelerinin de devreye girdiği daha karmaşık, kontrolü zor bir immün döngü ortaya çıkar. Oluşan inflamasyonun oligodendrosit, miyelin ve aksonlarda hasara neden olması ile farklı şiddetlerde nörolojik özürllülüğün ortaya çıkması söz konusudur.⁴⁵ Günümüzde hastalığın özellikle nörodejenerasyon ile karakterize progresif fazında edinsel yanıtlardan ziyade, doğal immün yanıtların daha kritik rol oynadığı savunulmaktadır.³⁵ Bu açıdan IFNβ'nın MS'deki tedavi yararına ilişkin moleküler mekanizmalar henüz tam olarak bilinmemekle birlikte, otoreaktif T lenfosit aktivasyonu ile KBB'den aktive immün hücrelerin, lökosit ve makrofajların geçişinin engellenmesi, antiinflammatuar sitokinlerin sentezinin arttırılması ve/veya modüle edilmesi ile nöral koruyuculuk (nöroprotektif) sağlayarak tedavi etkinliği gösterebileceği belirtilmektedir.⁴⁶⁻⁴⁹

IFNβ'nın MS'de tedavi edici etkinliğinin önemli bir kısmı antiinflammatuar mekanizmaların aktivasyonu ve düzenlenmesi üzerinden gerçekleşir. Bu mekanizmaların en önemlisini, miyelin kı-

lıfı proteinlerine karşı oluşan Th1 yönündeki yanıtların, Th2 yönüne modülasyonuna imkân sağlayan sitokin balansı oluşturur.⁵⁰⁻⁵² IFNβ moleküler düzeyde bu etkinliğini; Th1 yönündeki pro-inflammatuar süreçte yer alan IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, TNFα, IFNγ, osteopontin, prostaglandin E ve siklooksijenaz-2 gibi sitokin ve moleküllerin transkripsiyonel ve mRNA düzeyinde süpresyonu yolu ile gerçekleştirir. IFNβ ayrıca IL-4, IL-10, IL-27, IL-1R antagonisti, serbest TNF reseptörleri, TGF-β ve Treg'ler gibi antiinflammatuar ve immünmodülör sitokin ve moleküllerin ise sentez düzeyinin arttırılması yönünde immünmodülasyon sağlayarak da tedavi etkinliği gösterebilmektedir.^{47,53}

KBB özellikle doğal immün hücreler, sitokinler, adezyon molekülleri ve aktive T hücrelerinden oluşan kompleks immün trafik ağının SSS'ye geçişinde önemli bir işleve sahiptir. IFNβ'nın KBB'nin yapısal bütünlüğünün korunmasına yönelik tedavi edici etkinliği temelde iki mekanizma üzerinden gerçekleşir. Bunlardan ilki, T hücrelerinin endotele adezyonunun ikincisi ise lökositlerin SSS'de ekstravazasyonunun engellenmesini içerir.⁴⁷ IFNβ tedavisi hastalarda serbest halde bulunan vasküler hücre adezyon molekülü-1 (sVCAM-1)'in serum konsantrasyonlarında artışına neden olur.⁵⁴ sVCAM ligandı olan T hücre adezyon molekülü beta integrinlerden VLA-4 ile endotele adezyon yönünden rekabet girerek aktive lökositlerin endotele adezyonunu engeller. Ayrıca IFNβ T hücre üzerindeki VLA-4'ün sentez düzeylerinde azalmaya neden olarak aktive immün hücrelerin SSS'ye adezyonunu engelleyerek, KBB'deki immün hücre trafiğini düzenleyip, hastaların beyin dokusu hasarının şiddetinin azaltılması yönünde tedavi etkinliği gösterir. Nihayetinde IFNβ perifer ve SSS arasındaki endotel hücre bariyerinin yapısal bütünlüğünün korunmasında önemli bir fonksiyona sahiptir.⁵⁵⁻⁵⁹

IFNβ aktive immün hücrelerin KBB'ye geçişini engelleyerek SSS'de yeni lezyonların oluşmasını sınırlamasının yanında, SSS içinde de lenfosit trafiğini düzenleyici etkinliğe sahiptir.⁴⁸ IFNβ'nın doku bütünlüğünün korunması ve doku hasarının sınırlandırılmasına yönelik fizyolojik fonksiyonunun direkt; antiviral, antiinflammatuar ve immün-

modülatör etkilerinin ise indirekt bir sonucu olarak nöral koruma sağladığı düşünülmektedir.^{47,48} Mikroglia hücreleri aktive olduklarında IL-12, TNF- α , IL-1 β gibi inflamatuvar sitokinler ile glutamat, süperoksit, nitrit oksit (NO) ve peroksinitrit gibi nörotoksik etkili moleküller salarak patogeneizde nörodejenerasyona önemli katkıda bulunurlar. IFN β 'nın mikroglia hücrelerince sentezlenen nörotoksik etkili metabolitlerin salınımını engellemek ve mikroglia hücrelerini apoptoza yönlendirici mekanizmalar aracılığı ile klinik yarar gösterebildiği belirtilmektedir.^{51,60} Nihayetinde MS'li hastalarda uzun süreli IFN β tedavisinin manyetik rezonans görüntüleme (MRG) yükünde azalmaya neden olduğu ilacın antiinflamatuvar ve immünmodülatör etkinliği yanında nöral koruyucu etkinliğinin de olabileceği belirtilmiştir.⁶⁰

rIFN β PREPARATLARININ İMMÜNOJENİSİTESİ VE İMMÜN YANIT MEKANİZMALARI

Normalde rekombinant gen teknolojisi kullanılarak insan genomunun kopyalanması sonucu sentezlenen protein esaslı biyolojik ürünler insanlarda tedavi amacıyla kullanıldıklarında immün sistemin tolerans göstermesi beklenirken, bu preparatlara karşı tedavi sırasında anti-drog antikorların sentezlendiği bilinmektedir.⁶¹ İnsan dışı kaynaklardan elde edilen adenzin deaminaz ve mikrobiyal streptokinaz gibi proteinler tedavi amacıyla kullanıldıklarında, non-self düzeyde klasik immün yanıtları aktive etmelerine karşın, insan orijinli protein bazlı tedavi ürünleri ise ağırlıklı olarak tolerans kırılması yolu ile antikor yanıtlarını aktive ederler.⁶² Buna karşın insan protein bazlı rekombinant tedavi ajanlarına karşı toleransın nasıl kırıldığı ve immün aktivasyonun nasıl gerçekleştiği henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bununla birlikte bir proteinin yineleyen epitoplara sahip ol-

ması ile şekillenen agregat (kümelenme, katlanma) yapısının monomerik yapılarına göre daha güçlü bir immün stimulan özellik gösterdiği bu nedenle tedavi amacıyla kullanılan proteinlere karşı immün yanıtların oluşmasında bu proteinlerin yabancı veya otolog olmasından ziyade protein agregasyonunun miktarı ve büyüklüğünün kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (Tablo 1).⁶¹⁻⁶⁴ rIFN β preparatlarındaki protein agregasyonunun immünojenite ve immün bellek üzerine etkisini belirlemek amacıyla rIFN β 'ya karşı immün toleran transgenik fareler üzerinde yapılan çalışmalarda; her üç preparatın BAb ve NAb oluşumunu indüklediği buna karşın transgenik farelerdeki antikor sentezinin preparatların immünojenitesilerinin düzeyine bağlı olduğu, NAb ve immünolojik bellek gelişmeden immün toleransın kırılabildiği, bu nedenle IFN β 'ya karşı gelişen immün yanıtların, klasik T hücre bağımlı yanıtlardan büyük ölçüde farklı geliştiği bildirilmektedir.^{61-63,65} Dolayısıyla rIFN β preparatlarının üretim teknolojisine bağlı olarak şekillenen protein agregasyonunun; preparatların immünojenitesinin belirlenmesinde kritik öneme sahip olduğu, klasik T hücre bağımlı yanıtların aktivasyonundan ziyade ağırlıklı olarak B hücre toleransının kırılması yolu ile humoral immün yanıtları uyarak antikor sentezlenmesinde kritik öneme sahip olduğu anlaşılmaktadır.

İmmün sistem protein yapıları yabancı antijenlere karşı T hücre bağımlı [T cell dependent (TD)], polisakarit ve lipid gibi diğer antijenlere karşı ise T hücre bağımsız [T cell independent (TI)] immün mekanizmalar aracılığıyla humoral yanıtlar oluşturabilmektedir. TD antijenlere karşı sentezlenen antikorlar gelişimleri için T hücre yardımına gereksinim duyan, izotip dönüşümü sağlayabilen, sentezleri periferik lenfoid organların foliküler merkezinde gerçekleşen, afiniteleri yüksek ve immün belleğe sahip olmalarına karşın, TI antijenlere karşı sen-

TABLO 1: rIFN β preparatlarının immünojenitesini etkileyen faktörler.⁶¹

Faktörler	Özellikler
Proteine bağlı faktörler	Sekans yapısı, glikozilasyon
Tedaviye bağlı faktörler	Uygulama yolu, dozu, süresi, sıklığı
Hastaya bağlı faktörler	HLA allel genleri, genetik defekt
Üretim teknolojisine bağlı faktörler	Formülasyon (Agregasyon) , üretim ve sonrası süreçler

tezlenen antikolar ise, T hücre yardımına gerek duymayan, izotip dönüşümü sınırlı, sentezleri periferik lenfoid organların marginal zonunda gerçekleşen, antikor afiniteleri düşük veya kısmi, immün bellek özellikleri ise zayıf ya da bulunmayan antikolar olup, TI antijenler ayrıca kendi aralarında immünojenisitelerine göre TI-1 ve TI-2 olmak üzere iki gruba ayrılmakta, TI-1'ler için antikor sentezi için tek sinyale, TI-2'ler için ise izotip dönüşümü için iki sinyale gereksinim duyulmaktadır.^{66,67} Rekombinant insan proteinleri TD ve/veya TI antijen gibi davranarak antikor sentezine sebep olabilmektedir. NAb pozitif kişilerde zaman içinde seronegatifleşme gözlemlenmesi NAb'ların immün bellek özelliklerinin zayıf olduğunu buna karşın IgM'den ziyade IgG tipi antikoların sentezlenmesi ve izotip dönüşümünün varlığı ise bir ikinci sinyal gereksinimi göstermekte dolayısıyla rekombinant insan protein agregatlarının tekrarlayan epitoplara sahip olması ve yukarıda özetlenen niteliklerinin insan immün sistemi tarafından ağırlıklı olarak TI-2 antijenleri gibi algılanarak bu özellikler de antikor sentezlendiği anlaşılmaktadır.⁶¹ İnsan B hücre marjinal zonlarının TI antijenlere karşı antikor yanıtında önemli rol oynadığı dalak ve lenf nodüllerinin marjinal zonlarındaki B hücrelerinin bu tedavi edici insan proteinler ile ilk karşılaşan yer ve hücreler olabileceği bu nedenle de B hücrelerinin bu preparatlara karşı, önce IgM tipinde daha sonra nötralizan etkiye sahip IgG tipinde antikolar üreten plazma hücrelerine dönüştükleri ve bu dönüşüm için gerekli ikinci sinyalin B hücre aktivasyon faktörü tarafından sağlandığı öne sürülmektedir.^{61,68} IFN β -1a ve IFN β -1b arasındaki amino asit sekans ve glikozilasyon farklılıkları preparatların immünojenisitelerinin farklı düzeylerde oluşmasına neden olmakta, nihayetinde IFN β -1b'nin glikozile formda olması proteinin daha yüksek oranda agregasyon eğilimi göstermesine bu nedenle de immünojenisitesinin artmasına neden olabilmektedir.^{15,64,69} Tedavi edici proteinlere karşı antikor yanıtının oluşmasında ayrıca bireyin HLA II ve IFN β gen repertuarı ile patern tanıyan reseptörleri [pattern-recognition receptors (PRR)] kodlayan genlerdeki tekli nükleotoid polimorfizmlerinin de belirleyici olabildikleri gösterilmiştir.⁷⁰⁻⁷²

NAb'ların IFN β molekülünde bağlandığı spesifik epitoplara belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada, IFN β 'nin amino asit sekans dizilimine göre anti-IFN β antikolarının bağlandığı 1-12, 121-132 ve 151-162 amino asit rezidülerinde üç epitop bölgesi tespit edilmiştir.¹⁵ NAb'lar ve diğer antikolar (BAb) 121-132 rezidüleri üzerindeki epitopa eşit oranda bağlanmalarına karşın, NAb'lar BAb'lara oranla 1-12 ve 151-162 lokasyonundaki epitoplara daha güçlü bir afinite ile bağlanmaktadır. Bu nedenle belirtilen iki epitopun NAb bağlanmasında kritik öneme sahip olduğu gösterilmiş, ancak molekülün N terminal bölgesindeki 1-12 rezidülerine, IFN β -1a ile tedavi edilen hasta NAb'larının IFN β -1b ile tedavi edilen hasta NAb'larına göre daha belirgin bağlanma paterni gösterdiği ayrıca, yine 1-12 amino asit rezidülerine karşı, IFN β -1a ile tedavi edilen hastalarda, IFN β -1b ile tedavi edilen hastalara göre daha yüksek titrelerde NAb'ların oluştuğu saptanmıştır.¹⁵ Bu bulgular anti-IFN β -1b antikolarının molekülün N-terminal bölgesine düşük afinite göstermesinin nedeninin IFN β -1b'nin N terminal sonlanma bölgesinde metionin içermemesinden kaynaklandığını destekler niteliktedir. Sonuç olarak, NAb'ların BAb'lara oranla IFN β 'ya bağlanma afinitelerinin daha yüksek olduğu ve epitop spesifitelerinin farklı olduğu ayrıca NAb'ların IFN β molekülüne bağlanma paternleri açısından farklılıklar içerdiği, gerek NAb'ların kendi arasında gerekse diğer antikorlardan (BAb) kantitatif farklılıklar yanında kalitatif farklılıklar gösterdiği iki IFN β -1a preparatı arasında ise subkutan (sc) IFN β -1a'ya karşı oluşan antikoların IFN β 'ya bağlanma afinitesi intramusküler (im) IFN β -1a'ya göre daha yüksek olup bu durumun preparatların üretim teknolojilerinden kaynaklandığı belirtilmektedir (Tablo 2).^{69,73} Sonuçta IFN β -1a ile tedavi edilen hastalardaki NAb'lar IFN β -1b ile tedavi sırasında oluşan NAb'lara oranla daha geç oluşmasına karşın daha kalıcı nitelikte, buna karşın IFN β -1b'ye karşı oluşan NAb'lar ise daha erken dönemde sentezlenmekte ve tedaviyi takiben daha fazla geri dönüşüm eğilimi gösterebilmektedirler.^{74,75}

Özetle rIFN β 'nin sentez ve üretim teknolojisine bağlı olarak şekillenen protein agregasyonunun miktarı ve çapının, preparatların immüno-

TABLO 2: Farklı IFN β preparatlarına karşı oluşan NAb'ların karakteristik özellikleri.^{15,64}

Özellik	IFN β Preparatları		
	im IFN β -1a	sc IFN β -1a	sc IFN β -1b
Seropozitiflik oranı	En düşük NAb pozitifliği (%2-6)	Orta düzeyde pozitiflik (%12-28)	Yüksek NAb pozitifliği (%27-45)
NAb titreleri	IFN β -1b'den daha yüksek	IFN β -1b'den daha yüksek	IFN β -1a'den daha düşük
Tedavi devamında kalıcılık	Tedavi ile azalma eğiliminde seronegatifleşme daha az	Tedavi ile azalma eğiliminde ama seronegatifleşme IFN β -1b'den daha düşük	Tedavi ile azalma eğiliminde ve seronegatifleşme oranı IFN β -1a'dan daha yüksek
Tedavi sonlandırılması sonrası kalıcılık	Düşük titrelerde seronegatifleşme Yüksek titreler kalıcı	Düşük titrelerde seronegatifleşme Yüksek titreler kalıcı	Düşük titrelerde seronegatifleşme Yüksek titreler kalıcı
IFN β 'nin reseptör spesifik epitoplara bağlanma afiniteleri ¹⁵	En Yüksek	IFN β -1b'den daha yüksek	En düşük

jenitesini belirlediği, bu preparatlara karşı gelişen immün yanıtların düzeyi, şiddeti ve yönünün belirlenmesinde ise B hücre toleransını kontrol eden mekanizmalar ile marjinal zon B hücrelerinin önemli olduğu, transgenik fare modelleri çalışmalarından elde edilen son veriler ise IFN β 'ya karşı gelişen immün yanıtların bellek oluşumu zayıf, afinite olgunlaşması sınırlı özellik gösteren polisakkarit aşılarda için tanımlanan TI-2 immün yanıtlar ile yakın benzerlik gösterdiği yönündedir.

ANTI-IFN β ANTİKORLARI VE İN VİVO BİYOLOJİK AKTİVİTE

Tedavi amacıyla kullanılan rIFN β 'nin immünojen karakterli olduğu ve anti-IFN β antikorlarının sentezine yol açtığı ilk kez 1980 yılında insan lökosit IFN'leri ile tedavi edilen nazofaringeal karsinomlu hastalarda bildirilmiştir.⁷⁶ IFN β tedavisi alan MS'li hastalarda ise ilk anti-IFN β antikorlarının varlığı 1996 yılında "The IFN β Multiple Sclerosis Study Group" tarafından üç yıl süre ile IFN β -1b tedavisi uygulanan hastaları kapsayan çok merkezli bir çalışma sonucu rapor edilmiştir.⁷⁷

BAĞLAYICI ANTİKORLAR (BAb)

Tüm anti-IFN β antikorları IgG tipinde olup, IFN β molekülünü bağlayıcı özellikleri nedeniyle BAb olarak adlandırılır. BAb'lar MS'li hastaların yarısından fazlasında (%10-90) sıklıkla tedavinin ilk yılında (3-12 ay) sentez edilmekte, ELISA ve Western blot gibi basit laboratuvar metotları ile tanımlanabilmekte-

dirler.⁷⁸ BAb'lar IFN β 'nin reseptörüne (IFNAR) bağlanmasına engel teşkil etmeyen reseptör bağlantı bölgesi dışındaki epitoplara ve/ya IFN β molekülüne daha düşük afinite ile bağlandıklarından, IFN β 'nin in vivo biyolojik etkinliğinde azalmaya yol açmadığı kabul edilen antikorlardır.^{15,79} BAb'ların genelde NAb'lardan daha önce oluşması ayrıca yüksek titrede BAb varlığında NAb'ların görülmesi nedeniyle IFN β tedavisi alan MS'li hastalarda anti-IFN β antikorlarının laboratuvar tanı ve izleminde BAb'ların tarama testi olarak kullanılarak BAb pozitifliği saptanan hastalardan bir sonraki aşamada, NAb varlığı ve/veya biyolojik aktivitenin değerlendirilmesi önerilmektedir.¹⁸ BAb seropozitifliği saptanan hastaların sadece bir kısmında (1/3) nötralizan aktiviteye sahip NAb'lar gelişir.^{80,81}

NÖTRALİZAN ANTİKORLAR (NAb)

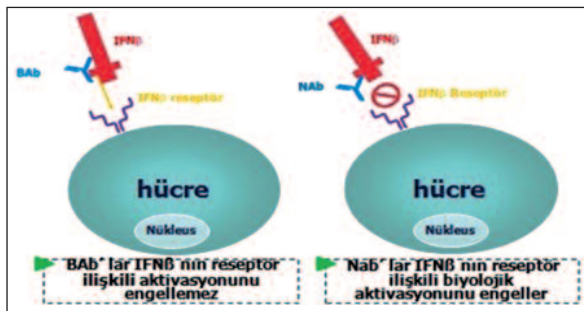
NAb'lar, tek bir B hücre klononundan sentezlenen düşük afiniteli BAb'ların, IFN β 'nin reseptör aktivasyonu için kritik öneme sahip epitoplara karşı antijenik stimülasyonlara paralel olarak immünglobulin genlerinin yoğun değişken bölgelerinde (hypervariable region) klonal düzeyde gen düzenlenmesini içeren somatik hipermutasyonlar sonrası kazanılan afinite olgunlaşması ile daha spesifik bağlanabilen nötralizan aktiviteye sahip antikorlardır.⁸² Dolayısıyla NAb'lar BAb'lardan farklı olarak IFN β molekülünün reseptörüne bağlanma bölgesindeki epitoplara daha güçlü bağlanma afinitesine ve moleküler paterne sahip antikorlar olmaları nedeniyle

IFN β 'nın reseptör fonksiyonları ile ilişkili hücre içi biyolojik aktivasyonunu ve tedavi etkinliğini nötralize etme kapasitesine sahiptirler (Şekil 1).⁷⁹ IFN β tedavisi sırasında oluşan özellikle yüksek titrede ve kalıcı NAb'ların, NAb negatif hasta gruplarına göre radyolojik olarak (MRG) lezyon yükünde artışa, klinik olarak relaps şiddeti, hızı ve oranında artışa, remisyon sürelerinde kısalmalara ve hastalığın özürüllük düzeyi ve progresyonunda da artışa yol açarak, IFN β 'nın tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkileyebildikleri gösterilmiştir.⁹⁻¹⁶

NAb'lar, IFN β tedavisi başlangıcından genellikle 9-18 ay sonra oluşmaktadır; bu süre NAb'ların IFN β 'ya bağlanabilme afinitelerinin oluşması için gerekli olup yüksek titre ve kalıcı özellikteki NAb oluşması için geçen süre, düşük titrede ve seronegatifleşme gözlenen NAb'lara göre daha uzundur.⁶⁹ Tedavi başlangıcı sonrası ilk 18 aylık dönemde sıklıkla IFN β 'ya karşı daha düşük afiniteli ve seronegatifleşme eğilimi daha yüksek antikörlerin oluşması nedeniyle tedavinin 18. ayından önce NAb'ların tedavi üzerindeki etkilerini değerlendirmenin uygun olmadığı belirtilmektedir.⁶ Ayrıca tedavinin ilk 24 ayında NAb oluşmayan hastalarda bundan sonraki tedavi sürecinde NAb oluşması beklenmez, bu tip olgular NAb negatif olarak kabul edildiğinden sonraki dönemlerde NAb testi yapılması önerilmez, ancak artan hastalık aktivitesi söz konusu olduğunda 24 ay sonrasında da NAb testinin yinelenmesi önerilmektedir.^{18,74}

ANTI-IFN β ANTİKORLARININ SEROPOZİTİFLİK ORANLARI

Anti-IFN β antikörlerinin seropozitiflik oranları proteinin yapısına, tedavi şemasına ve hastaya bağlı



ŞEKİL 1: BAB ve NAb'ların IFN β 'ya bağlanma paternleri (antijenik epitopa) farklıdır.⁷⁹

BAB ve NAb'lar IFN β 'ya bağlanma paternleri (antijenik epitopa) açısından farklılık gösterirler.

faktörlere, ayrıca bu amaçla tasarlanan çalışmalarda izlenen hastaların klinik özelliklerine ve kullanılan laboratuvar metotlarına bağlı olarak farklılıklar gösterebilmektedir.⁸³⁻⁸⁶ Öte yandan NAb'ların varlığını değerlendirmede kullanılan yaklaşımlar da seropozitiflik oranlarını etkilemektedir. Nitekim bazı araştırmacılar NAb pozitifliği kriteri olarak hastanın ardışık iki serum örneğinde NAb varlığını pozitiflik kriteri olarak kabul etmelerine karşın, bazıları ise tek bir serumda saptanan NAb pozitifliğini NAb varlığı için yeterli kabul etmektedirler.⁹ IFN β tedavisi alan MS'li hastalarda NAb seropozitifliği oranları kullanılan preparata bağlı olarak %2-47 arasında değişebilmektedir. Bu amaçla yapılan farklı çalışmalarda Betaferon için %28-47, Rebif 22 μ g ve 44 μ g için sırasıyla %12 ve %28, Avonex için ise %2-6 oranlarında NAb seropozitifliği bildirilmektedir.^{41,73,77,78,84,85,87}

NAB'LARDA SERONEGATİFLEŞME

Hastaların bir kısmında (%30) tedaviyi takiben ortalama iki-yedi yıl sonra tekrarlayan ardışık iki NAb testi ile negatif olduğu gösterilmek koşulu ile NAb'lar seronegatifleşebilmektedir.⁷⁴ Seronegatifleşme eğilimi daha çok IFN β -1b ile tedavi edilen hastalar ile tedavinin erken döneminde sentezlenen zayıf afiniteli, düşük ve orta titreli NAb'larda tedaviyi takiben gözlenebilmektedir.^{69,74} Rekombinant IFN β -1b preparatlarına karşı oluşan NAb'ların, IFN β -1a preparatlarına karşı oluşan NAb'lara göre daha erken seronegatifleşmesi veya düşük titrelerle dönüşme eğilimi, IFN β -1b'nin N-terminal bölgesinin metionin içermemesi dolayısıyla bu preparata karşı oluşan NAb'ların molekülün N terminal bölgesine daha düşük afinite ile bağlanmasıyla açıklanmaktadır.^{15,16,69,82} Ayrıca IFN β -1b'nin IFN β -1a'ya göre protein total yükünün 5,5-11 kat daha fazla olmasının da kaybolan immünolojik toleransın tekrar ve daha erken gelişmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir.^{69,74,75} Tedavinin özellikle ilk 6-12. ayında oluşan NAb'ların tedaviyi olumsuz yönde etkilememesi, epifenomen olarak adlandırılmakta bu paradoksal durum tedavinin başlangıcında oluşan düşük afiniteli NAb'ların IFN β 'nın reseptörüne bağlanmasını engellemekte yetersiz kalmaları ve immünolojik tolerans varlığı ile açıklanmaktadır.¹⁴⁻¹⁷

Seronegatif serostatüye sahip hastalarda NAb'ların olası olumsuz etkisinin gözlenmeyeceğinin bildirilmesine karşın, yüksek ve kalıcı NAb titreleri tespit edilen hastalarda tedavinin sonlandırılması sonrası yıllarca NAb pozitifliği devam edebilmektedir.^{62,74}

İN VİVO BİYOLOJİK AKTİVİTE VE ÖNEMİ

IFN β 'nın in vivo biyolojik aktivite düzeyi IFN uyarı/yanıt genlerinin [IFN-stimulated genes (ISG)] ekspresyon düzeylerinin ölçümü ile değerlendirilir. IFN'lerin antiviral, antiproliferatif ve immün düzenleyici fonksiyonlarından sorumlu olan β 2 mikroglobulin, neopterin, Viperin, 2'-5' oligoadenilat sentetaz (OAS), neopterin, "tetratricopeptide repeats1 (IFIT-1)", TRAIL ve miksovirus direnç proteinleri (MxA, MxB) gibi proteinlerin sentezinden sorumlu olan ISG'lerin transkripsiyon ve sonrası translasyonu amacıyla gerekli olan promotör aktivasyonu için IFN stimülasyonuna yanıt elementi [IFN stimulated response element (ISRE)] adı verilen spesifik DNA dizilerinin aktivasyonu gereklidir.^{25,53,88} ISRE'ler ise IFN'lerin reseptörleri ile ligasyonu sonucu oluşan hücre içi sinyal ileti mekanizmalarının harekete geçmesi ile oluşan sinyal ileti kompleksinin nükleusa translokasyonu yolu ile aktive olur.²⁵ Bu nedenle tip-1 IFN'lerin tüm biyolojik fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için öncelikle hücre yüzeyindeki kendilerine spesifik heterodimerik tip-1 IFN reseptörleri (IFNAR)'ne bağlanması ve aktivasyonu kritik öneme sahiptir.²⁷ MxA 75 kD ağırlığında kromozom 21q22.3'de lokalize Mx1 geni tarafından kodlanan viral enfeksiyonlara karşı doğal immün yanıtta rol olan önemli bir antiviral proteindir.²⁵ İnsanlardaki MxA protein ve MxA mRNA ekspresyon düzeyleri normal fizyolojik süreç dahilinde viral enfeksiyonlar haricinde düşük düzeyde ve stabil olup, tip1 IFN varlığında ise doza bağlı olarak insan mononükleer hücrelerdeki ekspresyon düzeyleri artış gösterir.^{53,88}

Yapılan birçok çalışmada, MxA'nın IFN β 'nın anti-IFN β antikorları ve nadiren diğer faktörlerle ilişkili reseptör aktivasyonunun engellenmesi sonucu gerçekleşen biyolojik aktivite kaybını en iyi yansıtan biyolojik tanı markeri olduğu gösterilmiştir.⁸⁹⁹⁶ Hastalardaki NAb varlığı ve titreleri ile biyolojik

aktivite düzeyini gösteren MxA mRNA düzeyleri arasında oldukça güçlü bir korelasyon olduğu, NAb titrelerindeki artışa bağlı olarak IFN β 'nın biyolojik aktivite düzeyini gösteren MxA mRNA ekspresyon düzeylerinde azalma ve/veya kayıp tespit edildiği gösterilmiştir.^{13,90,91,97-101} MxA ekspresyon düzeyleri ile hastaların atak oranları arasında da anlamlı bir korelasyon olduğu ayrıca yeni relaps riskinin belirlenmesinde NAb'lar ile karşılaştırıldığında prognostik değerinin kısmen daha iyi olduğu belirlenmiştir.^{89,97,102} Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise tedavi öncesi endojen IFN β sentez düzeyleri ile hastaların klinik aktiviteleri arasında önemli bir korelasyon olduğu belirtilmektedir.¹⁰³ IFN β sentezinde rol alan genlerdeki bireysel varyasyonların tedavi yanıtlarını etkilediği bu nedenle bazal düzeyde farmakogenetik farklılıkların tedavi öncesi tespitinin tedaviye uygun hastaların seçimi ve tedavi yanıtlarının daha objektif ve etkin bir şekilde değerlendirilmesi için önemli ve gerekli olduğu öne sürülmektedir.¹⁰³⁻¹⁰⁵

Özetle MxA mRNA düzeylerinin relaps varlığı, kontrast tutan lezyon sayısı, relaps oranı ve relaps hızı ile ilişkili olduğu ayrıca tedaviye yanıtız hastaların tespiti amacıyla tek başına tarama ve/veya tanı testi olarak da kullanılabilmesi belirtilmektedir.

LABORATUVAR TANI

MS'li hastaların IFN β 'ya karşı tedavi yanıt düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla kullanılan laboratuvar deneyleri, anti-IFN β antikorları ve IFN β 'nın in vivo biyolojik aktivitesinin belirlenmesine yönelik deneyler olarak gruplandırılabilir. Bu açıdan BAb deneyleri ile sentez edilen anti-IFN β antikorlarının varlığı ve titreleri, NAb deneyleri anti-IFN β antikorlarının nötralizasyon düzeyleri, gen ekspresyon deneyleriyle ise IFN β 'nın reseptör ilişkili in vivo biyolojik aktivite düzeyleri ölçülür.

ANTI-IFN β ANTİKOR DENEYLERİ

BAb'ların Laboratuvar Tanısı

Tüm anti-IFN β antikorları öncelikle BAb özelliği gösterdiğinden ve yüksek titrede BAb'ların olası nötralizan kapasitesi nedeniyle BAb deneyleri daha çok tarama ve konfirmasyon amacıyla kullanılabilir. RIA yöntemi, BAb'ların laboratuvar ta-

nısında analitik duyarlılığa en yüksek yöntem olarak kabul edilir.¹⁰⁶ Fakat bu yöntemin kullanım güçlükleri nedeniyle bu amaçla günümüzde daha çok solid fazlı immünometrik (ELISA, immünoblot) yöntemler tercih edilmektedir. BAB'ların tanısı amacıyla kullanılan ELISA yönteminin direkt ve antikorların yakalanması (capture, cEIA) şeklinde tanımlanan iki uygulaması mevcuttur. Direkt ELISA'da, antijen direkt olarak plağa bağlandığından kısmen konfirmasyonunda denatürasyon ve dağılma meydana gelmekte bu nedenle düşük afiniteli BAB'ların tanımlanmasında sorunlar yaşanabilmektedir. cELISA yönteminde antijenin konfirmasyonel ve linear yapısı daha stabil kalabildiğinden antikorlar antijene daha yüksek afinite ile bağlanabilmektedir. Bu nedenle cELISA yönteminin duyarlılığı indirekt ELISA'ya göre daha yüksek olmasına karşın, cELISA'da plağı kaplamak için gerekli olan monoklonal antikorların ticari olarak elde edilememesi bu yöntemin rutin laboratuvarlarda kullanımı sınırlamakta, direkt ELISA'nın ise ticari olarak ulaşılabilir ve standardizasyon imkânının olması bu yöntemin en azından rutin klinik laboratuvarlarda kullanımını daha uygun kılmaktadır.¹⁰⁷

RİPA ve Colmn Deneyleri:

Her iki yöntem deney düzeneğindeki radyoaktif işaretli IFNβ'ya karşı hasta serumlarındaki BAB'ların bir dedektör vasıtasıyla saptanarak kantitasyonu esasına dayanır.¹⁰⁶ Yöntemlerin radyoaktivite içermesi nedeniyle rutin laboratuvar uygulamaları sınırlıdır.

NAb'ların laboratuvar Tanısı

Anti-IFNβ antikorlarının nötralizasyon kapasitelerinin ölçülmesi amacıyla CPE, MxA protein indüksiyon ve lusiferaz raportör gen deneyleri kullanılabilir.

Sitopatik Etkinlik Deneyi (CPE)

CPE deneyinde anti-IFNβ antikorlarının nötralizasyon kapasiteleri, IFNβ'nın in vitro antiviral aktivitesinin ölçülmesi ile belirlenir. CPE deneyi, sitopatik etkinliğe sahip bir virüsün üretildiği hücre kültürü ortamına belirli oranlarda IFNβ ve hasta serumu eklenmesiyle, hasta serumlarındaki anti-

IFNβ antikorlarının IFNβ'nın reseptör ilişkili antiviral etkinliğini nötralizasyon kapasitesine paralel olarak virüsün artan sitopatik etkinliğinin kantite edilerek ölçülmesi esasına dayanır.^{79,107} Deneyde hasta serumlarında IFNβ'ya karşı oluşmuş NAb'ların varlığında IFNβ'nın antiviral etkinliği nötralize olmakta ve bu nötralizasyon derecesine paralel olarak virüsün üremesi ile hücrede oluşan sitopatik etkinliği artmaktadır. Sonuç olarak hücre kültürü ortamındaki virüsün sitopatik etkinlik derecesi hasta serumlarında IFNβ'ya karşı oluşmuş nötralizasyon antikor kapasitesi ile orantılı olarak tespit edilir. CPE deneylerinde tercihen ensefalomyokardit virüs (EMCV) ve A549 (human lung carcinoma cells) hücreleri kullanılmakta, ayrıca bu hücreler yerine "human Wistar Institute Susan Hayflick (WISH)" hücreleri ve Sindbis virüs ya da WISH hücreleri ile vesicular stomatitis virüs de kullanılabilir.¹⁰⁸ NAb titrelerinin hesaplanmasında Dünya Sağlık Örgütü önerileri doğrultusunda, IFNβ'nın virüsün sitopatik etkinliği üzerindeki %50 azalmayı 1 LU (Laboratory Unit) NAb cinsinden hesaplamaya imkân sağlayan Kawada formülü kullanılır.¹⁰⁷ Kantitasyon sonuçları LU cinsinden ifade edilmektedir. Genellikle 20 LU/mL ve üstündeki NAb titreleri pozitif titre olarak kabul edilir. Yöntemin en önemli avantajı duyarlılığının yüksek olması ve IFNβ'ya karşı kompleks hücresel cevapları değerlendirebilme imkânı sağlamasıdır.⁷⁹ CPE deneyi IFNβ'ya karşı oluşan NAb'ların tanısında altın standart olarak kabul edilmesine karşın deney için özel laboratuvar donanımı ve ekipman gerektirmesi, zaman alıcı olması, yoğun iş gücü gerektirmesi, laboratuvarlar arası standardizasyonunun zor ve potansiyel biyolojik zararlı etkileri nedeniyle rutin klinik laboratuvarlarda uygulanması sınırlıdır.^{106,107}

MxA Protein İndüksiyon Deneyi

Nötralizan antikorların kantitasyonu ve tanısı amacıyla kullanılan ikinci yöntem, MxA protein indüksiyon deneyidir. Yöntem IFNβ'nın reseptör aktivasyonuna paralel olarak indüklenen hücresel MxA proteininin varlığı ve miktarının hasta serumlarında ölçülmesi esasına dayanır.^{79,109} Bu nedenle hasta serumlarında ölçülen MxA protein düzeyleri anti-IFNβ antikorlarının nötralizasyon

kapasitesini yansıtır. Bu amaçla hasta serumları önce A549 hücreleri içeren ELISA plaklarında 12-24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonrası hücreler liziz edilerek MxA proteinin varlığı ve konsantrasyonu ELISA yöntemi ve Kawada formülü kullanılarak ölçülür.^{79,107} Yöntem son yıllarda hücrelerin lizizi sonucu açığa çıkan MxA'nın ölçülmesinde ELISA yerine hücrelerdeki MxA'nın mRNA düzeyinde ölçülmesine imkân veren gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) yöntemi ile modifiye edilerek de uygulanabilmektedir.¹⁰⁹ MxA protein indüksiyon deneyi oldukça duyarlı ve özgüldür. CPE deneyinden daha kısa sürede analiz imkânı sağlaması, daha az donanım ihtiyacı duyulması, virüs kullanımına gerek olmaması, CPE bazlı deneylere göre laboratuvarlar arası farklılıkların ve yalancı negatiflik oranlarının nispeten daha az olması gibi avantajları vardır.¹¹⁰⁻¹¹² Bununla birlikte MxA protein indüksiyon testlerinin hücre bazlı olması ve inkübasyon sonrası MxA proteinlerinin tespiti için ELISA metodu kullanıldığında, ticari olarak eldesi mümkün olmayan anti-human MxA antikorlarına ihtiyaç duyulması, RT-PCR yönteminin ise yine hücre bazlı ve pahalı olması nedeniyle rutin klinik laboratuvarlarda uygulamaları sınırlı olmaktadır.¹¹⁰⁻¹¹²

Lusiferaz Raportör Gen Deneyi

NAb'ların tespiti amacıyla CPE ve MxA protein indüksiyon deneylerine ek olarak yakın zamanda lusiferaz raportör gen deneyi geliştirilmiştir.^{110,111,113-115} Deney, IFN β 'nın anti-IFN β antikorları ile ilişkili reseptör aktivasyon düzeyinin ölçülmesi amacıyla ISG'lerin promotör aktivitesinin ölçülmesi esasına dayanır. ISG'lerin promotör aktivitesi ise ISG'lerden birine ait promotörün raportör gen olan lusiferaz için promotör olarak kullanılması üzerinden belirlenir. Bu amaçla deney düzeneği öncelikle lusiferaz geni ve onun transkripsiyonel kontrolü amacıyla tip IFN'lara spesifik erken yanıt genlerinden 6-16'ya ait promotörü ile ISRE'nin bir vektöre klonlanarak insan fibrosarkoma HT 1080 hücre hattına (klonHL116) transfeksiyonu içerecek şekilde hazırlanır.^{116,117}

Bir sonraki aşamada yukarıda belirtilen deney düzeneğine IFN β ile inkübe edilmiş hasta serum-

ları ve lusiferaz substratı olarak lusiferin eklenerek oluşan kemiluminesens reaksiyonunun yoğunluğu luminometre ile ölçülür. Dolayısıyla ölçülen reaksiyonun şiddeti hasta serumlarında nötralizan antikorların varlığı ve titresine paralel olarak oluşan ISG'ye ait promotör aktivitesini yansıtır. Bu deneyde de antikor titrelerinin hesaplanması amacıyla CPE deneyinde olduğu gibi, Kawada formülü kullanılır. Deneyin CPE deneyi ile karşılaştırıldığında duyarlılığın ve özgülüğünün %100 olması daha kısa sürelerde sonuçlanması ve özellikle de ISG'lerin sentezinin transkripsiyonel düzeyden ziyade promotör aktivite düzeyinde ölçülmesine imkân vermesi avantajlarını oluşturmaktadır.¹¹⁸

Gen Ekspresyon Deneyleri (MxA mRNA Gen Ekspresyonu)

Gen ekspresyon deneyleri, IFN β tedavisi uygulanan MS'li hastaların periferik kan örneklerinde IFN β enjeksiyonu sonrası IFN β 'ya spesifik biyolojik yanıt olarak indüklenen, MxA geninin ekspresyon (mRNA) düzeyinin hasta kanlarında (in vivo) moleküler biyolojik bir yöntem kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır.^{90,95,102} Deney kısaca; mRNA'nın stabilizasyonu ve hücrelerin lizizi amacıyla özel tüplere alınan hasta kan örneklerinden izole edilen mRNA'nın revers transkriptaz aracılığıyla cDNA'ya çevrilerek RT-PZR yöntemi ile analiz edilmesini kapsar.¹¹¹ RT-PZR uygulamalarında herhangi bir genin ekspresyon düzeyinin ölçülmesi amacıyla rölatif kantitasyon yöntemi kullanılabilir.¹¹⁹ Yöntemin standart eğri ve komparatif $C_T2^{\Delta\Delta CT}$ metodu olmak üzere iki farklı yaklaşımı bulunmaktadır. Rölatif standart eğri metodu plazmide kodlanmış ekspresyon düzeyi bilinen bir eksternal standart yardımı ile oluşturulan eğri baz alınarak, bilinmeyen örnekteki hedef geninin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak ölçülmesi amacıyla kullanılır.¹²⁰ Komparatif $C_T2^{\Delta\Delta CT}$ metodunda ise hedef genin ekspresyon düzeyi ile reaksiyonun normalizasyonu sağlamak amacıyla kullanılan referans (internal, endojen standart) genin ekspresyon düzeylerinin matematiksel bir formül yardımı ile karşılaştırılması esasına dayanır.^{119,120}

Bu yöntemin en büyük avantajı, hastada IFN β tedavisine karşı in vivo biyolojik yanıtları tanımla-

yabilmesi ve IFN β enjeksiyonu öncesi ve sonrası MxA mRNA gen ekspresyon düzeyindeki büyük farklılıkları nispeten basit düzeyde değerlendirebilme imkânı sağlayabilmektedir.^{92,96} RT-PZR yönteminin uygulanması için özel laboratuvara ihtiyaç duyulmaması, teknik alt yapı ve ekipman ihtiyacının daha az olması, ticari olarak elde edilebilirliği, uygulamasının daha kolay, sonuçların analizinin daha kısa sürede yapılabilmesi ve laboratuvarlar arası standardizasyonun daha kolay sağlanabilir olması nedeniyle de klinik rutin laboratuvarlar için kullanımını daha uygun kılmaktadır. MxA mRNA ölçümleri IFN β ve reseptörü arasındaki ilişkiyi göstermekte daha fazla analitik duyarlılığa sahip olmasına karşın son IFN β enjeksiyonu ile hastalara ait kan örneklerinin toplanması arasındaki zamanın kısıtlı olması ve NAb'lar ile kıyaslandığında hastaların özellikle klinik bulguları üzerine olan etkilerine ilişkin verilerin henüz yeterli düzeyde doküman edilmemiş olması ise yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır.⁷⁸ MS'li hastalarda IFN β enjeksiyonu sonrası MxA mRNA düzeyleri kullanılan IFN β preparatlarına bağlı olarak, üç ile 15 saat arasında artış göstermekte, 15. saatten sonra tekrar düşmeye başlamaktadır. Bu nedenle MxA mRNA gen ekspresyonu analizi için hasta kanlarının son IFN β enjeksiyonunu takiben en az dokuz, en geç 15 saat, ortalama 12 saat içinde alınması gerekmektedir.

Laboratuvar İzlem Stratejisi

MS'li hastaların IFN β 'ya karşı tedavi yanıt düzeylerinin değerlendirilmesi amacıyla en sık kullanılan biyolojik markırlar BAB, NAb ve MxA olmasına karşın, anti-IFN β antikorları ve bu antikorlar ile ilişkili biyoaktivite kaybının tespitinde kullanılacak laboratuvar yöntemleri ve eşik değerler ile izlem stratejisi konusunda henüz net bir uzlaşma mevcut değildir. MS'de anti-IFN β antikorları konsorsiyumu [The Neutralizing Antibodies on Interferon Beta in Multiple Sclerosis] (NABINMS)] tarafından bu amaçla önerilen laboratuvar izlem stratejisi, kullanılacak yöntem ve eşik değerler ile laboratuvar verilerinin klinik uyarlanımına ilişkin pratik algoritma Tablo 3 ve 4'te gösterilmiştir. Özetle, NABINMS, IFN β tedavisinin birinci-ikinci

yılında hastaların NAb ve/veya MxA mRNA düzeylerinin belirlenmesini, NAb ve/ya biyoaktivite kaybı tespit edilen hastalarda testlerin üç-altı ay aralarla tekrar edilmesini, özellikle düşük ve orta titreli NAb'ların varlığında ise NAb testlerine ek olarak MxA mRNA düzeylerinin de ölçülmesini önermektedir. NAb'ların tespiti amacıyla ise yukarıda belirtildiği üzere farklı laboratuvar yöntemleri ve izlem stratejileri tercihen kullanılabilir. Bu açıdan lusiferaz raportör gen deneyinin mevcut ve yakın gelecekte yukarıda belirtilen tanısal avantajlarından dolayı tedaviye yanıtız hastalardaki NAb'ların tespiti amacıyla referans test olarak tanımlanacağı ve kullanılacağı anlaşılmaktadır.^{110,111}

ANTI-IFN β ANTİKORLARININ KLİNİK ÖNEMİ

MS'li hastalarda IFN β tedavisi sırasında oluşan anti-IFN β antikorlarının klinik önemini belirlemek amacıyla yapılan çalışmalarda özellikle yüksek titrede ve kalıcı nitelikteki NAb'ların; NAb negatif hasta gruplarına göre, radyolojik olarak lezyon yükünde, klinik olarak relaps şiddeti, hızı ve oranında artışa, remisyon sürelerinde kısalmalara, tartışmalı olmakla birlikte hastalığın özürülülük düzeyi ve progresyonunda da artışa neden olarak IFN β 'nın in vivo biyolojik etkinliği ve paralelinde tedavi etkinliğinin azalmasına ve/veya tamamen yok olmasına yol açabildikleri gösterilmiştir.^{9,12,14-16,77,89,121-123} NAb'ların hastaların tedavi etkinliği üzerindeki olumsuz etkileri dışında immün kompleksler ile ilişkili endojen homolog proteinler ile endojen IFN β arasındaki olası çapraz reaksiyonlar sonucu anafilaksi ve serum hastalıkları gibi yaşamı tehdit edebilen immün reaksiyonlara da neden olabildiği ayrıca klinisyenlerin tedavi yanıtlarını daha objektif ve daha etkin bir şekilde değerlendi-

TABLO 3: NABINMS konsorsiyumu NAb pozitifliği tanımlama kriterleri.⁷

NAb Titresi	rIFN β Preparatı	
	IFN β -1a	IFN β -1b
Negatif	<20 LU	<20 LU
Düşük/orta	20-100 LU	20-400 LU
Yüksek	>100 LU	>400 LU

TABLO 4: NAb titrelerinin klinik uyarlanımına ilişkin algoritma.⁷

	İyi klinik seyir ^a	Orta düzeyli hastalık aktivitesi ^b	Kötü klinik seyir ^c
Negatif NAb titresi			
Laboratuvar Öneri	On iki ay sonra tekrar et	On iki ay sonra tekrar et	Tekrarlama
Tedavi öneri	Değiştirme	Mevcut tedaviyi değerlendirerek sürdür*	Tedaviyi değiştir
Düşük NAb titresi			
Laboratuvar Öneri	Üç-altı ay sonra tekrar et, eğer persistan ise MxA düzeyini değerlendir	Üç-altı ay sonra tekrar et, eğer persistan ise MxA düzeyini değerlendir	Tekrar etme, ek bilgi amacıyla MxA düzeyi değerlendirilebilir
Tedavi öneri	Eğer MxA biyoaktivitesi yok ise, IFN β harici tedavileri değerlendir	Eğer MxA biyoaktivitesi yok ise, IFN β harici tedavileri değerlendir	Tedaviyi değiştir
Yüksek NAb titresi			
Laboratuvar Öneri	Üç-altı ay aralıkla tekrar et	Üç-altı ay aralıkla tekrar et	Tekrar etme
Tedavi öneri	Eğer MxA biyoaktivitesi yok ise, IFN β harici tedavileri değerlendir	Eğer MxA biyoaktivitesi yok ise, IFN β harici tedavileri değerlendir	Tedaviyi değiştir

* Tedavi değiştirme kararı hastanın radyolojik ve klinik bulguları baz alınarak değerlendirilir.

^aİyi klinik seyir; relaps yok ve MR aktivitesi sınırlı veya yok (kontrast tutan lezyon ve veya yeni T2 lezyonu), ^borta düzeyli hastalık aktivitesi; Tedavi sırasında bir relaps, MR aktivitesi sınırlı veya yok, ^ckötü klinik seyir; bir veya daha fazla relaps ve yoğun MR aktivitesi.

rebilmeleri için hastaların NAb serolojileri hakkında bilgi sahibi olmaları gerektiği belirtilmektedir.^{7,17,62,78} Bu nedenle MS'li hastaların IFN β tedavisi süresince oluşan anti-IFN β antikörlerinin ve/veya in vivo biyolojik aktivite düzeylerinin belirlenmesini içeren laboratuvar yöntemleri ile tanı ve izleminin yararlı ve gerekli olduğu nihayetinde NAb pozitifliği saptanan hastalarda IFN β tedavisi dışında yeni bir tedavinin düzenlenmesi gerektiği öne sürülmektedir.^{6,7,17-19,78,11,124}

Buna karşın NAb'ların hastaların IFN β tedavisine karşı klinik yanıtları üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları ve öngürüleri, çalışan hasta grubunun klinik özelliklerine, bu amaçla karşılaştırılacak radyolojik ve klinik verilere, kullanılan IFN β preparatına, çalışmanın bilimsel dizaynına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bu açıdan konunun Amerikalı ve Avrupalı tarafları arasında MS'li hastalarda IFN β tedavisi sırasında oluşan NAb ve/veya biyolojik aktivite kaybına ilişkin laboratuvar verilerinin klinik uyarlanımına ilişkin konularda henüz tam bir uzlaşma mevcut değildir. Her iki yaklaşımda IFN β tedavisi sırasında anti-IFN β antikörlerinin oluştuğu, i.m. IFN β -1a'ya karşı diğer preparatlara göre NAb seropozitifliği oranının daha az olduğuna dair genel kabule karşın özellikle yüksek titrede ve kalıcı nitelikteki NAb'ların ise IFN β tedavisinin radyolojik ve klinik etkinliğini olumsuz yönde et-

kilemesinden ziyade azaltabileceği yönünde kısmi ortak görüşe sahiptir.^{18,20} Dolayısıyla NAb ve/veya biyoaktivite kaybı varlığında IFN β tedavisinin sonlandırılarak değiştirilmesi yönündeki yaklaşımı sürekli destekler nitelikteki bilimsel ve klinik verilerin henüz tam ve yeterli düzeyde olmadığı ileri sürülmektedir.²⁰⁻²³ Eleştiriler ağırlıklı olarak bu amaçla yapılan çalışmaların bilimsel kanıt düzeylerinin daha çok sınıf I ve II düzeyinde olması (istatistiksel gücünün zayıflığı), NAb'ların ve/veya biyolojik aktivite düzeylerinin tespitinde kullanılan laboratuvar metotlarının hangi hastalarda, ne zaman, hangi sıklıkla yapılacağı, maliyeti ve standardizasyonları ile laboratuvar verilerinin pozitif eşik değerleri ve tedavi yanıtlarına dair etkilerini değerlendirmek için seçilecek radyolojik özellikle de klinik parametre konusunda henüz uluslararası bir uzlaşmanın olmaması ve nihayet NAb'ların kötü klinik seyir üzerindeki etkinliğinin açık olmaması yönünde yoğunlaşmaktadır.²⁰⁻²³ Henüz IFN β 'nın MS'de tedavi yararından sorumlu gen ve proteinlerin bilinmemesi yanı sıra IFN β 'nın reseptör ligand etkileşiminin tedavi etkinliği üzerindeki rolü ve mekanizmalarının da henüz açık olmadığı ayrıca bu amaçla kullanılan biyolojik belirteç ve yöntemlerin (CPE, MxA mRNA ekspresyonu ve MxA induksiyonu) hiçbirinin uluslararası bir validasyonu ve herkes tarafından kabul edilmiş bir onayı da mevcut olmadığından IFN β 'nın tedavi etkinliği de-

ğ erlendirilmesindeki rollerinin tartışmalı olduğu dolayısıyla laboratuvar verilerinin tek başına tedavinin klinik etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla uyarlanmasının zor olduğu yönünde eleştirel yaklaşımlar da vardır. Bu nedenle hastalarda NAb ve/veya biyolojik aktivite kaybı tespit edildiğinde tedavinin yeniden düzenlenip düzenlenmeyeceği bilimsel ve klinik düzeyde tartışılmaya devam etmektedir

Yukarıda belirtilen eleştiriler doğrultusunda anti-IFN β antikorları ve biyolojik aktivite düzeylerinin belirlenmesini içeren laboratuvar izlem stratejisi, standardizasyonu ile laboratuvar verilerinin klinik uyarlanımına ilişkin uluslararası algoritmaların ve yönergelerin oluşturması amacıyla, Avrupa 6. Çerçeve Programı Özel Hedefli Araştırma Projeleri kapsamında, NABINMS kurulmuştur. NABINMS konsorsiyumunun farklı IFN β preparatlarına ilişkin NAb pozitifliği tanımlama kriterleri ile laboratuvar izlem stratejisi ve laboratuvar verilerinin hastaların klinik statülerine göre klinik uyarlanımına ilişkin pratik algoritma önerileri Tablo 3 ve 4'te belirtilmiştir.⁷

Anti-IFN β antikorları (BAb ve NAb) MxA protein ve MxA mRNA düzeylerinin IFN β 'nın tedavi etkinliği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi ve değerlendirilmesi amacıyla hastaların klinik [yıllık ortalama relaps oranları, ilk relaps için geçen süre, genişletilmiş özürülük durum skalası (EDSS skorları)] ve radyolojik ölçüm (yeni T2 lezyon sayısı, T2 lezyon volümü ve Gadolinum (Gd) tutan lezyon artışı) verileri baz alınmaktadır.⁷⁸ Buna karşın NAb'ların yeni T2 lezyon sayısı T2 lezyon volümü ve Gd tutan lezyon artışı gibi radyolojik ölçüm sonuçlarına ilişkin olumsuz etkisi daha açık, tutarlı ve ikna edici olmasına karşın, atak oranı, relaps aktivitesi ve fiziksel özürülük gibi klinik bulgular üzerindeki potansiyel etkisine ilişkin çelişkili ve tutarsız veriler içerdiği, ek olarak yüksek titre ve kalıcı serolojik özellik gösteren NAb'ların, IFN β 'nın indüklediği MxA ekspresyon düzeylerinde azalmayı predikte edebilmesine karşın, klinik ve progresyon üzerine özellikle de uzun süreli olumsuz etkinliğinin gösterilmesine dair verilerin açık ve tutarlı olmadığı öne sürülmektedir.²¹ Ayrıca IFN β 'nın EDSS üzerindeki etkinliğinin çok

açık olmaması ek olarak EDSS ölçümlerinin metrik, kısmen subjektif ve klinik değişimi tanımlama sürecinin yavaş olması nedeniyle de NAb'ların EDSS skoru üzerinden klinik etkisinin tam olarak değerlendirilebilmesi zor olmaktadır.^{7,80}

Klinik ve radyolojik bulgular üzerinden saptanan bu belirgin ayrışmanın nedenine ilişkin olarak MRG'nin gerek hastalık aktivitesinin belirlenmesindeki prognostik değerinin gerekse diğer klinik ölçümlerden daha objektif ve daha belirgin ölçümleme imkânı sağlaması nedeniyle istatistiksel gücünün daha yüksek olması dolayısıyla NAb'ların olumsuz etkisini daha kolay ve hızlı tespit edebilmesi eğer daha büyük hasta grupları ve daha uzun süreleri kapsayan çalışmalar tasarlanır ise NAb'ların olumsuz etkisinin hastaların klinik ölçümleri üzerinde de gösterileceği belirtilmiştir.¹²⁵ Buna karşın büyük hasta gruplarını içeren, Kuzey Amerika ve Avrupa'dan kötü klinik seyir, Avustralya'dan ise rutin tanı amacıyla NAb serolojisi belirlenen yaklaşık 7000 hastayı kapsayan bir çalışmada, NAb'lar ile kötü klinik seyir arasında herhangi bir ilişki saptanmadığı, benzer şekilde Rot ve ark. tarafından, IFN β tedavisi alan %76'sı rutin, %14'ü kötü klinik seyir ve %10'u ise diğer sebeplerden dolayı NAb istemi yapılan yaklaşık 3000 MS'li hastayı kapsayan diğer bir çalışmada da, hastaların %31'inde NAb seropozitifliği, %17'sinde ise MxA mRNA kaybı tespit etmelerine karşın kötü klinik seyir ve rutin tarama amacıyla test istenen bu iki grup arasında NAb ve/veya biyoaktivite kaybı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği gösterilmiştir.^{19,23,126}

Fakat her iki çalışmanın da bilimsel metodolojisinden kaynaklı sınırlamalar nedeniyle bilimsel kanıt düzeyinin düşük olduğu dolayısıyla kesin kanıt içermediğine dair eleştiriler göz önüne alınarak "The Betaseron Efficacy Yielding Outcomes of a New Dose (BEYOND)" tarafından; NAb'ların tedavi üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve istatistiksel gücünün de yüksek olması amacıyla, 26 ülke, 198 merkezde, 2:2:1 oranında sırasıyla 500 ve 250 μ g sc IFN β -1b ile 20 mg sc glatiramer asetat (GA) tedavisi alan 2244 RRMS'li hastanın 3,5 yıl süresince izlendiği, NAb'ların tespiti amacıyla MxA indüksiyon testinin kullanıldığı, prospektif

randomize kontrollü olarak planlanan çalışmada, tedavi süresince NAb pozitif ve negatifliği saptanan hastalar arasında, ilk relaps için geçen süre, yıllık relaps oranları yeni relaps riski ve EDSS skorunu içeren içeren klinik ölçümler üzerinde NAb'ların istatistiksel olarak anlamlı oranda olumsuz bir etkisinin tespit edilememesine karşın, özellikle yüksek titre NAb varlığına paralel olarak hastaların yeni T2 lezyon sayısı artışı ve T2 lezyon volümü değişikliği gibi radyolojik ölçümleri üzerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda olumsuz etkisinin olduğu tespit edilmiştir.²¹ Bununla birlikte çalışmada yalnızca IFN β -1a 500 μ g ile tedavi edilen hastalarda özellikle yüksek titre NAb'ların, NAb negatiflere oranla ilk relaps için geçen süre (p: 0,002) ile EDSS skoru üzerine (p: 0,037) istatistiksel olarak anlamlı oranda olumsuz etkisinin tespit edildiği gösterilmesine karşın, bu veriler Goodin ve ark. tarafından NAb'ların hastaların klinik bulguları üzerine tutarlı ve ikna edici olumsuz etkisini açıklamakta yetersiz olduğu yönünde yorumlanmıştır.²¹

Goodin ve ark. BEYOND çalışmasında ulaşılan bulguların, IFN β -1b'ye karşı oluşan NAb'ların klinik ölçüm sonuçları üzerine tutarlı bir etkisinin gösterilemediği buna karşın radyolojik ölçümler üzerine olan etkisinin ise açık ve net bir şekilde gösterildiği beş yıllık BENEFIT çalışması ile Reder ve ark., tarafından IFN β -1b tedavisinin uzun dönemli etki ve güvenilirliğinin araştırılması amacıyla 16 yılı kapsayan, NAb pozitifliğinin özellikle beş-sekiz yıl sonra %76 oranında seronegatifleştiği ve RRMS'li hastalarda IFN β -1b tedavisinin klinik yararlanım ve güvenilirliği yanında NAb'ların uzun dönemde hastaların klinik ve MRG sonuçları üzerine olumsuz etkisinin olmadığına dair ulaştığı verileri destekler nitelikte olduğunu ifade etmiştir.^{127,128} Goodin ve ark., BEYOND çalışmasında elde edilen klinik ve radyolojik ölçümler arasındaki farklılık ile karakterize bu durumu, *klinik-radyolojik paradoks* olarak nitelendirerek, MxA ve NAb'lar ile IFN β -1b'nin tedavi etkinliği arasında oldukça karmaşık bir ilişki olduğunu öne sürmelerine karşın, klinik radyolojik ölçümler arasındaki bu farklılığın sebebinin açık olmadığını, her ne kadar bu durum pratikte sessiz beyin lezyonlarının varlığı ile açıklanabilir olmasına karşın yapılan birçok çalışmada MRG ve relaps

oranı arasında bir korelasyon olduğu gösterildiğinden bu ayrışmanın nedenine dair bir açıklamanın spekülatif olarak değerlendirilebileceğini belirtmişlerdir.²¹ Nihayetinde IFN β 'nın tedavi etkinliği üzerine olumlu etkilerinin uzun döneme yayıldığı, hastaların büyük bir kısmında NAb varlığına rağmen, IFN β 'nın tedavi etkinliğinin klinik ve radyolojik bulgular üzerinden gözlemlenebildiği ayrıca hastaların büyük bir kısmında NAb'ların zaman içerisinde seronegatifleştiği, hastaların uzun dönemdeki fiziksel ve kognitif bulguları üzerinde NAb pozitifliği ve negatifliği arasında gözlemlenen bir ilişki olmadığı, bu nedenle hastaların kısa dönem tedavi kararında tek başına CPE ve/veya MxA biyomarkırı ile tanımlanan NAb pozitifliğinin baz alınmasından ziyade hastalık aktivitesinin değerlendirilmesi gerektiği, sonuç olarak IFN β ile ilgili tedavi kararında NAb statüsüne bakılmaksızın klinik seyri iyi olan hastalarda tedavinin devamı, buna karşın klinik seyri kötü olan hastalarda ise benzer şekilde hastanın NAb statüsüne bakılmaksızın alternatif tedavilerin değerlendirilmesi gerektiği öne sürülmüştür.²¹

Sørensen ise BEYOND çalışmasında NAb'ların sadece MRG bulguları üzerine olumsuz etkisinin gösterilmesine karşın klinik bulgular üzerine tutarlı etkisinin gösterilememesine ilişkin birincil sebebin, NAb'ların hastalık aktivitesinin yalnızca küçük bir bölümünden sorumlu olması ile açıklanabileceğini keza, IFN β 'nın relapslar üzerinde hastaların sadece yaklaşık %30'unda olumlu etkinliğe sahip olduğu ayrıca im IFN β -1a ile tedavi edilen hastaların %5'inden daha azında NAb geliştiği göz önüne alındığında bu hastalardaki NAb'ların relapsların sadece küçük bir kısmından sorumlu olduğu nihayetinde hastaların çoğunluğunda hastalık aktivitesinin tedaviden bağımsız olarak hastalığın doğası gereği kendiliğinden gelişen varyasyonlardan kaynakladığı, diğer bir majör sebep ise büyük sayılarda hasta içeren çalışmaların alt gruplara ayrıştırılması sonucu istatistiksel gücünün kaybolabildiği ve nihayetinde tip II hata olasılığının güçlendiği dolayısıyla klinik sonuçlar üzerinde NAb'ların tutarlı etkisinin gösterilemediği BEYOND çalışmasında da yalnızca sc IFN β -1b'ye 500 μ g tedavisi alan hastalarda bu etkinin gösterilip sc IFN β -1b'ye 250 μ g alanlarda gösteri-

lememesinin istatistiksel olarak tip II hata ile açıklanabilir olduğunu belirtmektedir.¹²⁹ Bu açıdan yüksek titre ve kalıcı nitelikteki NAb'ların tam biyoaktivite kaybına ve tedavi yanıtınlığına neden olmasına karşın düşük titreli NAb'ların varlığında ise IFN β 'nın biyoaktivitesinin kısmen ya da tamamen korunabildiği, bu hastalarda IFN β 'nın tedavi etkinliğinin mevcut olduğu ayrıca ilk 6-12 ay içinde oluşan düşük afiniteli NAb'ların IFN β tedavisi üzerinde olumsuz etkisinin olmadığı ve özellikle IFN β -1b ile tedavi edilen hastaların %40'ında NAb'ların ortalama dört yıl içinde seronegatifleştiği sonuç olarak BEYOND çalışmasında olduğu gibi, NAb pozitifliği tanımlama kriteri olarak bir kez pozitif ile genelde pozitiflik prensibinin IFN β -1b ile tedavi edilen hastalarda oluşan NAb'ların etkilerini değerlendirmek için uygun olmadığı ayrıca IFN β 'nın MRG, relaps oranı ve EDSS skorundaki progresyon üzerinde farklı etkileri dikkate alındığında bu bulguların paradokstan ziyade makul olarak değerlendirilmesi gerektiği belirtilmektedir.¹²⁹ BEYOND çalışmasında, NAb'ların radyolojik ve klinik ölçüm sonuçları üzerindeki farklı etkisinin paradoks olarak nitelendirildiği buna karşın IFN β 'nın MRG üzerindeki daha belirgin, relapslar üzerinde daha az belirgin etkisi ile hastalık progresyonu üzerinde etkisinin açık olmadığına dair çalışmalarda hiçbir zaman ilacın klinik bulgular üzerine etkisiz olduğuna dair bir iddiada bulunulmadığı diğer bir deyişle zayıf tedavi etkinliğinin azalması ve/veya kaybolmasının gösterilmesinin zor olduğu yönünde eleştirel yaklaşımda bulunmaktadır.¹²⁹

Özetle bilimsel literatür genel olarak irdelendiğinde, özellikle yüksek titre ve kalıcı nitelikteki NAb'ların in vivo biyoaktivite kaybına neden olarak IFN β 'nın tedavi etkinliğini olumsuz yönde etkilediği dolayısıyla tedavinin sonlandırılarak alternatif tedavi seçenekleri ile yeniden düzenlenmesi gerektiğini içeren hipotezi destekleyen bilimsel verilerin sayısının daha fazla olması yanında bilimsel kanıt düzeyinin de artma eğiliminde olduğu anlaşılmaktadır.^{124,130}

SONUÇ

MS'nin patogenezi gereği gerek hastaların bireysel bazda klinik seyrinin IFN β tedavisinden bağımsız olarak şekillenebilmesi tedavi yanıtlarına rağmen hastalarda klinik aktivite ve progresyon gözlenmesi gerekse IFN β 'nın kontrol gruba göre hastalığın patolojik süreçlerinin yalnız bir bölümü ve bir grup üzerinde sınırlı olumlu etkisi ve IFN β 'nın her bir hastadaki olası immünmodülatör etkinliğinin ve tedavi yanıt düzeylerinin farklı olabilmesi, hastaların IFN β 'ya karşı tedavi yanıt düzeylerinin belirlenmesini ve tedavinin her yönüyle her zaman ve her hastada klinik yararının net olarak değerlendirilebilmesini zorlaştırmaktadır. Tedavi öncesi her bir hastada endojen IFN β 'nın moleküler bazda MS immünpatogenezindeki rolünün aydınlatılması önemli görünmektedir. Bu nedenle IFN β dâhil tüm protein bazlı tedavilerde asıl hedefin, tedavi öncesi dönemde bu tedavilerden optimal yarar sağlayacak hastaların bireysel bazda seçimine imkân veren genomik esaslı laboratuvar tanı yöntemlerinin uygulanmasına yönelik stratejilerin geliştirilmesi daha efektif bir yaklaşım olarak görünmektedir. Ayrıca klinisyenler için biyoterapötik tedavilerine yanıtız hastaların belirlenmesi ve bu hastalarda efektif tedavi planlamaları için uluslararası düzeyde kılavuzların yayınlanmasına ihtiyaç duyulduğu anlaşılmaktadır.

Sonuç olarak, IFN β tedavisi alan MS'li hastalarda anti-IFN β antikorları ve/veya MxA mRNA'na düzeylerine ait laboratuvar verilerinin hastaların tedavi yanıtlarının her zaman ve her yönüyle değerlendirilmesinde tek başına sınırlı bir prediktif değere sahip görünmesine karşın, gerek olası komplikasyonların engellenmesi gerekse klinisyenler için hastaların bireysel bazda tedavi ve klinik yanıtlarının daha objektif ve daha etkin bir şekilde değerlendirilmesi ile *özellikle alternatif tedavilerin daha erken planlanmasında* hastanın diğer tüm klinik ve paraklinik verileri ile birlikte kullanıldığında kritik öneme sahip yardımcı biyomarkırlar olarak rutin klinik pratikte analiz edilmesinin yararlı ve gerekli olduğu anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Vukusic S, Confavreux C. The natural history of multiple sclerosis. In: Cook SD, ed. *Handbook of Multiple Sclerosis*. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 2001. p.433-7.
2. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47(6):707-17.
3. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
4. Buljevac D, Flach HZ, Hop WC, Hijdra D, Laman JD, Savelkoul HF, et al. Prospective study on the relationship between infections and multiple sclerosis exacerbations. *Brain* 2002;125(Pt 5):952-60.
5. Milo R, Kahana E. Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 2010;9(5):A387-94.
6. Sorensen PS. Neutralizing antibodies against interferon-beta. *Ther Adv Neurol Disord* 2008;1(2):125-41.
7. Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010;9(7):740-50.
8. Rudick RA, Polman CH. Current approaches to the identification and management of breakthrough disease in patients with multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009;8(6):545-59.
9. Malucchi S, Sala A, Gilli F, Bottero R, Di Sapio A, Capobianco M, et al. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of beta1FN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2004;62(11):2031-7.
10. Namaka M, Pollitt-Smith M, Gupta A, Klowak M, Vasconcelos M, Turcotte D, et al. The clinical importance of neutralizing antibodies in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Curr Med Res Opin* 2006;22(2):223-39.
11. Pachner AR, Cadavid D, Wolansky L, Skurnick J. Effect of anti-IFN(beta) antibodies on MRI lesions of MS patients in the BECOME study. *Neurology* 2009;73(18):1485-92.
12. PRISMS Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. PRISMS-4: Long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2001;56(12):1628-36.
13. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Capobianco M, Malucchi S, Milano E, et al. Persistent neutralizing antibodies abolish the interferon beta bioavailability in MS patients. *Neurology* 2003;60(4):634-9.
14. Kappos L, Clanet M, Sandberg-Wollheim M, Radue EW, Hartung HP, Hohlfeld R, et al.; Interferon Beta-1a IM Dose-Comparison Study Investigators. Neutralizing antibodies and efficacy of interferon beta-1a: a 4-year controlled study. *Neurology* 2005;65(1):40-7.
15. Gneiss C, Reindl M, Berger T, Lutterotti A, Ehling R, Egg R, et al. Epitope specificity of neutralizing antibodies against IFN-beta. *J Interferon Cytokine Res* 2004;24(5):283-90.
16. Francis GS, Rice GP, Alsup JC; PRISMS Study Group. Interferon beta-1a in MS: results following development of neutralizing antibodies in PRISMS. *Neurology* 2005;65(1):48-55.
17. Bertolotto A. Implications of neutralising antibodies on therapeutic efficacy. *J Neurol Sci* 2009;277(Suppl 1):S29-32.
18. Sørensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J, et al.; EFNS Task Force on Anti-IFN-beta Antibodies in Multiple Sclerosis. Guidelines on use of anti-IFN-beta antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-beta antibodies in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2005;12(11):817-27.
19. Farrell R, Kapoor R, Leary S, Rudge P, Thompson AJ, Miller DH, et al. Guidelines on use of anti-interferon-beta antibody measurements side effects and delayed impact on efficacy of interferon-beta. *Mult Scler* 2008;14(2): 212-8.
20. Goodin DS, Frohman EM, Hurwitz B, O'Connor PW, Oger JJ, Reder AT, et al. Neutralizing antibodies to interferon beta: assessment of their clinical and radiographic impact: an evidence report: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2007;68(13):977-84.
21. Goodin DS, Hartung HP, O'Connor P, Filippi M, Arnason B, Comi G, et al. Neutralizing antibodies to interferon beta-1b multiple sclerosis: a clinico-radiographic paradox in the BEYOND trial. *Mult Scler* 2012;18(2):181-95.
22. Burks JS, Noronha A. Guidelines on use of anti-IFN-B antibody measurements in multiple sclerosis: report of an EFNS Task Force on IFN-B antibodies in multiple sclerosis *Eur J Neurol* 2007;14(6):e8-9; author reply e10-1.
23. Goodin DS, Hurwitz B, Noronha A. Neutralizing antibodies to interferon beta-1b are not associated with disease worsening in multiple sclerosis. *J Int Med Res* 2007;35(2):173-87.
24. Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1957;147(927):258-67.
25. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008;89(Pt 1):1-47.
26. Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie* 2007;89(6-7):713-8.
27. Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH. Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 2005;23:307-36.
28. Friedman RM. Clinical uses of interferons. *Br J Clin Pharmacol* 2008;65(2):158-62.
29. Pestka S, Krause CD, Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 2004;202:8-32.
30. Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. *Biofactors* 2009;35(1):82-7.
31. Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP Jr, Halper J, Likosky WH, Lublin FD, et al.; Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 2002;58(2):169-78.
32. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-remitting multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. *Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG)*. *Mult Scler* 1995;1(2):118-35.
33. Nagata S, Taira H, Hall A, Johnsrud L, Streuli M, Ecsödi J, et al. Synthesis in *E. coli* of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. *Nature* 1980;284(5754):316-20.
34. Jacobs L, O'Malley J, Freeman A, Murawski J, Ekes R. Intrathecal interferon in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1982;39(10):609-15.
35. Weiner HL. The challenge of multiple sclerosis: how do we cure a chronic heterogeneous disease? *Ann Neurol* 2009;65(3):239-48.
36. Lim SY, Constantinescu CS. Current and future disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Int J Clin Pract* 2010;64(5):637-50.
37. Spain RI, Cameron MH, Bourdette D. Recent developments in multiple sclerosis therapeutics. *BMC Med* 2009;7:74. doi: 10.1186/1741-7015-7-74.
38. Arnason BG. Interferon beta in multiple sclerosis. *Neurology* 1993;43(4):641-3.

39. Paty DW, Li DK. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43(4):662-7.
40. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 1993;43(4):655-61.
41. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet* 1998;352(9139):1498-504.
42. Interferon beta-1b in the treatment of multiple sclerosis: final outcome of the randomized controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1995;45(7):1277-85.
43. Bar-Or A, Oliveira EM, Anderson DE, Hafler DA. Molecular pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999;100(1-2):252-9.
44. Ransohoff RM. Mechanisms of inflammation in MS tissue: adhesion molecules and chemokines. *J Neuroimmunol* 1999;98(1):57-68.
45. Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol* 1999;98(1):49-56.
46. Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004;251(Suppl 5):v12-v29.
47. Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74(Suppl 1):S17-24.
48. Billiau A. Anti-inflammatory properties of Type I interferons. *Antiviral Res* 2006;71(2-3):108-16.
49. Vosoughi R, Freedman MS. Therapy of MS. *Clin Neurol Neurosurg* 2010;112(5):365-85.
50. Wang X, Chen M, Wandinger KP, Williams G, Dhib-Jalbut S. IFN-beta-1b inhibits IL-12 production in peripheral blood mononuclear cells in an IL-10-dependent mechanism: relevance to IFN-beta-1b therapeutic effects in multiple sclerosis. *J Immunol* 2000;165(1):548-57.
51. Axtell RC, Steinman L. Type 1 interferons cool the inflamed brain. *Immunity* 2008;28(5):600-2.
52. Schreiner B, Mitsdoerffer M, Kieseier BC, Chen L, Hartung HP, Weller M, et al. Interferon-beta enhances monocyte and dendritic cell expression of B7-H1 (PD-L1), a strong inhibitor of autologous T-cell activation: relevance for the immune modulatory effect in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2004;155(1-2):172-82.
53. Chen W, Royer WE Jr. Structural insights into interferon regulatory factor activation. *Cell Signal* 2010;22(6):883-7.
54. Soilu-Hänninen M, Laaksonen M, Hänninen A, Erälina JP, Panelius M. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *J Neuroimmunol* 2005;167(1-2):175-82.
55. Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential. *Eur J Pharmacol* 2009;616(1-3):7-15.
56. Niemelä J, Ifergan I, Yegutkin GG, Jalkanen S, Prat A, Airas L. IFN-beta regulates CD73 and adenosine expression at the blood-brain barrier. *Eur J Immunol* 2008;38(10):2718-26.
57. Bernal F, Elias B, Hartung HP, Kieseier BC. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors by interferon-beta: a longitudinal study in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2009;15(6):721-7.
58. Comabella M, Río J, Espejo C, Ruiz de Villa M, Al-Zayat H, Nos C, et al. Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors during interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2009;130(2):145-50.
59. Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of IFNAR on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008;28(5):675-86.
60. Jin S, Kawanokuchi J, Mizuno T, Wang J, Sonobe Y, Takeuchi H, et al. Interferon-beta is neuroprotective against the toxicity induced by activated microglia. *Brain Res* 2007;1179:140-6.
61. Sauerborn M, Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H. Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2010;31(2):53-9.
62. Schellekens H. The immunogenicity of therapeutic proteins. *Discov Med* 2010;9(49):560-4.
63. Rosenberg AS. Effects of protein aggregates: an immunologic perspective. *AAPS J* 2006;8(3):E501-7.
64. Hurwitz BJ. Important sources of variability in clinical studies of neutralizing antibodies against interferon beta. *J Neurol Sci* 2008;272(1-2):8-19.
65. van Beers MM, Sauerborn M, Gilli F, Brinks V, Schellekens H, Jiskoot W. Aggregated recombinant human interferon Beta induces antibodies but no memory in immune-tolerant transgenic mice. *Pharm Res* 2010;27(9):1812-24.
66. Moens L, Wuyts M, Meyts I, De Boeck K, Bossuyt X. Human memory B lymphocyte subsets fulfill distinct roles in the anti-polysaccharide and anti-protein immune response. *J Immunol* 2008;181(8):5306-12.
67. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:267-85.
68. Mackay F, Schneider P. Cracking the BAFF code. *Nat Rev Immunol* 2009;9(7):491-502.
69. Gneiss C, Tripp P, Ehling R, Khalil M, Lutterotti A, Egg R, et al. Interferon-beta antibodies have a higher affinity in patients with neutralizing antibodies compared to patients with non-neutralizing antibodies. *J Neuroimmunol* 2006;174(1-2):174-9.
70. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernández O, Brassat D, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65(3):337-44.
71. Grossman I, Miller A. Multiple sclerosis pharmacogenetics: personalized approach towards tailored therapeutics. *EPMA J* 2010;1(2):317-27.
72. Hoffmann S, Cepok S, Grummel V, Lehmann-Horn K, Hackermüller J, Stadler PF, et al. HLA-DRB1*0401 and HLA-DRB1*0408 are strongly associated with the development of antibodies against interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2008;83(2):219-27.
73. Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, Egg R, Ehling R, Lutterotti A, et al. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2006;12(6):731-7.
74. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K; Danish Multiple Sclerosis Study Group. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005;65(1):33-9.
75. Gneiss C, Reindl M, Lutterotti A, Ehling R, Egg R, Khalil M, et al. Interferon-beta: the neutralizing antibody (NAb) titre predicts reversion to NAb negativity. *Mult Scler* 2004;10(5):507-10.
76. Vallbracht A, Treuner J, Flehmig B, Joester KE, Niethammer D. Interferon-neutralizing antibodies in a patient treated with human fibroblast interferon. *Nature* 1981;289(5797):496-7.
77. Neutralizing antibodies during treatment of multiple sclerosis with interferon beta-1b: experience during the first three years. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group and the University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. *Neurology* 1996;47(4):889-94.
78. Deisenhammer F. Neutralizing antibodies to interferon-beta and other immunological treatments for multiple sclerosis: prevalence and impact on outcomes. *CNS Drugs* 2009;23(5):379-96.

79. Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 2004;251(Suppl 2):II31-9.
80. Rudick RA, Goelz SE. Beta-interferon for multiple sclerosis. *Exp Cell Res* 2011;317(9):1301-11.
81. Mayr M, Berek K, Deisenhammer F. Evolution of interferon-beta binding antibodies in MS patients may predict development of neutralizing antibodies. *Eur J Neurol* 2003;10(4):462-4.
82. Hemmer B, Stüve O, Kieseier B, Schellekens H, Hartung HP. Immune response to immunotherapy: the role of neutralising antibodies to interferon beta in the treatment of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2005;4(7):403-12.
83. Schellekens H. Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(6):457-62.
84. Bertolotto A, Deisenhammer F, Gallo P, Sölborg Sørensen P. Immunogenicity of interferon beta: differences among products. *J Neurol* 2004;251(Suppl 2):II15-II24.
85. Ross C, Clemmesen KM, Svenson M, Sørensen PS, Koch-Henriksen N, Skovgaard GL, 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(5):706-12.
86. Giovannoni G, Barbarash O, Casset-Semanaz F, King J, Metz L, Pardo G, et al.; Rebif New Formulation Study Group. Safety and immunogenicity of a new formulation of interferon beta-1a (Rebif New Formulation) in a Phase IIIb study in patients with relapsing multiple sclerosis: 96-week results. *Mult Scler* 2009;15(2):219-28.
87. Clanet M, Radue EW, Kappos L, Hartung HP, Hohlfeld R, Sandberg-Wollheim M, et al.; European IFNbeta-1a (Avonex) Dose-Comparison Study Investigators. A randomized, double-blind, dose-comparison study of weekly interferon beta-1a in relapsing MS. *Neurology* 2002;59(10):1507-17.
88. Honda K, Yanai H, Takaoka A, Taniguchi T. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* 2005;17(11):1367-78.
89. Malucchi S, Gilli F, Caldano M, Marnetto F, Valentini P, Granieri L, et al. Predictive markers for response to interferon therapy in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2008;70(13 Pt 2):1119-27.
90. Capra R, Sottini A, Cordoli C, Serana F, Chiarini M, Caimi L, et al. IFNbeta bioavailability in multiple sclerosis patients: MxA versus antibody-detecting assays. *J Neuroimmunol* 2007;189(1-2):102-10.
91. van der Voort LF, Kok A, Visser A, Oudejans CB, Caldano M, Gilli F, et al. Interferon-beta bioactivity measurement in multiple sclerosis: feasibility for routine clinical practice. *Mult Scler* 2009;15(2):212-8.
92. Pachner AR, Warth JD, Pace A, Goelz S; INSIGHT investigators. Effect of neutralizing antibodies on biomarker responses to interferon beta: the INSIGHT study. *Neurology* 2009;73(18):1493-500.
93. Zanotti C, Ghidini C, Lamorgese C, Caimi L, Capra R, Imberti L. Transfer of myxovirus-protein-A mRNA assay for interferon- β bioactivity measurement in multiple sclerosis patients to routine laboratory practice. A 4-year experience. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(9):1235-8.
94. Pachner AR, Dail D, Pak E, Narayan K. The importance of measuring IFNbeta bioactivity: monitoring in MS patients and the effect of anti-IFNbeta antibodies. *J Neuroimmunol* 2005;166(1-2):180-8.
95. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Capobianco M, et al. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler* 2006;12(1):47-57.
96. Pachner A, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D. MxA gene expression analysis as an interferon-beta bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn* 2003;7(1):17-25.
97. Pachner AR, Narayan K, Pak E. Multiplex analysis of expression of three IFNbeta-induced genes in antibody-positive MS patients. *Neurology* 2006;66(3):444-6.
98. Santos R, Weinstock-Guttman B, Tamaño-Blanco M, Badgett D, Zivadinov R, Justinger T, et al. Dynamics of interferon-beta modulated mRNA biomarkers in multiple sclerosis patients with anti-interferon-beta neutralizing antibodies. *J Neuroimmunol* 2006;176(1-2):125-33.
99. Scagnolari C, Duda P, Bagnato F, De Vito G, Alberelli A, Lavolpe V, et al. Pharmacodynamics of interferon beta in multiple sclerosis patients with or without serum neutralizing antibodies. *J Neurol* 2007;254(5):597-604.
100. Sominanda A, Hillert J, Fogdell-Hahn A. In vivo bioactivity of interferon-beta in multiple sclerosis patients with neutralising antibodies is titre-dependent. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(1):57-62.
101. Hoffmann LA, Krumbholz M, Faber H, Kuempfel T, Starck M, Pöllmann W, et al. Multiple sclerosis: relating MxA transcription to anti-interferon-beta-neutralizing antibodies. *Neurology* 2007;68(12):958-9.
102. van der Voort LF, Visser A, Knol DL, Oudejans CB, Polman CH, Killestein J. Lack of interferon-beta bioactivity is associated with the occurrence of relapses in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2009;16(9):1049-52.
103. Hesse D, Krakauer M, Lund H, Søndergaard HB, Limborg SJ, Sørensen PS, et al. Disease protection and interleukin-10 induction by endogenous interferon- β in multiple sclerosis? *Eur J Neurol* 2011;18(2):266-72.
104. van Baarsen LG, Vosslander S, Tijssen M, Baggen JM, van der Voort LF, Killestein J, et al. Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 2008;3(4):e1927.
105. van der Voort LF, Vennegoor A, Visser A, Knol DL, Uitdehaag BM, Barkhof F, et al. Spontaneous MxA mRNA level predicts relapses in patients with recently diagnosed MS. *Neurology* 2010;75(14):1228-33.
106. Bendtzen K. Anti-IFN BAb and NAb antibodies: a minireview. *Neurology* 2003;61(9 Suppl 5):S6-10.
107. Farrell RA, Giovannoni G. Measuring and management of anti-interferon beta antibodies in subjects with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007;13(5):567-77.
108. Ross C, Clemmesen KM, Sørensen PS, Koch-Henriksen N, Bendtzen K. Measuring and evaluating interferon beta-induced antibodies in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006;12(1):39-46.
109. Bertolotto A, Sala A, Caldano M, Capobianco M, Malucchi S, Marnetto F, 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(1-2):19-31.
110. Farrell RA, Marta M, Gaeguta AJ, Souslova V, Giovannoni G, Creeke PI. Development of resistance to biologic therapies with reference to IFN- β . *Rheumatology (Oxford)* 2012;51(4):590-9.
111. Creeke PI, Farrell RA. Clinical testing for neutralizing antibodies to interferon- β in multiple sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord* 2013;6(1):3-17.
112. Vallittu AM, Erälinna JP, Ilonen J, Salmi AA, Waris M. MxA protein assay for optimal monitoring of IFN-beta bioactivity in the treatment of MS patients. *Acta Neurol Scand* 2008;118(1):12-7.
113. Sominanda A, Lundkvist M, Fogdell-Hahn A, Hemmer B, Hartung HP, Hillert J, et al. Inhibition of endogenous interferon beta by neutralizing antibodies against recombinant interferon beta. *Arch Neurol* 2010; 67(9):1095-101.
114. Farrell RA, Espasandin M, Lakdawala N, Creeke PI, Worthington V, Giovannoni G. Incorporation of an interferon- β neutralizing antibody assay into routine clinical practice. *Mult Scler* 2011;17(11):1333-40.

115. Lam R, Farrell R, Aziz T, Gibbs E, Giovannoni G, Grossberg S, et al. Validating parameters of a luciferase reporter gene assay to measure neutralizing antibodies to IFNbeta in multiple sclerosis patients. *J Immunol Methods* 2008;336(2):113-8.
116. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15623-8.
117. Uzé G, Di Marco S, Mouchel-Vielh E, Monneron D, Bandu MT, Horisberger MA, et al. Domains of interaction between alpha interferon and its receptor components. *J Mol Biol* 1994;243(2):245-57.
118. Martins TB, Rose JW, Gardiner GL, Kusakawa N, Husebye D, Hill HR. Cell-based reporter gene assay for therapy-induced neutralizing antibodies to interferon-beta in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2013;33(2):52-7.
119. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 2005;39(1):75-85.
120. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25(4):402-8.
121. Perini P, Calabrese M, Biasi G, Gallo P. The clinical impact of interferon beta antibodies in relapsing-remitting MS. *J Neurol* 2004;251(3):305-9.
122. Frank JA, Richert N, Bash C, Stone L, Calabresi PA, Lewis B, et al. Interferon-beta-1b slows progression of atrophy in RRMS: Three-year follow-up in NAb- and NAb+ patients. *Neurology* 2004;62(5):719-25.
123. Boz C, Oger J, Gibbs E, Grossberg SE; Neurologists of the UBC MS Clinic. Reduced effectiveness of long-term interferon-beta treatment on relapses in neutralizing antibody-positive multiple sclerosis patients: a Canadian multiple sclerosis clinic-based study. *Mult Scler* 2007;13(9):1127-37.
124. Jungedal R, Lundkvist M, Engdahl E, Ramanujam R, Westerlind H, Sominanda A, et al. Prevalence of anti-drug antibodies against interferon beta has decreased since routine analysis of neutralizing antibodies became clinical practice. *Mult Scler* 2012;18(12):1775-81.
125. Sorensen PS, Bertolotto A. Re: Neutralizing antibodies to interferon beta: assessment of their clinical and radiographic impact: an evidence report: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* 2007;69(15):1552; author reply 1553.
126. Rot U, Sominanda A, Fogdell-Hahn A, Hillert J. Impression of clinical worsening fails to predict interferon-beta neutralizing antibody status. *J Int Med Res* 2008;36(6):1418-25.
127. Freedman MS, Edan G, Hartung HP, Kappos L, Miller H, Montalbán X, et al. For the BENEFIT Study Group. The impact of neutralizing antibodies within 5 years of treatment with interferon beta-1b initiated at the first event suggestive of multiple sclerosis. *Neurology* 2009;72(Suppl. 3):A197-A198.
128. Reder AT, Ebers GC, Traboulsee A, Li D, Langdon D, Goodin DS, et al. Cross-sectional study assessing long-term safety of interferon-beta-1b for relapsing-remitting MS. *Neurology* 2010;74(23):1877-85.
129. Sørensen PS. Effects of neutralizing antibodies to interferon beta in multiple sclerosis: a logical paradox. *Mult Scler* 2012;18(2):131-2.
130. Paolicelli D, D'Onghia M, Pellegrini F, Drenzo V, Iaffaldano P, Lavolpe V, et al. The impact of neutralizing antibodies on the risk of disease worsening in interferon beta-treated relapsing multiple sclerosis: a 5 year post-marketing study. *J Neurol* 2013;260(6):1562-8.