

# Neutralizační protilátky a Myxovirus resistance protein A při sledování biologické účinnosti interferonu $\beta$

## Neutralising Antibodies and Myxovirus Resistance Protein A as a Marker of Biological Response to Interferon $\beta$

### Souhrn

Interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) patří v léčbě pacientů s relaps-remitentní formou roztroušené sklerózy mezi léky první volby. V návaznosti na podání IFN- $\beta$  dochází v lymfocytech k syntéze Myxovirus resistance proteinu A, který je vzhledem k následnému vzestupu hladiny považován za vhodný marker účinnosti IFN- $\beta$  *in vivo*. V průběhu léčby IFN- $\beta$  dochází u některých pacientů k tvorbě neutralizačních protilátek, jež mohou vést k poklesu či ztrátě biologické účinnosti tohoto léku. Jejich detekce, stejně jako měření hladiny mRNA Myxovirus resistance proteinu A, rozšiřuje možnosti sledování účinnosti léčby IFN- $\beta$ .

### Abstract

Interferon  $\beta$  is the first-line treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis. Patients treated with interferon  $\beta$  may develop neutralizing antibodies that can reduce or abolish its efficacy. Interferon-inducible Myxovirus resistance protein A has been proven to be a sensitive marker of biological response to interferon  $\beta$ . Neutralizing antibodies and the levels of Myxovirus resistance protein A mRNA are sensitive measures of biological response to interferon  $\beta$ ; their levels should be investigated in all interferon-treated patients.

Děkuji doc. MUDr. Petrovi Marusičovi, Ph.D. za připomínky k článku.  
Podpořeno grantem IGA MZ ČR NT 12385-5.

### Úvod

Rekombinantní proteiny, interferony  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) jsou pro svou schopnost modifikovat imunitní procesy léky první volby u pacientů

s relaps-remitentní formou roztroušené sklerózy (RR RS). Léčba vede k omezení zánětlivé aktivity autoimunitního procesu – dochází ke snížení počtu a intenzity relapsů i k poklesu

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.  
The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zasílané do biomedicínských časopisů.  
The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE "uniform requirements" for biomedical papers.

J. Libertínová<sup>1</sup>,  
E. Meluzínová<sup>1</sup>, V. Maťoška<sup>2</sup>,  
M. Zajac<sup>3</sup>, E. Hynčicová<sup>1</sup>,  
A. Tomek<sup>1</sup>, M. Bojar<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Neurologická klinika 2. LF UK a FN v Motole, Praha

<sup>2</sup> Laboratoř molekulární diagnostiky Nemocnice Na Homolce, Praha

<sup>3</sup> Ústav lékařské mikrobiologie, 2. LF UK a FN v Motole, Praha



MUDr. Mgr. Jana Libertínová  
Neurologická klinika  
2. LF UK a FN v Motole  
V Úvalu 84  
154 00 Praha 5  
e-mail: libertinova@gmail.com

Přijato k recenzi: 11. 6. 2013  
Přijato do tisku: 19. 11. 2013

### Klíčová slova

interferon  $\beta$  – roztroušená skleróza – neutralizační protilátky – Myxovirus resistance protein A

### Key words

interferon  $\beta$  – multiple sclerosis – neutralizing antibodies – Myxovirus resistance protein A

počtu a redukci objemu charakteristických ložisek na magnetické rezonanci (MR).

Terapeutický účinek IFN- $\beta$  je zprostředkovaný vazbou na příslušný membránový re-

ceptor lymfocytů. Dochází k aktivaci tyrosinkinázy a kaskádě fosforylací, na jejímž konci je aktivace, případně inaktivace stovek genů s následnou syntézou proteinů s antivirovým a protizánětlivým účinkem. Jedná se o proteiny jak s bezprostředním účinkem – například stimulace sekrece protizánětlivě působícího interleukinu 10, tak s účinkem oddáleným – změny v počtu a aktivitě dendritických buněk, NK buněk, B lymfocytů či T pomocných lymfocytů. Klíčovými účinky IFN- $\beta$  jsou blokáda IFN- $\gamma$  a redukce počtu T buněk procházejících hematoencefalickou bariérou.

V průběhu léčby IFN- $\beta$  může docházet k tvorbě protilátek, které mohou snížit jeho terapeutický efekt. Protilátky, jež mají schopnost vazby na molekulu IFN- $\beta$ , se obecně nazývají vazebné protilátky (BAbs, Bindings Antibodies). Na molekulu IFN- $\beta$  se mohou navázat kdekoli, mnohdy mimo epitop – vazebné místo pro membránový receptor. Vazbě IFN- $\beta$  na receptor, a tím jeho funkci, tak většinou nebrání. V případě, kdy se protilátka váže přímo na epitop IFN- $\beta$ , je vazba na receptor znemožněna, nedojde k aktivaci IFN- $\beta$  indukovaných genů a nastává pokles až ztráta biologického účinku [1–3]. Protilátky s takovou vazebnou schopností jsou podskupinou BAbs a nazývají se protilátkami neutralizačními (NAb, Neutralizing Antibodies).

### Vznik a syntéza NAb

NAb se objevují u 2–42 % pacientů léčených IFN- $\beta$  [4] a jejich tvorba je obtížně predikovatelná. Některé faktory ovlivňující imunogenicitu podávaného IFN- $\beta$  jsou známy – primární sekvence molekuly, rozdíly v její glykosylaci, tendence k tvorbě agregátů, aplikační cesta či frekvence podávání. Roli hrají i charakteristiky konkrétního pacienta – predispozice k prolomení imunologické tolerance je pravděpodobně určena geneticky. Byla například prokázána vyšší tendence k tvorbě NAb a BAbs v souvislosti s dvěma alelami HLA II. třídy [5]. Prevalence NAb se u jednotlivých preparátů IFN- $\beta$  liší – obecně platí, že nejčastěji se NAb vyskytují u IFN- $\beta$ -1b s.c., méně u IFN- $\beta$ -1a s.c. a IFN- $\beta$ -1a i.m. [6]. IFN- $\beta$ -1b indukuje NAb sice nejčastěji, ale na druhou stranu právě protilátky proti tomuto preparátu zůstávají spíše v nízkých titrech a pacienti s těmito NAb častěji konvertují zpět do NAb negativity [7]. Ve studiích se navíc prokázalo, že vazba NAb proti IFN- $\beta$ -1b zřejmě není tak silná

jako v případě protilátek proti IFN- $\beta$ -1a, což v praxi znamená, že NAb proti IFN- $\beta$ -1b nemusí zablokovat účinek IFN- $\beta$  kompletně [8]. Takový pacient tak může zůstat přinejmenším dílčím respondentem.

Neutralizační protilátky vznikají obvykle po 6–24 měsících terapie. Zajímavý fakt uvádějí ve své studii Sorensen et al – pacienti, u kterých posléze dojde k tvorbě NAb, odpovídají na terapii IFN- $\beta$  na počátku své léčby lépe v porovnání s pacienty, kteří zůstanou NAb negativní [9]. Ztráta účinku IFN- $\beta$  se u NAb pozitivních pacientů klinicky projevuje zpravidla až s časovým odstupem – k progresi choroby klinicky i v MR obrazu dochází u NAb pozitivních pacientů v průměru po 18–24 měsících [4].

U některých pacientů s vytvořenými NAb, častěji při nízkých a středně vysokých titrech, dochází v průběhu několika měsíců či let k sérokonverzi – návratu k NAb negativnímu stavu [7]. Dle některých prací revertuje při léčbě IFN- $\beta$ -1b do NAb negativity během tří let zhruba polovina pacientů a při sledování delším než osm let se negativními stává většina pacientů [8]. Účinnost IFN- $\beta$  je pak u takových pacientů stejná jako u těch, kteří byli trvale NAb negativní [10]. Dojde-li k tvorbě NAb ve vysokých titrech, přetrvávají dlouhodobě, i několik let po vysazení IFN- $\beta$  [11]. Neutralizační protilátky proti exogennímu, terapeuticky podávanému IFN- $\beta$  zkřížené reagují i proti endogennímu IFN- $\beta$ . Spekuluje se tedy o jejich vlivu na imunitní systém nositele [12].

### Mezinárodní guidelines

Vzhledem k významu NAb při sledování účinnosti terapie nákladnými IFN- $\beta$  označila v roce 2005 skupina expertů Evropské federace neurologických společností (EFNS) vyšetřování NAb jako nezbytnou podmínku racionální a účinné léčby RS přípravky ze skupiny IFN- $\beta$  [13]. Dle tohoto doporučení je žádoucí kontrolovat přítomnost NAb u každého pacienta léčeného IFN- $\beta$  po 12 a 24 měsících terapie a v případě prokázané přítomnosti NAb ověřit výsledek opakovaným vyšetřením po třech měsících. Při opětovně potvrzené pozitivitě (v titrech nad 100 TRU/ml) se pak doporučuje terapii změnit.

### Metodika vyšetřování NAb

Zlatý standard vyšetřování NAb, doporučený Světovou zdravotnickou organi-

zací, je metoda cytopatogenního efektu (CPE). Její provedení podléhá přísné standardizaci a je relativně časově náročné – vyšetření jednoho pacienta trvá minimálně čtyři dny. Vyšetření probíhá *in vitro* na buněčné kultuře v přítomnosti cytopatogenně působícího viru. Bez současné přítomnosti protektivně působícího IFN- $\beta$  by došlo k rozpadu buněk, IFN- $\beta$  této lýze zabrání. Cílem vyšetření je ověřit, zda přidání pacientova séra ochranný efekt IFN- $\beta$  zruší. V takovém případě je daný pacient NAb pozitivní a následně lze kvantifikovat, nakolik jsou buňky lyzovány (získat titer NAb).

Jako pozitivní označujeme titer NAb nad 20 TRU/ml. Hodnoty těsně nad touto hranicí jsou označovány za nízké a jejich klinický význam je nutné posuzovat individuálně. NAb jsou totiž nepřímý marker účinnosti a jejich přítomnost pouze poukazuje na možnost inaktivace IFN- $\beta$ . U některých pacientů vedou i nízké hladiny protilátek k významnému poklesu aktivity IFN- $\beta$ , u jiných může při srovnatelných titrech zůstat IFN- $\beta$  dostatečně funkční. Vysoké titry (> 100 TRU/ml) většinou bývají klinicky signifikantní a zpravidla způsobují pokles či ztrátu biologického účinku IFN- $\beta$  [13].

V literatuře je někdy možné narazit na rychlý skrining NAb vyšetřením BAbs (finančně i časově méně náročnou metodou ELISA). Východiskem je, že NAb jsou podskupinou BAbs. Je zde však riziko jak falešné positivity – BAbs jsou detekovány, ale vlastně nemají neutralizační aktivitu, tak falešné negativity – BAbs jsou sice negativní, IFN- $\beta$  však přesto nelze automaticky považovat za plně funkční. V jedné studii byla totiž až u 4 % pacientů léčených IFN- $\beta$  zjištěna tzv. neprotilátková neutralizační schopnost [14].

### Klinická interpretace NAb pozitivity

Obecně platí, že výsledky laboratorního testování je třeba vždy korelovat s klinickým a MR obrazem konkrétního pacienta. Nicméně přítomnost NAb bývá při systematickém monitoringu zachycena zpravidla ještě v době klinické i MR stabilizace pacienta. Rozhodování o změně terapie může být v takovém případě obtížné, neboť je podloženo právě pouze laboratorně prokázanou pozitivitou NAb. V této situaci vystupuje do popředí význam biomarkerů – objektivně měřitelných, přímých indikátorů odpovědi na podávání IFN- $\beta$ . S jejich pomocí je možné

odlišit pacienty, u nichž už účinnost IFN- $\beta$  není dostatečná, a na druhou stranu určit ty, pro něž je i přes přítomnost NAbů léčba nadále přínosná. Adeptů na biomarker je celá řada (IF127, CXCL10, chemokiny CCL2 a CCL8, MxA). Jejich společným rysem je pokles exprese v přítomnosti vysokého titru NAbů [12].

### MxA jako marker biologického účinku IFN- $\beta$

V současnosti je validizovaným a v klinické praxi nejvíce používaným markerem Myxovirus resistance protein A (MxA), bílkovina produkovaná mononukleáry v návaznosti na stimulaci interferonového receptoru [11]. Exprese MxA je v organizmu aktivována pouze IFN- $\beta$  (a HIV), a jeho množství tak přímo odráží biologickou aktivitu IFN- $\beta$  [15]. Nevytváří-li pacient dostatečné množství MxA, není exprimován ani žádný z dalších genů, normálně stimulovaných IFN- $\beta$  [16].

Diagnosticky nej přesnější je detekovat MxA v podobě mRNA pomocí PCR. Hladina mRNA MxA lineárně koreluje s množstvím biologicky účinného IFN- $\beta$ , začíná se zvyšovat bezprostředně po aplikaci IFN- $\beta$ , dosahuje maxima kolem 12. hod po aplikaci a poté opět klesá [17]. Odběr krve k vyšetření mRNA MxA je tak třeba provádět v přesně určeném časovém intervalu, kdy je hladina mRNA MxA nejvyšší – 12 hod po aplikaci.

Množství mRNA MxA je vždy vztahováno k mRNA genu *GAPDH* (*glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza*), jehož exprese na stimulaci IFN- $\beta$  nereaguje a zůstává stabilní. Výsledná, poměrová, hodnota umožňuje interindividuální srovnávání. Jako hraniční hodnota je v ČR (v Laboratoři molekulární diagnostiky Nemocnice Na Homolce) stanovena hodnota 160. Byla získána jako 95% rozložení hodnot mRNA MxA naměřených u neléčených pacientů s RR RS v ČR. Nad tuto hodnotu lze předpokládat efekt IFN- $\beta$ , hodnoty nižší je třeba interpretovat jako suspektní ze ztráty účinku IFN- $\beta$  [18].

Kromě jednorázové hodnoty mRNA MxA je možné ověřovat ještě míru relativního vzestupu mRNA MxA vyšetřením tzv. **MxA indukce**. Toto vyšetření porovnává hodnoty mRNA MxA před podáním IFN- $\beta$  a za 4 hod po aplikaci. Provádí se s cílem zachytit jedince, kteří mají alespoň částečně zachovanou odpovídavost na podání IFN- $\beta$ . Jsou-li naměřené hodnoty mRNA MxA po 4 hod od vpichu alespoň

trojnásobně oproti vstupní hodnotě, pak se předpokládá, že je určitá biologická aktivita IFN- $\beta$  zachována, a léčba může pacientovi i nadále prospívat [17,19].

Nedostatečná MxA odpověď v návaznosti na podání IFN- $\beta$  znamená ztrátu jeho biologické účinnosti [16]. V takové situaci hovoříme o **neodpovídavosti** (nonrespondivitě) vůči IFN- $\beta$ . Bylo prokázáno, že tyto pacienti mají v porovnání s respondenty signifikantně vyšší roční počet relapsů [20]. Pomocí parametrů NAbů a MxA lze pak nonrespondenta definovat jako jedince, u něhož byly prokázány:

- NAbů v titru > 20 TRU/ml (> 100 TRU/ml),
- mRNA MxA < 160.

Dojde-li k této situaci opakovaně, doporučuje se ještě doplnit MxA indukci. Pokud je v tomto testu zachována reziduální reaktivita na stimulaci IFN- $\beta$ , hovoříme o parciálních respondentech. Úplní nonrespondenti na podání IFN- $\beta$  nereagují ani v tomto testu. Nejčastější příčinou neodpovídavosti na IFN- $\beta$  je tvorba NAbů. Pod obrazem neodpovídavosti ale může být skryta (a vyšetřením MxA odhalena) i pacientova noncompliance [5]. K redukci účinku terapie IFN- $\beta$  může dále vést i například tzv. solubilní receptor – neprotilátková neutralizační kapacita séra [14]. Naváže-li se tato solubilní sérová struktura (receptorem nazývaná proto, že se váže na epitop IFN- $\beta$ ) na molekulu IFN- $\beta$ , zabrání jeho vazbě na membránový receptor, a tím ho blokuje v jeho funkci. Vyšetření MxA odhaluje zkrátka všechny nedostatečné respondenty na IFN- $\beta$ , bez ohledu na stav NAbů.

### Terapeutické konsekvence

V současné době neexistuje žádná „antiprotilátková“ strategie a u opakovaně potvrzené neodpovídavosti na IFN- $\beta$  je doporučeno změnit léčbu [6,21]. Nonrespondivita bývá u preparátů IFN- $\beta$  zkřížená, a proto je vhodné nepodávat jiný IFN- $\beta$  přípravek. Při nízké klinické aktivitě onemocnění je obecně doporučován další z léků první volby – glatirameracetát, při vyšší aktivitě pak léky druhé volby – natalizumab nebo fingolimod.

### Kazuistiky dokumentující typické klinické situace

#### Nonrespondentka s vysokým titrem NAbů (> 100 TRU/ml)

Dnes 50leté pacientce léčené IFN- $\beta$ -1a s.c. od roku 2005 byly v průběhu let

2007–2009 opakovaně naměřeny extrémně vysoké titry NAbů: 225 ... 9 654 ... 8 299 ... 6 926 ... 9 292 TRU/ml. Klinicky byla pacientka stabilizována, ale kontrolní nález na MR mozku prokázal progresi onemocnění. V korelaci s tím byla zjištěna nízká hodnota mRNA MxA: 28 (vzhledem k extrémně vysokým titrům NAbů provedeno pouze jedno vyšetření), nedostatečná byla i MxA indukce. Pacientka byla považována za nonrespondenta s potvrzenou ztrátou biologického účinku IFN- $\beta$  a převedena na glatirameracetát, na kterém je dále stabilizována klinicky i dle MR. Prottilátky ve vysokých titrech stále přetrvávají – poslední měření (9/2012) prokázalo NAbů v titru 6 450 TRU/ml.

#### Parciální respondentka s vysokým titrem NAbů

Dnes 56letá pacientka léčená IFN- $\beta$ -1a i. m. od roku 2002 byla pro klinickou aktivitu i progresi nálezu na MR v roce 2009 převedena na IFN- $\beta$ -1b. V roce 2011 se objevily NAbů ve vysokých titrech: 215 TRU/ml (4/2011) ... 212 TRU/ml (6/2011). Syn téza mRNA MxA byla v roce 2010 a na počátku roku 2011 dostatečná, v 6/2011 ale došlo k poklesu pod cut off: 829 ... 698 ... 438 ... 87 (6/2011). MxA indukce však zůstala zachována (před aplikací 40,9 – 4 hod po aplikaci 218). Pacientka byla stabilizována jak klinicky, tak na MR. Jako parciální respondentka byla pacientka na terapii ponechána. V dalším průběhu se hodnoty MxA opět pohybovaly nad cut off, NAbů postupně klesaly (v 07/2012 NAbů: 40 TRU/ml, mRNA MxA: 218). Od 10/2012 je pacientka NAbů negativní.

#### Nonrespondent s nízkými titry NAbů (20–100 TRU/ml)

U dnes 45letého pacienta léčeného IFN- $\beta$ -1b počínaje rokem 2005 byl od roku 2008 sledován vývoj NAbů: 25 ... 53 ... 26 ... 102 TRU/ml. Hodnoty mRNA MxA opakovaně – ani v době nízkých titrů NAbů – nedosahovaly hodnot cut off: 96,9 ... 85,6 ... 54,6. Reaktivitu na stimulaci IFN- $\beta$  neprokázala ani MxA indukce (před aplikací 32,40 – 4 hod po aplikaci 55). Nález na MR byl dlouhodobě stacionární, klinický nález odpovídal EDSS 5,0. Pacient byl označen jako nonrespondent a léčba IFN- $\beta$  byla ukončena.

#### Respondentka s nízkými titry NAbů

U dnes 36leté pacientky léčené IFN- $\beta$ -1b od roku 2002 byly v roce 2007 zachyceny

NABs v nízkých titrech: 43 ... 26 TRU/ml. Hodnoty mRNA MxA se trvale pohybovaly vysoko nad cut off hodnotou: 283 ... 113 ... 488. Na kontrolní MR byl nález stacionární, klinicky byla pacientka rovněž stabilizovaná. Přes výskyt NABs byla pacientka považována za respondentku a terapie ponechána beze změn. V dalším průběhu NABs postupně klesaly (15 ... 11 ... 10 ... 6 TRU/ml), v roce 2011 byla pacientka NABs negativní.

### Nonrespondent bez výskytu NABs

Dnes 20letý pacient léčený IFN- $\beta$ -1a i. m. od 3/2010 měl bezprostředně po zahájení terapie hodnoty mRNA MxA vysoko nad normou. Během prvního půl roku léčby ale hodnoty mRNA MxA postupně klesaly, od 10/2010 se pohybovaly pod cut off (1 200 v 3/2010 ... 1 020 v 5/2010 ... 238 v 7/2010 ... 38 v 10/2010 ... 96 v 1/2011), MxA indukce v 3/2011 byla nedostatečná (před aplikací 36,3 – 4 hod po aplikaci 41). NABs zůstávaly po celou dobu negativní. Nález na MR se neměnil, klinicky byl pacient stabilizovaný. Pacient byl na základě hodnot mRNA MxA označen za nonrespondenta a v 6/2011 převeden na glatirameracetát.

### Diskuze ke kazuistikám

NABs a MxA jsou laboratorní markery biologické účinnosti IFN- $\beta$ . Na základě detekce NABs vlastně jen odhadujeme, nakolik může být IFN- $\beta$  inaktivován. Vysoký titr NABs (> 100 TRU/ml) je zpravidla suspektní ze ztráty účinku IFN- $\beta$ , zatímco pacienti s nižšími titry NABs mají často zachovanou funkci IFN- $\beta$ , a léčba jim tak prospívá i přes přítomnost NABs. Jak ale ilustrují výše uvedené kazuistiky, interpretace NABs není jednoznačná a skutečný dopad NABs je individuálně odlišný. Přetrvávající biologickou účinnost IFN- $\beta$  mohou mít i pacienti s vysokým titrem NABs a naopak, u pacientů s objektivně nízkými titry NABs už IFN- $\beta$  účinný být nemusí.

Reziduální účinnost IFN- $\beta$  lze při výskytu NABs objektivizovat vyšetřením MxA. Při nízké hladině MxA, a tedy suspektní ztrátě účinku IFN- $\beta$ , je vhodné doplnit ještě tzv. MxA indukční test, jehož význam dokumentuje i v pořadí druhá kazuistika. Je-li reaktivita na podání IFN- $\beta$  v MxA indukčním testu zachována, předpokládá se dílčím způsobem zachovaná odpovídavost na IFN- $\beta$ . Při klinické a MR stabilizaci pa-

cienta může léčba pacienta pokračovat. Při potvrzené ztrátě účinnosti je doporučována změna terapie. Vysoké titry NABs pak mohou přetrvávat ještě několik let po převedení na jinou medikaci.

Nejčastější příčinou neodpovídavosti na IFN- $\beta$  je tvorba NABs. V některých případech ale nonresponzivita nemusí být protilátková. Přesto ji lze, jak dokládá poslední z kazuistik, díky vyšetřování MxA odhalit včas.

### Závěr

Donedávna byla účinnost IFN- $\beta$  posuzována jen na základě klinického obrazu a aktivity na MR. Toto u nás zažité schéma se ve světle současných poznatků a rovněž nového českého Klinického standardu pro diagnostiku a léčbu RS rozšiřuje o sledování dynamiky NABs a MxA [22]. Systematický monitoring účinku IFN- $\beta$  pomocí těchto laboratorních markerů umožňuje vést terapii IFN- $\beta$  individuálně, s bezprostřední kontrolou jeho účinku. Průběžné hodnocení účinnosti IFN- $\beta$  je dnes nezbytné s ohledem na dostupnost alternativní účinné terapie RR RS, stejně jako i na racionální využití finančních prostředků. NABs a MxA by se měly stát součástí běžné klinické praxe.

### Literatura

- 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.
- Deisenhammer F, Reindl M, Harvey J, Gasse T, Dilitz E, Berger T. Bioavailability of interferon- $\beta$ -1b in MS patients with and without neutralizing antibodies. *Neurology* 1999; 52(6): 1239–1243.
- 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): 634–639.
- Hesse D, Sørensen PS. Using measurements of neutralizing antibodies: the challenge of IFN-beta therapy. *Eur J Neurol* 2007; 14(8): 850–859.
- Hoffmann S, Cepok S, Grummel V, Lehmann-Horn K, Hackermuller 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): 219–227. doi: 10.1016/j.ajhg.2008.07.006.
- Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B et al. Recommendations for clinical use of data on neutralizing antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9(7): 740–750. doi: 10.1016/S1474-4422(10)70103-4.
- Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmensen KM, Bendtzen K. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005; 65(1): 33–39.

8. Cantillon M, Antonijevic I. Clinical relevance of anti-drug antibodies with interferon beta-1b therapy in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13 (Suppl 1): S21–S27.

9. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Bendtzen K. Are ex vivo neutralising antibodies against IFN- $\beta$  always detrimental to therapeutic efficacy in multiple sclerosis? *Mult Scler* 2007; 13(5): 616–621.

10. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Flachs EM, Bendtzen K. Is the treatment effect of IFN-beta restored after the disappearance of neutralizing antibodies? *Mult Scler* 2008; 14(6): 837–842. doi: 10.1177/1352458508088942.

11. Petersen B, Bendtzen K, Koch-Henriksen N, Ravnborg M, Ross C, Sorensen PS. Persistence of neutralizing antibodies after discontinuation of IFN-beta therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Mult Scler* 2006; 12(3): 247–252.

12. 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): 1095–1101. doi: 10.1001/archneurol.2010.218.

13. Sorensen PS, Deisenhammer F, Duda P, Hohlfeld R, Myhr KM, Palace J et al. 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): 817–827.

14. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Valentino P, Granieri L, Di Sapio A et al. Anti-interferon-beta neutralising activity is not entirely mediated by antibodies. *J Neuroimmunol* 2007; 192(1–2): 198–205.

15. Pachner AR, Bertolotto A, Deisenhammer F. Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFN-beta bioactivity: detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB). *Neurology* 2003; 61 (Suppl 5): S24–S26.

16. Hesse D, Sellebjerg F, Sorensen PS. Absence of MxA induction by interferon- $\beta$  in patients with MS reflects complete loss of bioactivity. *Neurology* 2009; 73(5): 372–377. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181b04c98.

17. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A et al. Biological responsiveness to first injections of interferon- $\beta$  in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 158(1–2): 195–203.

18. Libertínová J, Kumstýřová T, Meluzínová E, Bojar M, Maňoška V. mRNA MxA jako marker biologické účinnosti léčby interferonem- $\beta$  u pacientů s RS v ČR. *Cesk Slov Neurol N* 2009; 72/105 (Supl 1–2): 195–203.

19. van der Voort LF, Kok A, Visser A, Oudejans CBM, Caldano M, Gilli F et al. Interferon-beta bioactivity measurement in multiple sclerosis: feasibility for routine clinical practice. *Mult Scler* 2009; 15(2): 212–218. doi: 10.1177/1352458508096877.

20. 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): 1049–1052. doi: 10.1111/j.1468-1331.2009.02649.x.

21. Bojar M, Zajac M, Meluzínová E, Houzvicová E, Libertínová J, Liskova P et al. Treatment with azathioprine and cyclic methylprednisolone has little or no effect on bioactivity in anti-interferon-beta antibody-positive patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2010; 16(12): 1529–1530. doi: 10.1177/1352458510382248.

22. Klinický standard pro diagnostiku a léčbu roztroušené sklerózy a neuromyelitis optica. Dostupné z URL: [http://www.imuno.neurologiefnhk.cz/doc/Dx\\_Tx\\_RSaNMO-standard.pdf](http://www.imuno.neurologiefnhk.cz/doc/Dx_Tx_RSaNMO-standard.pdf).