

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Neuroscienze

TESI DI DOTTORATO

**Studio clinico prospettico delle correlazioni cliniche
del dosaggio di un nuovo marcatore molecolare
in soggetti affetti da
sclerosi multipla intermittente-remittente
in terapia con differenti regimi di interferone beta 1A**

RELATORE

Ch.mo Prof. Giuseppe de Michele

Candidato

Dott. Vittorio Schiavone

ANNO ACCADEMICO 2007/2008

Indice

Introduzione	pag. 2
Materiali e Metodi	pag. 12
◇ Preparazione del CSF114(Glc)	pag. 17
◇ Determinazione degli anticorpi nel siero mediante ELISA	pag. 17
Risultati	pag . 19
Discussione	pag. 23
Bibliografia	pag. 24
Ringraziamenti	pag. 30

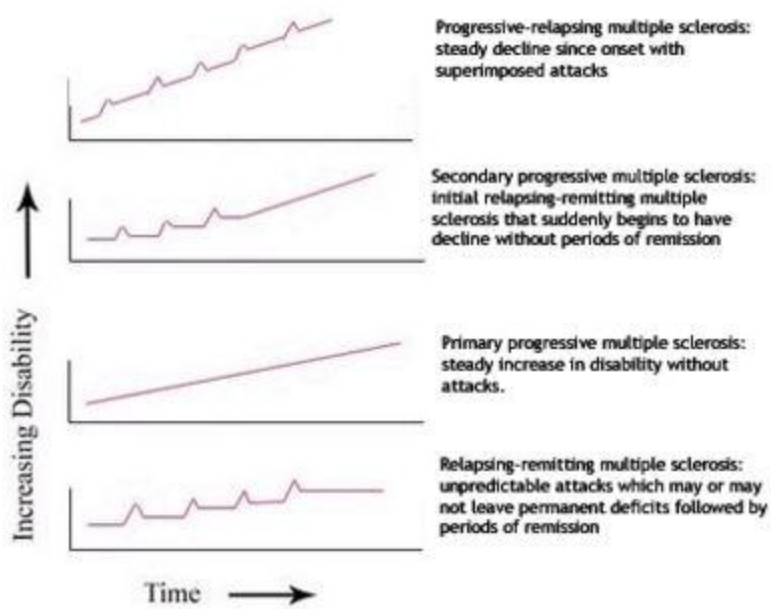
Introduzione

La Sclerosi Multipla (SM) è la malattia demielinizzante più frequente del Sistema Nervoso Centrale (SNC). Essa è caratterizzata dal punto di vista anatomopatologico da foci multipli di infiammazione, placche di demielinizzazione, gliosi e danno assonale a carico dell'encefalo e del midollo spinale, lesioni che concorrono tutte alle manifestazioni cliniche della patologia. Sebbene la patogenesi non sia definita in maniera univoca, la SM può essere considerata una malattia ad etiologia multifattoriale che vede l'interazione tra una predisposizione genetica, un'alterazione del sistema immunitario ed il concorso di fattori ambientali tuttora non definiti. La patologia interessa, con diversa frequenza, ogni sistema funzionale in cui può essere per convenzione suddiviso il SNC; i sistemi maggiormente interessati sono il piramidale, il troncale, il cerebellare, il visivo, il sensitivo e lo sfinterico. L'interessamento delle funzioni cognitive è principalmente un fenomeno delle fasi tardive della patologia. Il sistema extrapiramidale non è tra i sistemi funzionali coinvolti. Sintomi precoci includono, pertanto, parestesie, mono- o para-paresi, diplopia, neurite ottica, atassia e disturbi sfinterici. Vertigini, incoordinazione e tremore cerebellare, deambulazione con caratteristiche patologiche, “fatigue” (peggioramento del sistema funzionale principalmente interessato in seguito a sforzi prolungati), depressione e/o labilità emotiva e dolore sono pure manifestazioni comuni. Tutti i sintomi suddetti hanno un significativo impatto sulla qualità di vita degli affetti.

Il decorso clinico della SM presenta un'estrema variabilità interindividuale, ma la malattia può essere distinta in tre forme cliniche principali: recidivante-remittente, secondariamente progressiva e primariamente progressiva (fig.1). In circa l'85% dei pazienti con SM, la malattia esordisce con deficit neurologici acuti con recupero totale o parziale (forma recidivante-remittente, SM-RR). Nella maggior parte di essi, in un periodo di tempo variabile, tale decorso è seguito da una fase secondariamente progressiva con mancato recupero del deficit (forma secondariamente progressiva).

Una minoranza di pazienti (circa il 15%) mostra un peggioramento clinico irreversibile sin dall'esordio (forma primariamente progressiva; Wingerchuk et al., 2001).

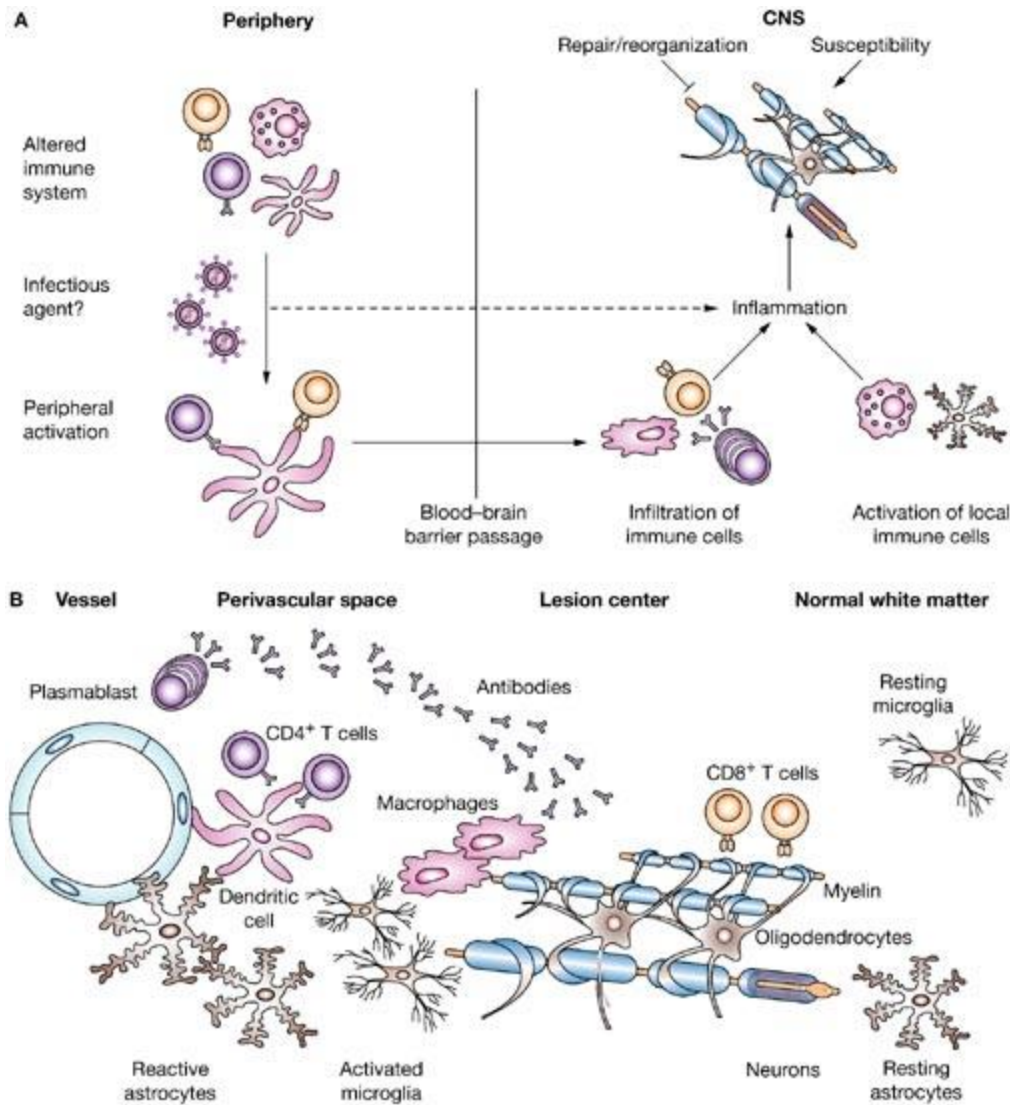
Fig.1. Forme cliniche di SM



La malattia ha un impatto economico e sociale molto elevato, soprattutto in relazione al fatto che colpisce soggetti giovani (età di esordio 29 ± 10 anni), ha decorso cronico con tendenza alla progressione e può essere altamente invalidante. Ne consegue l'importanza dello sviluppo di nuove terapie sicure ed efficaci che influenzino il decorso della patologia.

Le caratteristiche neuropatologiche della SM sono lesioni dell'encefalo e del midollo spinale con infiltrati infiammatori perivascolari, demielinizzazione e astrogliosi. La SM è stata considerata a lungo come una patologia autoimmune demielinizzante del SNC causata da cellule T autoreattive alle proteine della mielina (fig.2). Dati recenti suggeriscono che la malattia inizi con l'apoptosi degli oligodendrociti (Barnett et al., 2004). La degenerazione assonale è un fenomeno presente ed è stato riportato già nelle prime descrizioni delle placche della SM (Charcot, 1868; Greenfield et al., 1936). La degenerazione assonale si pensa oggi sia un'importante manifestazione patologica sia della SM (Trapp et al., 1998; Ferguson et al., 1997; Mancardi et al., 2001; Kornek et al., 2000) che dell'Encefalite Allergica Sperimentale (EAE; Kornek et al., 2000; Zhu et al., 2003), il miglior modello animale di SM. La perdita assonale stimata nelle lesioni di vecchia data del midollo spinale nei pazienti con patologia di lunga durata è pari al 58-68% (Bjartmar et al., 2000; Lovas et al., 2000).

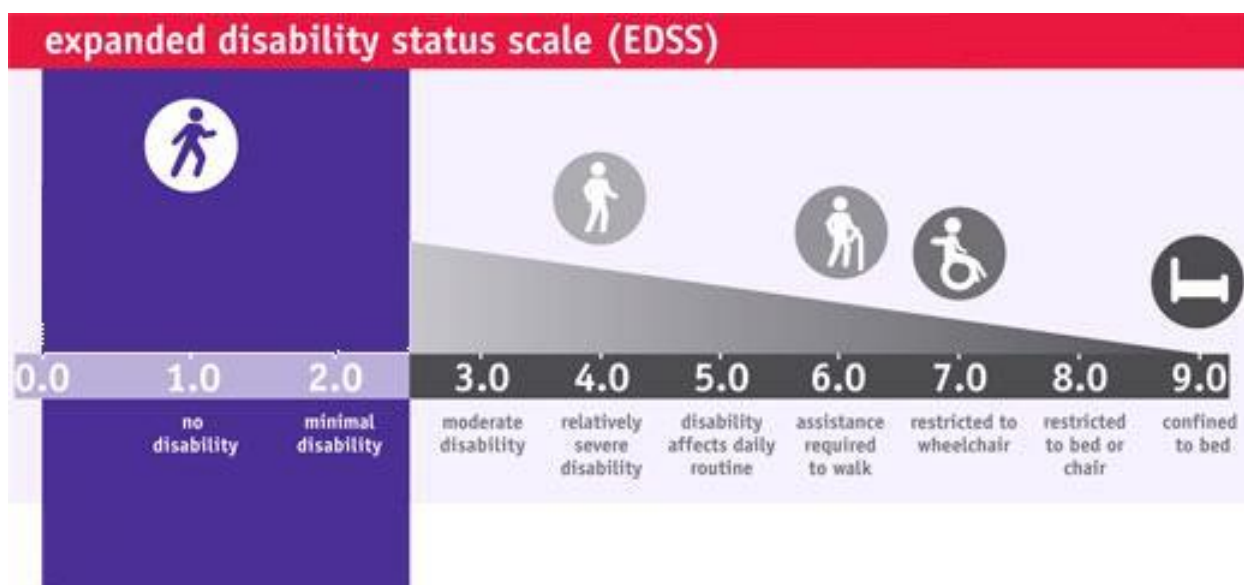
Fig. 2. Immunopatogenesi della SM



da: Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis Bernhard Hemmer, Stefan Nessler, Dun Zhou, Bernd Kieseier and Hans-Peter Hartung, *Nature Clinical Practice Neurology* (2006) 2, 201-211

A causa della natura fluttuante e della varietà dei sintomi, una misura delle manifestazioni cliniche della SM è problematica. Per una misura appropriata dell'efficacia delle terapie farmacologiche all'interno dei trial clinici, gli strumenti utilizzati devono essere sensibili ed i loro risultati non essere eccessivamente operatore-dipendenti. La Expanded Disability Status Scale (EDSS; fig. 3) è lo strumento maggiormente utilizzato per la valutazione delle strategie terapeutiche nella SM, sebbene vi siano problemi di riproducibilità (soggettività inter-operatore) e la valutazione della funzione degli arti superiori e del declino cognitivo risulti inadeguata (Kurtzke, 1983).

Fig. 3. Scala EDSS

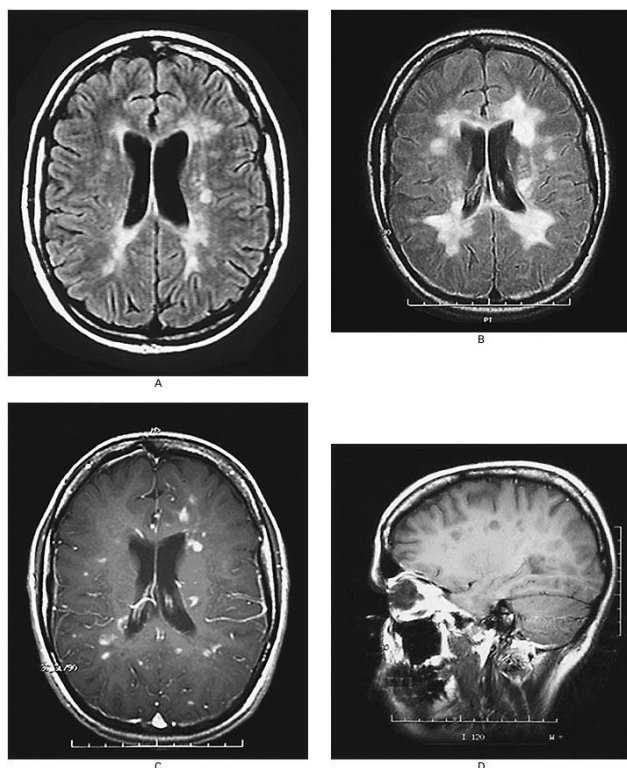


Sviluppi più recenti, che si devono alla National MS Society's Clinical Outcomes Task Force in MS, hanno portato allo sviluppo di uno strumento più sensibile: il Multiple Sclerosis Functional Composite (MSFC; Fischer et al., 1999). Il MSFC fornisce una misura più obiettiva della funzione degli arti inferiori, di quelli superiori e dei movimenti fini e delle funzioni cognitive. Lo strumento si compone di tre test che misurano la deambulazione (test dei 25 passi), la destrezza manuale (test dei 9 pioli) e le funzioni cognitive (Paced Auditory Serial Additional Test, PASAT) su una scala continua. Il MSFC si è dimostrato più sensibile come strumento di follow-up rispetto all'EDSS e, sia durante che dopo il trattamento con metilprednisolone (terapia d'elezione dell'episodio acuto), più preciso nel valutare il recupero clinico (Patzold et al., 2002). Il MSFC risulta più predittivo dell'esame clinico e della RM nei pazienti con forma clinica intermittente-remittente e offre una sensibilità maggiore nel valutare la progressione della malattia e gli effetti di nuove Terapie di Modifica del Decorso (TMD). Il MSFC ha ottenuto validazione con la Risonanza Magnetica Nucleare (RM, Kalkers et al., 2001).

La RM si è dimostrata la tecnica più sensibile nella valutazione delle lesioni nella

SM ed è considerata lo strumento più utile per porre diagnosi di SM (Fazekas et al., 1999). La SM provoca lesioni multiple (placche) a livello del SNC e del midollo spinale nel contesto della sostanza bianca e della grigia (fig.4). Dal punto di vista istologico queste aree possono essere eterogenee, in relazione alla loro età, stato di infiammazione, gravità della demielinizzazione e grado di rimielinizzazione (Trapp et al., 1999). La RM consente di valutare le lesioni in vivo, e permette di distinguere le lesioni di vecchia data dai fenomeni infiammatori recenti nel SNC. Le lesioni in T2 sono riscontrate frequentemente in pazienti con SM, mentre le immagini in T1 sono meno sensibili per le lesioni, tranne che per quelle acute (Scheltens et al., 1998). Studi di correlazione hanno dimostrato che le lesioni che captano contrasto (gadolinio) in immagini T1 corrispondono a nuovi infiltrati di infiammazione (Nesbit et al., 1991).

Fig. 4. RM di un soggetto affetto da SM. Immagini pesate in T2 e T1 dopo somministrazione di mezzo di contrasto

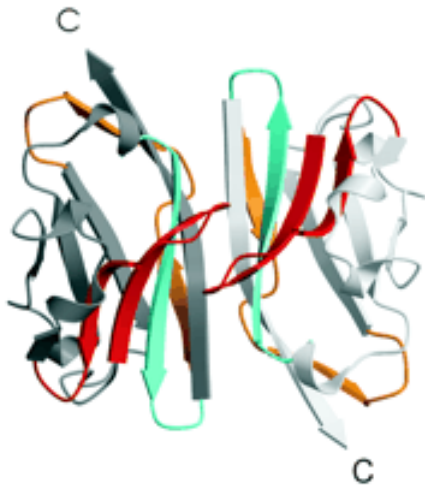


Diversi studi hanno indagato la relazione intercorrente tra i parametri di misura immunologici ottenuti da campioni di siero, urine e liquido cerebrospinale (CSF) ed i reperti clinici di attività e di progressione di malattia nella SM. Tali studi hanno valutato sottotipi delle cellule T (comprese le popolazioni clonali di T che rispondono ad antigeni della mielina), mediatori solubili o prodotti dell'infiammazione (come il Tumor Necrosis Factor, TNF α , le interleuchine e la neopterinina; Giovannoni et al., 1997) e gli autoanticorpi. Recentemente la presenza di anticorpi sierici diretti contro la mielina è stata riportata come predittore di conversione da una Sindrome Clinica Isolata (CIS) alla SM clinicamente definita (Berger et al., 2003). Purtroppo un significativo pattern di associazione con l'attività di malattia non è stato ancora trovato: risultati incoraggianti ottenuti da qualche laboratorio non sono stati replicati.

Diversi antigeni della mielina possono essere bersaglio per l'autoimmunità nella SM, come la Glicoproteina Mielinica Oligodendrocitica (MOG; fig. 5) e un glicolipide maggiore del SNC, il galattocerebroside (GalC). Sia la MOG che il GalC sono estremamente encefalogenici in diversi modelli di encefalomielite autoimmune sperimentale (EAE), il modello animale della SM (von Büdingen et al., 2001; Moore et al., 1984; Raine et al., 1981). Il coinvolgimento patogenetico degli autoanticorpi diretti contro la mielina nella SM è molto meno stabilito, poiché il titolo anticorpale contro le proteine della mielina non differisce significativamente tra controlli e affetti (Lindert et al., 1999; Reindl et al., 1999; Lampasona et al., 2004; Mantegazza et al., 2004; Rostami et al., 1987; Kasai et al., 1986). Nuove specificità anticorpali sono state studiate nella SM mediante l'utilizzo di proteine ricombinanti (Almeras et al., 2004). L'utilizzo di tali tecniche non consente l'esposizione di epitopi necessari all'instaurarsi della reazione antigene-anticorpo, come oligosaccaridi o regioni soggette a modifiche post-traduzionali (principalmente di glicosilazione; Doyle & Mamula, 2001). I differenti risultati ottenuti dai diversi gruppi di ricerca può pertanto trovare ragione nell'utilizzo di antigeni diversi come peptidi lineari, proteine ricombinanti o naturali (Mantegazza et al., 2004). Nonostante tali risultati, gli

anticorpi anti-mielina sono stati proposti come marker predittivo di patologia (Berger et al., 2003).

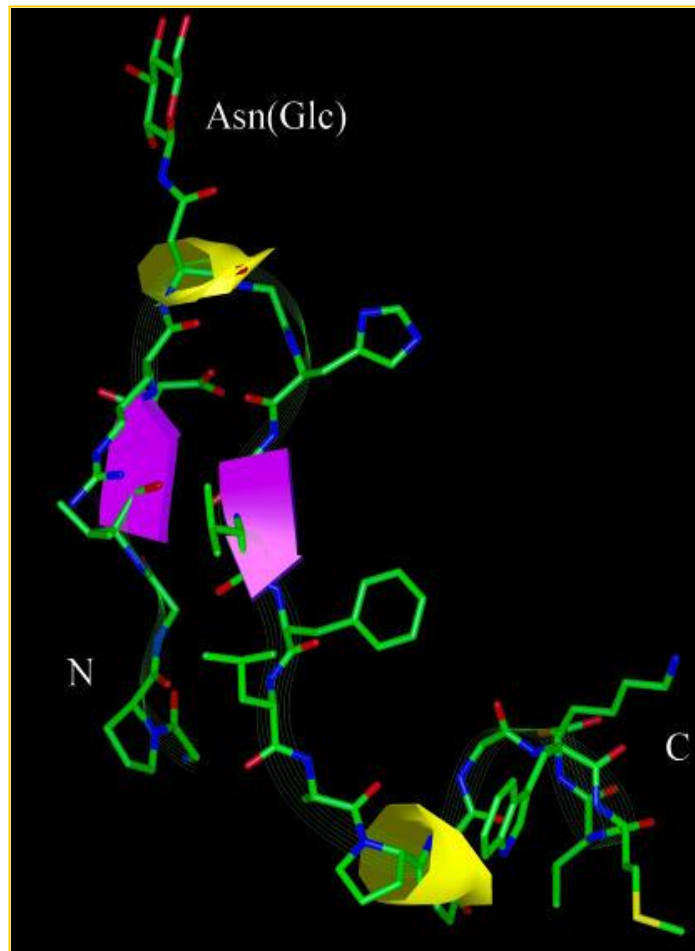
Fig. 5. Struttura della MOG



Il ruolo dei peptidi glicosilati nello studio della risposta anticorpale nella SM è ben noto (Mazzucco et al., 1999; Carotenuto et al., 2001). In particolare si sono dimostrati di grande utilità antigeni sintetici che espongono particolari epitopi (Carotenuto et al., 2001).

È stato di recente sintetizzato un glicopeptide sintetico, il CSF114(Glc), che contiene gli stessi residui amminoacidici di [Asn31(Glc)]hMOG(30-50) (Lolli et al., 2005a). Esso è caratterizzato da una struttura beta secondaria che espone Asn(Glc) sulla punta della beta elica (fig.6). CSF114(Glc) ha mostrato un alto titolo anticorpale nei sieri di pazienti con SM che presentavano anticorpi contro [Asn31(Glc)]hMOG(30-50).

Fig. 6. Struttura del CSF114(Glc)



È stato condotto uno studio preliminare per stabilire la prevalenza nel siero di anticorpi anti-CSF114(Glc) in pazienti con SM (Lolli et al 2005b). Gli anticorpi IgM contro il CSF114(Glc) sono stati trovati nel 30% dei pazienti con SM intermittente-remittente e nel 9% di quelli con la forma secondariamente progressiva. L'adsorbimento degli anticorpi IgM al CSF114(Glc) era più alto nei pazienti con SM rispetto ai controlli. Questi risultati preliminari suggeriscono che lo studio degli anticorpi contro il CSF114(Glc) può essere un nuovo, potenziale marker immunologico di SM. Resta da valutare se i livelli di CSF114(Glc) si possano correlare con la durata di malattia, la disabilità, il differente decorso della malattia e il trattamento.

In conclusione, CSF114(Glc) viene considerato come l' antigene sintetico migliore per valutare il titolo anticorpale mediante SP-ELISA nel siero di pazienti con SM. Studi ulteriori sono necessari per stabilire se CSF114(Glc) possa essere usato per il follow-up della progressione nei pazienti SM. Se l'incremento della risposta all'antigene sintetico glicosilato concordasse con le ricadute, il metodo potrebbe rappresentare uno strumento utile per stabilire una terapia personalizzata (Papini et al., 2004; Peroni et al., 2004; Papini, 2005; Carotenuto et al., 2001; Papini et al., 2005; Matsoukas et al., 2005).

Lo scopo del presente studio è di monitorare un gruppo di pazienti con SM intermittente-remittente per stabilire se la progressione di malattia, valutata clinicamente e mediante RM, sia correlata con i livelli sierici di CSF114(Glc).

Materiali e Metodi

Il nostro Dipartimento è un Centro di Riferimento per lo studio della SM. Allo stato i pazienti afferenti sono circa 800, seguiti in regime di Day Hospital programmato con cadenza mensile .

I pazienti sono affetti principalmente da forme sporadiche, ma una parte di essi presenta forme familiari. I dati demografici e clinici sono raccolti in un database elettronico. Di recente abbiamo iniziato la raccolta di campioni di DNA di pazienti affetti da SM. Il nostro centro è coinvolto in diversi trial clinici che hanno come obiettivo la valutazione dell'efficacia dei nuovi trattamenti farmacologici. Siamo impegnati, inoltre, in protocolli che valutano la validità e l'utilità di nuove strategie diagnostiche nella SM.

In accordo con lo scopo del presente lavoro sono stati arruolati, al 1 ottobre 2008, 160 pazienti affetti da SM-RR. Essi sono stati suddivisi in 3 gruppi:

1. pazienti in trattamento con IFN Beta 1a 30 mcg, i.m., in monosomministrazione settimanale in terapia da 6-12 mesi
2. pazienti in trattamento con IFN Beta 1a 44 mcg, s.c., in triplice somministrazione settimanale in terapia da 6-12 mesi
3. pazienti non in trattamento (naive) e che inizino contemporaneamente il trattamento al punto 2)

Il periodo indicato di 6-12 mesi di trattamento è considerato un periodo finestra in cui si osserva un'alta attività di malattia (clinica e radiologica), un basso/nullo titolo di anticorpi anti IFN ed una adeguata tolleranza della terapia di modifica del decorso da parte del paziente (ridotti effetti collaterali sistemici e locali).

Prima dell'arruolamento ciascun paziente ha fornito un consenso informato scritto nel rispetto dei principi della Dichiarazione di Helsinki. I criteri di inclusione/esclusione sono i seguenti:

Criteri di inclusione

1. pazienti affetti da SM-RR (in accordo ai criteri di McDonald's et al., 2001)
2. Età compresa tra 18 e 50 anni
3. Punteggio EDSS tra 1 e 5.5
4. Consenso informato scritto

Criteri di esclusione

1. Qualsiasi patologia diversa dalla SM che possa spiegare meglio i segni e sintomi del paziente
2. SM primariamente progressiva
3. SM secondariamente progressiva
4. Patologie mediche o psichiatriche che compromettano la capacità di fornire un consenso informato, di seguire il protocollo o di completare lo studio
5. Accertata ipersensibilità al gadolinio
6. incapacità a sottoporsi a RM
7. una ricaduta che inizi 30 giorni prima dello screening o tra lo screening e il baseline
8. test di gravidanza positivo

I pazienti sono stati valutati in follow-up per 24 mesi. Al baseline sono stati raccolti i dati anamnestici, è stato eseguito un esame obiettivo generale, sono stati valutati i parametri vitali e si è proceduto alla raccolta delle caratteristiche della storia clinica della SM (data e modalità di esordio, durata di malattia, decorso di malattia, numero di poussées totali, nei 2 anni e nei 3 mesi precedenti all'arruolamento). È stato eseguito l'esame obiettivo neurologico valutando il livello funzionale secondo il sistema EDSS e mediante MSFC. È stata eseguita successivamente una valutazione neuropsicologica che comprende i seguenti test (batteria di Rao, Rao et al., 1991): Brief Intelligence Test , Selective Reminder Test, Spatial Recall Test, Symbol Digit Modalities Test, Selective Reminder Test Delayed Recall, Spatial Recall Test Delayed Recall, Word List Generation, Stroop Color Word Interference Test. I pazienti sono stati poi sottoposti a prelievo ematico per l'esecuzione dei test di laboratorio previsti dallo studio (su siero: elettroliti, enzimi epatici, proteine, colesterolo totale e frazionato, ormoni e anticorpi tiroidei, proteina C reattiva, emocromo con formula, anticorpi anti CSF 114(Glc) e ANA; su urine: analisi urine standard). I sieri sono stati conservati in quattro Eppendorf da 1,5 ml (6 ml totali) a -80°C . Ciascun siero è stato analizzato per la valutazione del titolo di autoanticorpi anti CSF 114(Glc) mediante ELISA. Infine ciascun soggetto arruolato è stato sottoposto ad una RM senza e con mezzo di contrasto (gadolinio). La valutazione neurologica e di laboratorio è stata ripetuta con cadenza trimestrale; i test neuropsicologici sono stati eseguiti con cadenza semestrale, mentre la RM è invece stata ripetuta al 6°, al 12° e al 24° mese (fig. 7) .

Fig. 7. Flow-chart dello studio

Parametri	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Consenso informato	X								
Anamnesi	X								
Dati demografici	X								
Esame obiettivo	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Segni vitali	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esame neurologico*	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Esami di laboratorio	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Test neuropsicologici	X		X		X		X		X
RM	X		X		X				X

Gli endpoint primari per la valutazione statistica sono:

- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) valutato al baseline e numero di ricadute nella storia clinica ; correlazione tra il titolo anticorpale ed il numero di ricadute verificatesi durante il follow-up per ciascuna valutazione (titolo anticorpale nel trimestre indice/poussée occorsa nel trimestre corrispondente)
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e numero delle lesioni in T1 che assumono contrasto valutati al baseline e al 6°, 12° e 24° mese

Gli endpoint secondari sono:

- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e EDSS
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e MSFC
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e subscore dei sistemi funzionali (EDSS e MSFC)
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e durata di malattia
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) ed età
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e sesso
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e risultati dei test neuropsicologici
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e differenti regimi terapeutici di interferone beta 1A e durata di trattamento
- Correlazione tra titolo di autoanticorpi anti CSF114(Glc) e altri reperti di RM [numero di lesioni in T1 e T2 per ciascun paziente dopo 12 mesi di trattamento; variazioni in volume delle lesioni totali T1 dopo 12 mesi di trattamento; proporzione di pazienti senza incremento del volume totale delle lesioni dopo 12 mesi di trattamento; variazioni nel volume (atrofia corticale, variazioni della sostanza bianca e della grigia) dopo 12 mesi di trattamento]

Preparazione del CSF114(Glc)

Il CSF114(Glc) è un glicopeptide sintetico costituito da 21 aminoacidi che presenta una porzione glicidica N-linked ad un residuo di asparagina. La sequenza del peptide ed il suo specifico pattern di glicosilazione (Papini et al., 2003) è stato selezionato in specifiche librerie di glicopeptidi sintetici che presentassero la caratteristica di legare specificamente gli autoanticorpi nel siero dei soggetti affetti da SM, utilizzando un saggio immunoenzimatico. Il glicopeptide è stato preparato mediante un processo di sintesi solid-phase e purificato in seguito a cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC). Le caratteristiche e la purezza del prodotto finale è stata valutata mediante spettrometria di massa e HPLC analitica (Papini et al., 2002).

Determinazione degli anticorpi nel siero mediante ELISA

Novantasei piastre in polistirene per ELISA (Limbro Titertek, ICN Biomedicals, Inc., Aurora, Ohio, USA) sono state riempite con 1 Ag/pozzetto di CSF114(Glc) in un buffer di carbonato 0.05M (pH 9.6) e incubate a 4°C per una notte. Dopo 5 lavaggi in un sistema automatizzato (Columbus, Tecan, Austria) con soluzione salina contenente 0.05% Tween 20, le piastre sono state bloccate con siero di feto di vitello (FCS) al 10% in salina Tween (100 microl/pozzetto) a temperatura ambiente (RT) per 60 minuti. Il siero diluito 1:100 e 1:2000 è stato incubato a 4°C per 16 h in siero di feto di vitello in salina Tween al 10% (2 diluizioni sono state testate per ciascun siero). Dopo 5 lavaggi, sono stati aggiunti 100 micro/pozzetto di fosfatasi alcalina coniugata con anticorpi con specifica affinità anti IgM o IgG Fab2 umana (Sigma, I0759/I9885, Saint Louis, Missouri, USA), diluiti 1:400 (anti-IgM) o 1:2000 (anti-IgG) in salina Tween/FCS. Dopo 3 h di incubazione a RT e 5 lavaggi, sono stati aggiunti 100 microl di soluzione di substrato composta da 2mg/ml di p-nitrofenilfosfatasi (pNPP tablets N2765, Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in 10% di buffer di dietanolamina. La reazione è stata bloccata dopo 30 minuti con 50 microl

di 1M di NaOH e letto l'adsorbimento in un lettore ELISA multi-canale a 405 nm (Sunrise, Tecan, Austria). Le condizioni sperimentali sono state testate in esperimenti preliminari. Ciascuna piastra conteneva almeno 2 controlli positivi e 2 negativi. Ciascun siero è stato valutato singolarmente a 2 diluizioni (1:100 e 1:2000) per controllare il parallelismo e la diluizione dell'adsorbimento dell'anticorpo tra il campione di riferimento positivo e quelli sconosciuti. Anticorpi murini coniugati anti IgG umane specifici per subclassi (IgG1 9052-04, IgG2 9060-04, IgG3 9210-04, IgG4 9200-04, Southern Biotech, Birmingham, Alabama, USA) sono stati utilizzati (diluizione 1:1000) per valutare la specifica risposta anticorpale delle subclassi di IgG. Il livello anticorpale valutato tramite ELISA è stato espresso sia in valore di adsorbimento ad una diluizione di 1:100 sia come titolo (diluizione che raggiunge il valore medio più tre deviazioni standard). La variabilità analitica del saggio è stata valutata ripetendo lo stesso test (determinazione delle IgM e delle IgG) in una stessa corsa (4 sieri, 20 determinazione ciascuno) o in esperimenti differenti (4 sieri, 10 esperimenti in giorni diversi). Il coefficiente di variazione intra- ed inter-saggio (SE/mean) è stato inferiore al 10% (IgM) o inferiore al 5% (IgG). I valori di cut-off impiegati sono stati stabiliti in una ROC analysis confrontando differenti cut-off per sensibilità, specificità e likelihood ratios (Habbema et al., 2002). Il cut-off per le IgM è stato stabilito (adsorbimento 0.7) ad un livello che massimizzi sensibilità (26%), specificità (94%) e likelihood ratios. Il cut-off per le IgG è stato stabilito arbitrariamente ad adsorbimento 1.

Risultati

Al 1° ottobre 2008 sono stati arruolati 160 pazienti. I soggetti maschi sono 44, quelli di sesso femminile 116 (F:M=2.63:1). La numerosità nei tre bracci è pari a 59 soggetti nel gruppo IFN Beta 1a 30 mcg, 47 in quello IFN Beta 1a 44 mcg e i restanti 54 nel gruppo naive (tab. 1).

Tab.1. Gruppi di trattamento

Terapia di modifica del decorso (DMT)	n
IFN beta 1a 30 mcg	59
IFN beta 1a 44 mcg	47
Naive	54
Tot	160

L'età media all'esecuzione della RM basale è pari a 36.28 ± 8.94 (range 15-60); la durata media di malattia, espressa in anni, è pari a 7.72 ± 6.84 (range 0-30). I tre gruppi risultano omogenei per le caratteristiche demografiche, con una tendenza del gruppo IFN beta 1a 30 mcg ad un'età maggiore al tempo della RM basale. Per quanto concerne le caratteristiche cliniche al baseline, l'EDSS medio è pari a 2.45 ± 0.75 (range 2-5), le poussées totali presentano un valore medio pari a 4.29 ± 3.36 (range 1-22), mentre quelle nei 2 anni precedenti (parametro utilizzato di attività di malattia) è pari a 1.61 ± 1.02 (range 0-5). Il numero medio di placche che assumono contrasto al baseline è pari a 0.71 ± 1.83 (range 0-14; tab.2). I tre gruppi appaiono omogenei per le caratteristiche cliniche, con una tendenza ad un maggior numero di placche che assumono contrasto nei soggetti naive ed un minor numero di poussées nei 2 anni

precedenti l'arruolamento per i soggetti del gruppo IFN beta 1a 30 mcg. I soggetti che presentano un valore di adsorbimento IgM al baseline uguale o superiore al cut-off di 0.70 sono circa il 40%.

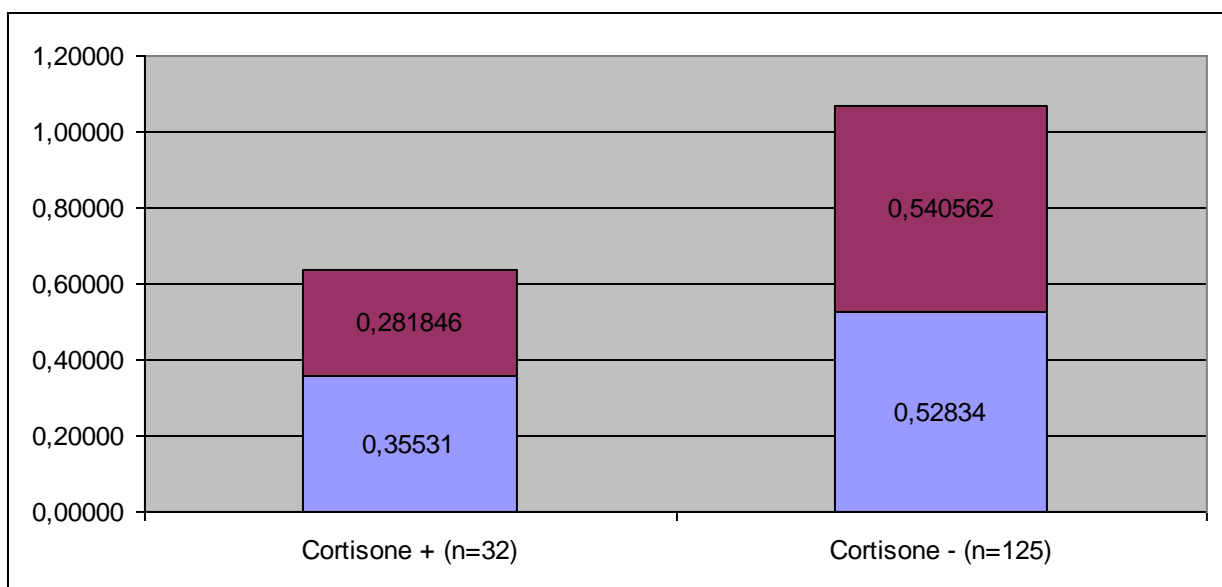
Tab. 2. Caratteristiche cliniche della popolazione

Donne (%)	116	(72.5)
Età all'arruolamento, media \pm d.s. (range)	36.28 \pm 8.94	(15 - 60)
Durata di malattia, media \pm d.s. (range)	7.72 \pm 6.84	(0 - 30)
EDSS basale, media \pm d.s. (range)	2.45 \pm 0.75	(2 - 5)
Poussées totali, media \pm d.s. (range)	4.29 \pm 3.36	(1 - 22)
Poussées 2aa, media \pm d.s. (range)	1.61 \pm 1.02	(0 - 5)
Lesioni Gd+ al baseline, media \pm d.s. (range)	0.71 \pm 1.83	(0 - 14)
Titolo IgM al baseline, media \pm d.s. (range)	0.81 \pm 0.76	(0.10 - 3.76)
Titolo IgG al baseline, media \pm d.s. (range)	0.49 \pm 0.50	(0.10 - 3.21)

Sono state condotte due analisi di correlazione (rho di Spearman e r Pearson) tra i principali parametri clinici ed il titolo anticorpale IgM ed IgG. Il titolo anticorpale non correla con il sesso, la durata di malattia e la gravità di essa espressa come numero totale di poussées in anamnesi, poussées nei due anni precedenti l'arruolamento e poussées in corso di follow-up. L'EDSS non correla con il titolo anticorpale al baseline e alle rispettive misurazioni trimestrali.

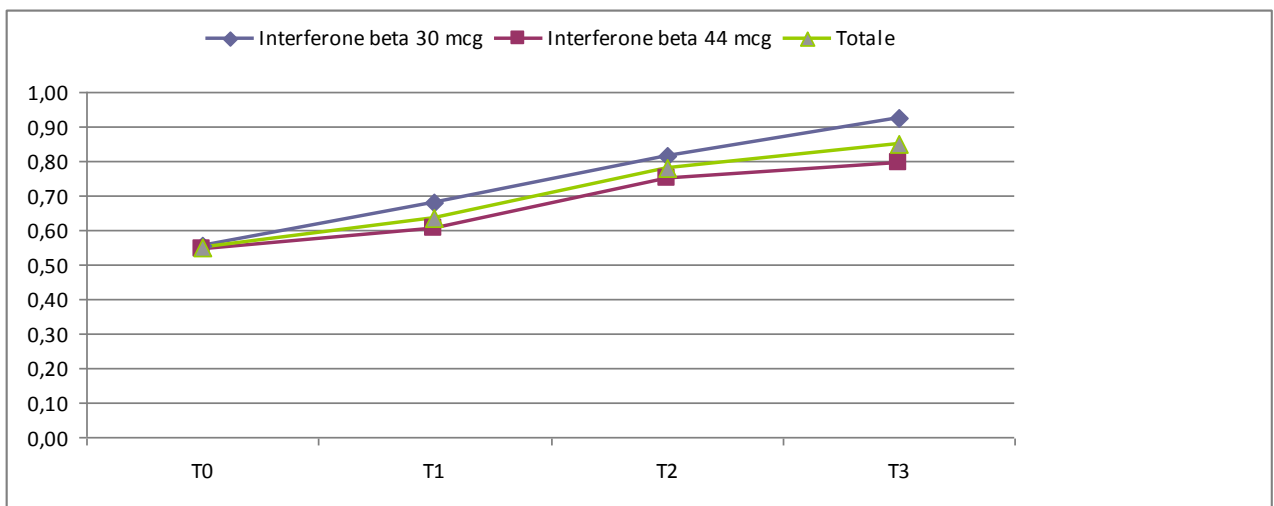
La terapia con metilprednisolone (3-5 g ev per episodio acuto) è associata in maniera statisticamente significativa con i valori anticorpali. I 32 soggetti che hanno assunto cortisone come trattamento della poussèe presentano un livello anticorpale IgG medio (0.35 ± 0.28) significativamente più basso ($t= 2.49$, $p<0.05$) rispetto ai 125 soggetti che non hanno assunto cortisone (valore medio 0.53 ± 0.54 ; tab.3).

Tab. 3. Confronto del titolo anticorpale IgG in relazione alla somministrazione di cortisone

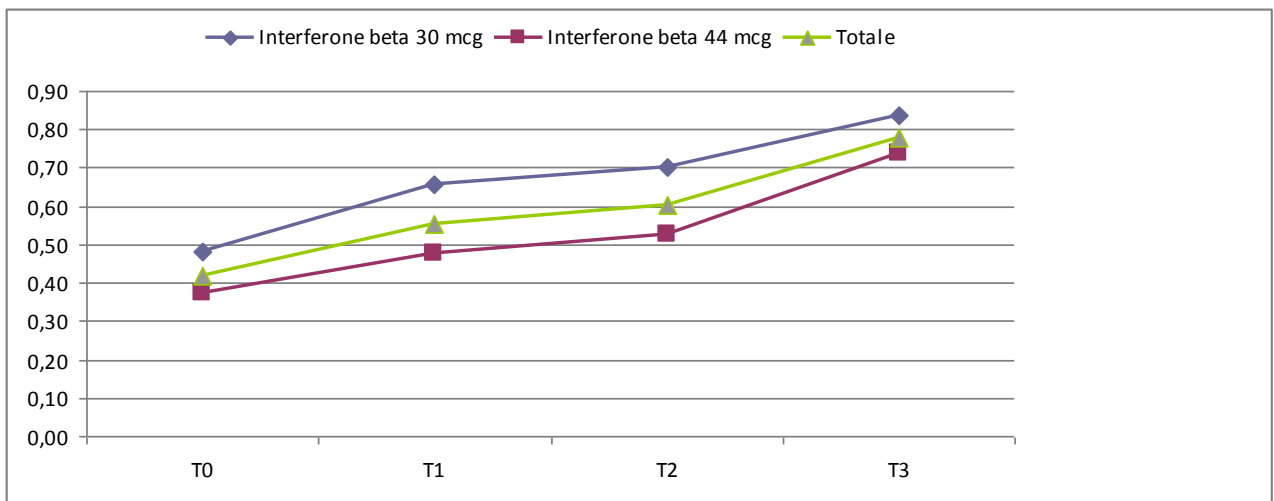


È stata successivamente condotta una MANOVA per misure ripetute per correlare il titolo anticorpale ottenuto a ciascuna misurazione con i parametri clinici valutati alla visita di follow-up corrispondente. Il titolo IgM ed IgG aumenta in maniera statisticamente significativa in funzione del tempo (IgM $F=17.43$, IgG $F=19.38$, $p<0.01$). Il tipo di TMD non influenza il titolo anticorpale (tab. 4, 5).

Tab. 4. Titolo IgM in funzione al tempo



Tab. 5. Titolo IgG in funzione del tempo



Discussione

I dati esposti sono preliminari in quanto il follow-up dei pazienti è in corso. Il nostro studio è il primo studio longitudinale su ampia casistica di correlazione tra il titolo anticorpale anti-CSF114(Glc) ed i principali parametri di misurazione del decorso di malattia nella SM. Allo stato non sono stati elaborati i dati di neuroimaging (ad eccezione dell'impregnazione) e quelli neuropsicologici in accordo ai principali endpoint dello studio.

La popolazione con un titolo anticorpale IgM superiore od uguale al cut-off è pari al 40% circa degli arruolati. Tale percentuale risulta in linea con quella presente in letteratura per la SM-RR (30%, Lolli et al., 2005).

I risultati delle analisi statistiche condotte sembrano indicare che il titolo anticorpale anti CSF114(Glc) non è rilevante nella valutazione del decorso della SM. Gli anticorpi delle classi IgM ed IgG non correlano infatti con i principali parametri clinici. Non è stato possibile isolare un sottogruppo all'interno della nostra popolazione che presentasse un peculiare pattern immunologico e clinico; si evidenzia, purtuttavia, un aumento del titolo anticorpale in funzione del tempo che sembra indipendente dalla storia clinica e dal TMD somministrato. Il titolo sembra altresì influenzato dalla terapia cortisonica, con una riduzione dei livelli di IgG nei soggetti trattati.

In conclusione, il nostro studio non ha evidenziato correlazioni tra il dosaggio degli anticorpi anti CSF114(Glc) ed i parametri clinici del decorso della SM; ciò suggerisce che il CSF114(Glc) non possa essere allo stato utilizzato come marker del decorso della SM. Tale dato non sorprende alla luce delle ben note difficoltà di correlazione tra dati clinici e immunologici nella SM (Karni et al., 1999). Il nostro risultato dovrà essere confermato alla conclusione del follow-up e dall'analisi dei dati neuropsicologici e di neuroimaging in accordo agli endpoint dello studio clinico.

Bibliografia

1. Almeras, L., Lefranc, D., Drobecq, H., De Seze, J., Dubucquoi, S., Vermersch, P., Prin, L., 2004. New antigenic candidates in multiple sclerosis: identification by serological proteome analysis. *Proteomics* 4, 2184– 2194.
2. Barnett MH, Prineas JW, Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion, *Ann Neurol*, 55, (2004), pp. 458—468
3. Berger T, Rubner N, Schautzer F, Egg R, Ulmer H, Mayringer I, et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event, *N Engl J Med*, 349, (2003), pp. 139—145
4. Berger T., Rubner P., Schautzer F., Egg R., Ulmer H., Mayringer I., et al. Antimyelin antibodies as a predictor of clinically definite multiple sclerosis after a first demyelinating event, *N Engl J Med*, 349, (2003), pp. 139—145
5. Bjartmar C, Kidd G, Mork S, Rudick R, Trapp BD, Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients, *Ann Neurol*, 48, (2000), pp. 893—901
6. Carotenuto, A.M. D'Ursi, E. Nardi, A.M. Papini and P. Rovero. "Conformational Analysis of a Glycosylated Human Oligodendrocyte Glycoprotein Peptide Epitope Able to Detect Antibody Response in Multiple Sclerosis" *J. Med. Chem.* (2001), 44, 2378-2381.
7. Charcot M, Histology of the sclerotic plaque, *Gaz Hosp*, 141, (1868), pp. 554—558
8. Doyle, H.A., Mamula, M.J., 2001. Post-translational protein modifications in antigen recognition and autoimmunity. *Trends Immunol.* 22, 443– 449
9. Fazekas F, Barkhof F, Filippi M, Grossman RI, Li DK, McDonald WI, McFarland HF, Paty DW, Simon JH, Wolinsky JS, Miller DH. The contribution of magnetic resonance imaging to the diagnosis of multiple sclerosis. *Neurology* 1999 53:448-56.

10. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH, Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions, *Brain*, 120, (1997), pp. 393—399
11. Fischer JS, Rudick RA, Cutter GR, Reingold SC. The multiple sclerosis functional composite measure (MSFC): an integrated approach to MS clinical outcome assessment. *Mult Scler* 5: 244–250, 1999.
12. Giovannoni G, Lai M, Kidd D, Thorpe JW, Miller DH, Thompson AJ, Keir G, Feldmann M, Thompson EJ, Daily urinary neopterin excretion as an immunological marker of disease activity in multiple sclerosis, *Brain*, 120, (1997), pp. 1—13
13. Greenfield J, King L, Observations on the histopathology of the cerebral lesions in disseminated sclerosis, *Brain*, 59, (1936), pp. 445—458
14. Kalkers NF, Bergers L, de Groot V, Lazeron RHC, van Walderveen MAA, Uitdehaag BMJ, et al. Concurrent validity of the MS Functional Composite using MRI as a biological disease marker. *Neurology* 56: 215–219, 2001.
15. Karni, A., Bakimer-Kleiner, R., Abramsky, O., Ben-Nun, A., 1999. Elevated levels of antibody to myelin oligodendrocyte glycoprotein is not specific for patients with multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 56, 311– 315.
16. Kasai N., Pachner A.R., Yu R.K., Anti-glycolipid antibodies and their immune complexes in multiple sclerosis, *J Neurol Sci*, 75, (1986), pp. 33—42
17. Kornek B, Storch MK, Weissert R, et al. Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions, *Am J Pathol*, 157, (2000), pp. 267—276
18. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 33: 1444–1452, 1983.
19. Lampasona V., Franciotta D., Furlan R., Zanaboni S., Fazio R., Bonifacio E., et al. Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects, *Neurology*, 62, (2004), pp. 2092—2094

20. Lindert R.B., Haase C.G., Brehm U., Linington C., Wekerle H., Hohlfeld R., Multiple sclerosis: B- and T-cell responses to the extracellular domain of the myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Brain*, 122, (1999), pp. 2089—2100
21. Lolli, B. Mazzanti, M. Pazzagli, E. Peroni, M.C. Alcaro, R. Lanzillo, V. Brescia Morra, L. Santoro, C. Gasperini, S. Galgani, M.M. D' Elios, V. Zipoli, S. Sotgiu, M. Pugliatti, P. Rovero, M. Chelli and A.M. Papini "The glycopeptide CSF114(Glc) detects serum antibodies in multiple sclerosis" *J Neuroimmunol.* (2005b) 167(1-2), 131-137
22. Lolli, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, B. Mazzanti, A.M. D'Ursi, E. Novellino, M. Pazzagli, L. Lovato, M.C. Alcaro, E. Peroni, M.C. Pozo-Carrero, F. Nuti, L. Battistini, G. Borsellino, M. Chelli, P. Rovero and A.M. Papini "An N-glucosylated peptide detecting disease-specific auto-antibodies, biomarkers of Multiple Sclerosis" *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* (2005a) 102(29), 10273-10278.
23. Lovas G, Szilagyi N, Majtenyi K, Palkovits M, Komoly S, Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques, *Brain*, 123, (2000), pp. 308—317.
24. Mancardi G, Hart B, Roccatagliata L, et al. Demyelination and axonal damage in a non-human primate model of multiple sclerosis, *J Neurol Sci*, 184, (2001), pp. 41—49
25. Mantegazza R., Cristaldini P., Bernasconi P., Baggi F., Pedotti R., Piccini I., et al. Anti-MOG autoantibodies in Italian multiple sclerosis patients: specificity, sensitivity and clinical association, *Int Immunol*, 16, (2004), pp. 559—565
26. Matsoukas, V. Apostolopoulos, H. Kalbacher, A.M. Papini, T. Tselios, K. Chatzantoni, et al., "Design and synthesis of a novel potent myelin basic protein epitope 87-99 cyclic analogue: enhanced stability and biological properties of mimics render them a potentially new class of immunomodulators" *J. Med. Chem.* (2005) 48, 1470-80

27. Mazzucco, S., Mata, S., Vergelli, M., Fioresi, R., Nardi, E., Mazzanti, B., Chelli, M., Lolli, F., Ginanneschi, M., Pinto, F., Massacesi, L., Papini, A.M., 1999. A synthetic glycopeptide of human myelin oligodendrocyte glycoprotein to detect antibody responses in multiple sclerosis and other neurological diseases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 167–172.
28. McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B.Y. and Wolinsky, J.S. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50, 121-127.
29. Moore G.R., Traugott U., Farooq M., Norton W.T., Raine C.S., Experimental autoimmune encephalomyelitis: augmentation of demyelination by different myelin lipids, *Lab Invest*, 51, (1984), pp. 416—424
30. Nesbit GM, Forbes GS, Scheithauer BW, Okazaki H, Rodriguez M (1991) Multiple sclerosis: histopathologic and MR and/or CT correlation in 37 cases at biopsy and three cases at autopsy. *Radiology* 180:467–474
31. Papini, B. Mulinacci, A. Carotenuto, B. Bonetti, G. Sabatino, E. Peroni, F. Nuti, M.C. Alcaro, M.C. Pozo-Carrero, B. Mazzanti, M. Pazzagli, L. Massacesi, L. Battistini, M. Chelli, P. Rovero and F. Lolli. “MS PepKit: the first diagnostic test to follow-up multiple sclerosis.” In: *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*. M. Chorev & T.K. Sawyer (Eds). American Peptide Society, San Diego, USA, (2004) pp. 942-944.
32. Papini, P. Rovero, M. Chelli, and F. Lolli. “Glycopeptides, their preparation and use in the diagnosis or therapeutic treatment of Multiple Sclerosis”. 2003; PCT Int. Patent Appl. WO03/000733 A2, Italian Patent 0001327122 (27/04/2005). Granted USA Patent (02/08/2005).
33. Papini. "Simple test for Multiple Sclerosis" *Nature Medicine* (2005) 11(1), 13.

34. Patzold T, Schwengelbeck M, Ossege LM, Malin JP, Sindern E. Changes of the MS functional composite and EDSS during and after treatment of relapses with methylprednisolone in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 105: 164–168, 2002.
35. Peroni, F. Lolli, B. Mazzanti, M. Pazzagli, B. Bonetti, J. Hoebeke, M. Chelli, P. Rovero and A.M. Papini. “Isolation and characterization of autoantibodies in multiple sclerosis patients sera: towards a novel apheresis treatment.” In: *Peptide Revolution: Genomics, Proteomics & Therapeutics*. M. Chorev & T.K. Sawyer (Eds). American Peptide Society, San Diego, USA, (2004), pp. 75-76.
36. Raine C.S., Traugott U., Farooq M., Bornstein M.B., Norton W.T., Augmentation of immune-mediated demyelination by lipid haptens, *Lab Invest*, 45, (1981), pp. 174—182
37. Rao SM, Leo GJ, Bernardin L, Unverzagt F., Cognitive dysfunction in multiple sclerosis. I. Frequency, patterns, and prediction. *Neurology*. 1991 Dec;41(12):2014-5.
38. Reindl M., Linington C., Brehm U., Egg R., Dilitz E., Deisenhammer F., et al. Antibodies against the myelin oligodendrocyte glycoprotein and the myelin basic protein in multiple sclerosis and other neurological diseases: a comparative study, *Brain*, 122, (1999), pp. 2047—2056
39. Rostami A.M., Burns J.B., Eccleston P.A., Manning M.C., Lisak R.P., Silberberg D.H., Search for antibodies to galactocerebroside in the serum and cerebrospinal fluid in human demyelinating disorders, *Ann Neurol*, 22, (1987), pp. 381—383
40. Scheltens P, van Waesberghe JH, Ravid R, Valk J, Polman CH, Barkhof F (1998), Histopathologic correlate of hypointense lesions on T1-weighted spin-echo MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 50:1282–1288
41. Trapp BD, Bo L, Mork S, Chang A (1999) Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol* 98:49–56

42. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L, Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis, *N Engl J Med*, 338, (1998), pp. 278—285
43. von Büdingen H.C., Villoslada P., Ouallet J.C., Hauser S.L., Genain C.P., Immune responses against the myelin/oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune demyelination, *J Clin Immunol*, 21, (2001), pp. 155—170
44. Wingerchuk DM, Lucchinetti CF, Noseworthy JH. Multiple Sclerosis: current pathophysiological concepts. *Lab Invest* 81: 263–281, 2001.
45. Zhu B, Luo L, Moore GR, Paty DW, Cynader MS, Dendritic and synaptic pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Am J Pathol*, 162, (2003), pp. 1639—1650

Ringraziamenti

Ringrazio il dott. Gianluca Ventrella ed il dott. Mario Quarantelli per il fondamentale aiuto fornitomi nell'analisi statistica dei dati.

Ringrazio inoltre il dott. Vincenzo Brescia Morra per quanto mi ha insegnato nei tanti anni di lavoro assieme.