

B lymfocyty ako cieľ v liečbe sclerosis multiplex

MUDr. Luděk Hochmuth

Ambulancia alergológie a klinickej imunológie, II. interná klinika SZU a FNŠP F. D. Roosevelta, Banská Bystrica

B lymfocyty zohrávajú dôležitú úlohu v patogenéze sclerosis multiplex (SM). K patogenetickým mechanizmom ich pôsobenia patrí prezentácia antigénu, produkcia prozápalových a protizápalových cytokínov, môžu sa diferencovať na plazmatické bunky tvoriace autoprotilátky a podieľať sa na tvorbe meningeálnych folikulárných štruktúr v centrálnej nervovej sústave (CNS). Terapeutickou depléciou prostredníctvom anti-CD20 protilátok dokážeme účinne ovplyvniť priebeh ochorenia. Účinnosť a bezpečnosť tejto liečby pri relaps remitujúcej a primárne progresívnej forme sclerosis multiplex bola potvrdená v klinických skúšaníach.

Kľúčové slová: sclerosis multiplex, B lymfocyty, anti-CD20 monoklonálne protilátky, terapia.

B cells as a target in the treatment of multiple sclerosis

B cells play important role in pathogenesis of multiple sclerosis. Pathogenic mechanisms include antigen presentation, pro- and anti-inflammatory cytokines production, B cells can differentiate to plasmatic cells producing autoantibodies and they can participate on creation of meningeal follicular structures in central nervous system (CNS). We can effectively influence the course of disease by therapeutic depletion through anti-CD20 antibodies. Efficacy and safety of this treatment were demonstrated in clinical studies with relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis, B cells, anti-CD20 monoclonal antibodies, therapy.

Dôkazy o podiele B lymfocytov v patogenéze sclerosis multiplex

V súčasnosti poskytujú viaceré pozorovania dôkazy o významnom podiele B lymfocytov a nimi tvorených autoprotilátok v patogenéze ochorenia. Najzjavnejšími klinickými dôkazmi a dôkazmi z magnetickej rezonancie (MR) je redukcia relapsov a zníženie počtu zápalových lézií pri liečbe zacielenej proti zápalovým mechanizmom, ktoré sú sprostredkované B lymfocytovým radom. Pri selektívnej deplícii B lymfocytov ocrelizumabom, rituximabom (a inými anti-CD20 protilátkami) sa zaznamenal pokles lézií v CNS a spomalenie progresie znešchopenia pri SM (Hauser et al., 2008; Hauser et al., 2015; Montalban et al., 2015; Sorensen et al., 2014). Liečebná výmenná plazmaferéza, prípadne imunoabsorpcia (odstránenie imunoglobulínov a faktorov komplementu) preukázala

účinnosť v terapii relapsov pri SM v niekoľkých menších štúdiách (Koziolek et al., 2012). Naopak, autoprotilátky IgG od 30 % pacientov so sclerosis multiplex vyvolali demyelinizáciu závislú od komplementu alebo poškodenie axónov in vitro. Taktiež B lymfocyty od pacientov so sclerosis multiplex produkovali molekuly in vitro cytotoxické pre oligodendroglia (Lisak et al., 2012).

V post mortem a biopsických vzorkách boli u významného podielu pacientov v niektorých aktívnych léziách preukázané depozity IgG a komplementu (nazvané aj „lézie profilu 2“) (Lucchinetti et al., 2000), títo pacienti profitovali z terapeutického plazmaferézy (Koziolek et al., 2012).

Prozápalové funkcie B lymfocytov v periférii

B lymfocyty sa uplatňujú v patogenéze SM viacerými mechanizmami. Plnia úlohu ako vyso-

ko efektívne antigén prezentujúce bunky. Myelín reaktívne pamäťové B lymfocyty sú prítomné v periférnej krvi u pacientov so SM. Po diferenciácii na plazmablasty a plazmatické bunky môžu B lymfocyty produkovať autoprotilátky. Autoprotilátky spúšťajú od protilátok závislú bunkovú toxicitu (ADCC – antibody dependent cellular cytotoxicity) a aktiváciu komplementu (CDC – complement dependent cytotoxicity) (Mayer, Hohlfeld et Meinel, 2012). U pacientov so sclerosis multiplex sa preukázala vyššia produkcia zápalového IL-6 z B lymfocytov v porovnaní so zdravou populáciou. Táto prozápalová odchýlka nebola pozorovaná v repopulácii B lymfocytov, ktorá sa vytvára po dvanásťmesačnej B bunkovej deplečnej liečbe. Keďže repopulácia B lymfocytov je prevažne zastúpená zrelými naivnými a nezrelými bunkami, prevláda názor, že zvýšená produkcia IL-6 je asociovaná s pamäťovými B lymfocytmi. Pamäťové B lymfocyty účin-

ne podporujú T lymfocyty sprostredkované imunitné mechanizmy; naopak, ich depléciou sa redukuje produkcia IL-17 a prozápalová odpoveď Th17 lymfocytov (Barr, Shen et Brown, 2012). B lymfocyty môžu mať aj regulačné a protizápalové úlohy. Po stimulácii dochádza k produkcii IL-10, ktorý patrí k cytokínom s imunoregulačnými vlastnosťami (Bettelli et al., 1998).

B lymfocyty v CNS

Aj keď úloha B lymfocytov v patogenéze sclerosis multiplex je nepochybná, presné mechanizmy pôsobenia B lymfocytov intratekálne a mechanizmy ich obojstrannej migrácie cez hematoencefalickú bariéru nie sú plne objasnené. Pri blokovaní migrácie mononukleárných buniek z cirkulácie do CNS natalizumabom dochádza k redukcii B bunkovej rady v mozgovomiechovom moku, čo svedčí o ich obojstrannej transmigracii (Von Budingen et al., 2012). B lymfocyty s najvyššou pravdepodobnosťou ovplyvňujú patogenézu SM na oboch stranách hematoencefalickej bariéry. Prítomnosť buniek intratekálne produkujúcich imunoglobulíny potvrdzujú klasické patologické nálezy v tkanive CNS a mozgovomiechovej tekutine (špecifické oligoklonálne pásy, zvýšený IgG kvocient, polyspecifické intratekálne produkované protilátky IgG proti vírusovým antigénom, ako sú osýpky, rubeola, varicella zoster) (Stangel et al., 2013). Pretrvávajúce a pôsobenie B lymfocytov produkujúcich protilátky v CNS je zaistené faktormi vytvárajúcimi prostredie priaznivé pre B lymfocyty. Astrocyty produkujú chemoatraktanty pre B lymfocyty ako CXCL 10, CXCL 13, BAFF (faktor aktivujúci B-lymfocyty) a ďalšie (Krumbholz et al., 2012). CXCL 13 produkovaný v aktívnych léziách pri SM je hlavným faktorom pre migráciu B lymfocytov do zápalového prostredia v CNS. CXCL 13 sa pravdepodobne podieľa na tvorbe meningeálnych B lymfocytových agregátov folikulárnych štruktúr (Serafini et al., 2004).

Anti-CD20 terapia

CD20 molekuly sú exprimované na rade vývojových štádií ľudského B bunkového radu od prekursorových a nezrelých B lymfocytov po naivné a pamäťové B lymfocyty. Nie sú prítomné na kmeňových a pre-B bunkách ani na zreloch plazmatických bunkách, a preto anti-CD20 liečba signifikantne neovplyvní normálnu imunitnú reaktivitu. Monoklonové

protilátky zacielené na CD20 molekulu môžu redukovat populáciu B lymfocytov mechanizmami cytotoxicity závislej od komplementu (CMC), bunkovej cytotoxicity závislej od protilátok (ADCC) a indukciou B lymfocytovej apoptózy. Tri z týchto protilátok boli skúšané v liečbe SM. Rituximab je chimerická protilátka schválená na liečbu B lymfómov a reumatoidnej artritídy. Ocrelizumab je humanizovaná protilátka, ktorá sa viaže na odlišný epitop ako rituximab a spôsobuje depléciu B lymfocytov primárne cez ADCC mechanizmus s možnou vyššou účinnosťou ako pri rituximabe. Ofatumumab je plne humánna protilátka s veľmi nízkym imunogenetickým rizikom, schválená na liečbu chronickej lymfatickej leukémie. Rituximab bol skúšaný v 48týždňovej dvojito zaslepenej, placebo kontrolovanej štúdii fázy II u 106 pacientov s relaps-remitujúcou formou SM. Pacienti dostali jednotlivú dávku 100 mg rituximabu alebo placebo v prvom a pätnástom dni. Priemerný počet T1 gadolínium nasýtených (Gd+) lézií na MR skenoch bol v 24. týždni redukovaný o 91 % v porovnaní s placebovou skupinou ($p < 0,001$). Priemerný počet nových Gd+ lézií bol redukovaný o 95 % ($p < 0,001$). Nebol pozorovaný rozdiel v incidencii závažných nežiaducich účinkov alebo infekcií medzi skupinami pacientov liečenými rituximabom alebo placebo (Hauser et al., 2008). V ďalšej klinickej štúdii bolo 439 pacientov s primárne progresívnou SM randomizovaných na podanie dvoch 1 000 mg infúzií rituximabu alebo placebo v pomere 2 : 1. Primárny cieľ štúdie, čas do potvrdenia progresie zneschopnenia (CDP – confirmed disability progression) pretrvávajúceho počas 12 týždňov nebol dosiahnutý, nedosiahol sa štatisticky signifikantný rozdiel. V analýze podskupín pacientov sa zistilo, že čas do dosiahnutia CDP bol predĺžený u mladších pacientov a u pacientov s Gd+ léziou na úvodnom MR skene. Preto sa predpokladá efektívnosť liečby u mladších pacientov s prítomnou zápalovou aktivitou. Nežiaduce účinky spojené s podaním infúzie, predovšetkým ľahké až stredne závažné, boli častejšie pri úvodnej dávke, neskôr klesli na úroveň porovnateľnú s placebovou skupinou. Závažné infekcie boli zaznamenané u 4,5 % pacientov liečených rituximabom oproti 1,0 % pacientov v placebovom ramene (Hawker et al., 2009). Bez ohľadu na tieto výsledky sa Roche a Genentech rozhodli nepokračovať v klinických

skúškaniach s rituximabom pri SM vzhľadom na orientáciu na ocrelizumab, humanizovaný anti-CD20 protilátka s lepšími biologickými vlastnosťami a redukovanou imunogenicitou. OPERA I a II boli dve identické multicentrické, randomizované, dvojito zaslepené štúdie tretej fázy. V štúdiách 1 656 pacientov s relaps-remitujúcou formou SM užívalo ocrelizumab v dávke 600 mg podávaných intravenóznou infúziou každých 24 týždňov alebo interferón beta 1a v dávke 44 µg subkutánne trikrát týždenne v pomere 1 : 1 počas dvoch rokov. Pri hodnotení primárneho cieľa, ročnej miery relapsov v 96. týždni, ocrelizumab dokázal 46 % a 47 % redukcii v porovnaní s interferónom beta 1a ($p < 0,0001$). Obe štúdie tiež preukázali 40 % redukcii rizika progresie zneschopnenia pretrvávajúceho 12 a 24 týždňov, 94 % a 95 % redukcii v počte Gd+ lézií a 77 % a 83 % redukcii nových/zväčšených T2 lézií na MR (Hauser et al., 2015). Štúdia ORATORIO randomizovala 732 pacientov s primárne progresívnou SM na liečbu ocrelizumabom (dve 300 mg infúzie podané v odstupe 14 dní každých 24 týždňov) alebo placebo počas 120 týždňov. Ocrelizumab signifikantne redukoval riziko CDP pretrvávajúcej počas 12 týždňov o 24 % ($p = 0,0321$) a CDP pretrvávajúcej počas 24 týždňov o 25 % ($p = 0,0365$). Najčastejším nežiaducim účinkom vo všetkých troch štúdiách boli reakcie spojené s podaním infúzie. Závažné nežiaduce účinky boli podobné vo všetkých skupinách a v štúdii neboli zaznamenané oportúnne infekcie alebo prípady PML. V štúdii OPERA sa referovalo šesť malignít (v interferónovom ramene 2 a v ocrelizumabovom ramene 4), trinásť malignít sa referovalo v štúdii ORATORIO (v placebovom ramene 2 a v ocrelizumabovom ramene 11) (Montalban et al., 2015). Tento výskyt ale nevybočil z epidemiologických noriem vo všeobecnej populácii SM (Nielsen et al., 2006; Kingwell et al., 2012). Bezpečnosť a účinnosť ofatumumabu bola hodnotená v randomizovanej, dvojito zaslepenej, placebo kontrolovanej štúdii u 38 pacientov s relaps-remitujúcou formou SM. Pacienti dostali dve infúzie ofatumumabu v rôznom dávkovaní (100 mg, 300 mg, 700 mg) alebo placebo opakované po dvoch týždňoch. Ofatumumab bol dobre tolerovaný a nezaznamenali sa neočakávané bezpečnostné riziká. Z pohľadu účinnosti bola nová T2 aktivita redukovaná o viac ako 99 % počas 24 týždňov

po podaní ktorejkoľvek dávky (Sorensen et al., 2014). Účinnosť ofatumumabu bola preukázaná aj v rozsiahlejšej štúdií II fázy MIRROR (Bar-Or et al., 2014). Skúšania fázy III aktuálne prebiehajú. Všetky uvedené skúšania preukázali klinické aj MR dôkazy o účinnosti a bezpečnosti selektívnej B lymfocytovej deplécie v liečbe SM.

Terapia cielená na cytokíny B bunkovej rady

Dozrievanie a prežívanie B lymfocytov je závislé od dvoch kľúčových cytokínov: BAFF (B-cell activating factor) a APRIL (A Proliferation Inducing Ligand), ktoré sú produkované neutrofilmi, monocytmi a aktivovanými T lymfocytmi (Alexopoulos, Biba et Dalakas, 2016). Tabalumab je plne humánna protilátka IgG4, ktorá je zacielená a neutralizujúca solubilný a membránový BAFF. Štúdia fázy II u 245 pacientov s relaps-remitujúcou SM bola však zastavená. Nie je známe, či k tomu došlo z dôvodu bezpečnosti, klinickej neúčinnosti (ako bolo pozorované pri klinickom skúšaní pri lupus erythematosus) alebo z dôvodu zvýšenej aktivity ochorenia (Milo, 2016). Atacicept je fúzny proteín, ktorý pozostáva z extracelulárnej domény, prirodzene sa vyskytujúceho receptora (cieľové miesto pre BAFF a APRIL) a Fc domény ľudského imunoglobulínu (pre zvýšenie stability molekuly). Klinická štúdia ATAMS u pacientov s relaps-remitujúcou SM a optickou neuritídou bola prerušená z dôvodu zvýšenej aktivity ochorenia v liečenej skupine pacientov oproti placebovej skupine (Luhder et Graold, 2014).

LITERATÚRA

- Alexopoulos H, Biba A, Dalakas MC. Anti-B-cell therapies in autoimmune neurological diseases: rationale and efficacy trials. *Neurotherapeutics* 2016; 13: 20–33.
- Bar-Or A, Grove R, Austin D, Tolson J, Vanmeter S, Lewis E, Sorensen PS. The MIRROR study: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, dose-ranging study to investigate the safety and mri efficacy of subcutaneous ofatumumab in subjects with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). *Neurology* 2014; 82(10): Supplement S23.006.
- Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A, Fillatreau S, Gray D. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J Exp Med* 2012; 209: 1001–1010.
- Bettelli E, Das MP, Howard ED, Weiner HL, Sobel RA, Kuchroo VK. IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice. *J Immunol* 1998; 161: 3299–3306.
- Cohen JA, Coles AJ, Arnold DL, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Fisher E, Brinar

Alemtuzumab: terapia cielená na marker CD52

Alemtuzumab je humanizovaná monoklonálna protilátka cielená na marker CD52, povrchový glykoproteín nachádzajúci sa na viac ako 95 % T a B lymfocytov, monocytov, na niektorých dendritických bunkách, NK bunkách (NKC – natural killer cells) a iných bielych krvinkách (Rao et al., 2012). S alemtuzumabom boli uskutočnené dve klinické skúšania tretej fázy: CARE-MS I u neliečených pacientov a CARE-MS II u pacientov s predchádzajúcou liečbou. Podanie alemtuzumabu spôsobuje depléciu a následnú repopuláciu B a T lymfocytov s dlhodobými zmenami v adaptívnej imunite. V dvojročnom období sa porovnávalo pôsobenie alemtuzumabu oproti interferónu beta 1a. Alemtuzumab sa podával v dávke 12 mg/deň počas piatich po sebe nasledujúcich dní v mesiaci 0 a 12 mg/deň počas troch po sebe nasledujúcich dňoch v mesiaci 12. Interferón beta 1a bol podávaný v dávke 44 µg subkutánne trikrát cez týždeň. Obe štúdie sledovali pacientov s relabujúcou SM. Primárnym cieľom bolo ovplyvnenie ročnej miery relapsov a progresie zneschopnenia s pretrváváním šesť mesiacov. V CARE MS I alemtuzumab redukoval ročnú mieru relapsov o 55 % v porovnaní s interferónom beta 1a, nepreukázal však superioritu v porovnaní redukcie progresie zneschopnenia. V CARE MS II alemtuzumab redukoval mieru relapsov o 50 % a akumuláciu progresie zneschopnenia o 42 %. Z pohľadu bezpečnosti je dôležité spomenúť výskyt sekundárnych autoimunitných ochorení. U 30–40 % pacientov sa rozvinula autoimunitná porucha štítnej žľazy.

- VV, Giovannoni G, Stojanovic M, Ertik BI, Lake SL, Margolin DH, Panzara MA, Compston DA. CARE-MS I investigators. Alemtuzumab versus interferon beta 1a as first-line treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 380: 1819–28.
- Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA. CARE-MS II Investigators. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012; 380: 1829–1839.
- Hauser S, Waubant E, Arnold D, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH. A phase II randomized, placebo-controlled, multicenter trial of rituximab in adults with relapsing remitting multiple sclerosis (RRMS). *Neurology* 2007; 68(12): Suppl. 1: A99–A100.
- Hauser SL, Comi GC, Hartung H-P, Selmaj K, Traboulsee A, Bar-Or A, Arnold DL, Klingelschmitt G, Kakarieka A, Lublin F, Garren H, Kappos L. On behalf of the OPERA I and II clinical investigators. Efficacy and safety of ocrelizumab in relapsing

Z iných ochorení sa u 1 % pacientov liečených alemtuzumabom vyskytla autoimunitná trombocytopenická purpura (ITP) (Cohen et al., 2012; Coles et al., 2012).

Záver

Úloha B lymfocytov v patogenéze SM bola dlho nedostatočne docenená. Záujem vzrástol pri vypracovaní nových liečebných postupov zameraných na ovplyvnenie mechanizmov sprostredkovaných B bunkami. Ukazuje sa, že deplécia B lymfocytov prináša nové terapeutické možnosti v liečbe relaps-remitujúcej a primárne progresívnej SM. Dokumentoval sa výrazný terapeutický efekt rituximabu u pacientov s relaps-remitujúcou sclerosis multiplex. Klinické štúdie s monoklonálnymi protilátkami zacielenými na CD20 ukazujú, že deplécia B lymfocytov je vysoko účinná a je bez výraznejšieho oslabenia normálnej imunitnej reaktivity. Prvýkrát bola potvrdená účinnosť jednej z monoklonálnych protilátok v liečbe primárne progresívnej SM. Alemtuzumab pôsobiaci cez receptor CD52 na T a B lymfocytoch preukazuje vysokú a dlhotrvajúcu účinnosť. Oproti tomu blokovanie trofických faktorov vývoja B lymfocytov neprinieslo očakávané výsledky. Liečba ataciceptom viedla k zvýšeniu zápalovej aktivity a poukázala na komplexnú úlohu B lymfocytov a humorálnej imunity v patogenéze SM. Rozširovanie liečebných možností pri tak závažnej a mnohotvárnej chorobe, ako je sclerosis multiplex, prináša nové možnosti výberu a individualizácie liečby a zlepšenie prognózy, a životných vyhládok pacientov s neuspokojivými výsledkami doterajšej liečby.

- multiple sclerosis – results of the interferon-beta-1a-controlled, double blind, phase III OPERA I and II studies. *Mult Scler* 2015; 21(Suppl.): 61–2 [Abstract 190].
- Hawker K, O'Connor P, Freedman MS, Calabresi PA, Antel J, Simon J, Hauser S, Waubant E, Vollmer T, Panitch H, Zhang J, Chin P, Smith CH. OLYMPUS trial group. Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial. *Ann Neurol* 2009; 66: 460–471.
- Kingwell E, Bajdik C, Phillips N, Zhu F, Oger J, Hashimoto S, Tremlett H. Cancer risk in multiple sclerosis: findings from British Columbia, Canada. *Brain* 2012; 135: 2973–2979.
- Koziolek M, Tampe D, Bahr M, Dihazi H, Jung K, Fitzner D, Klingel R, Müller GA, Kitz B. Immunoabsorption therapy in patients with multiple sclerosis with steroid-refractory optical neuritis. *J Neuroinflammation* 2012; 9: 80–89.
- Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E. B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 2012; 8: 613–623.
- Lisak RP, Benjamins JA, Nedelkoska L, Barger JL, Ragheb S, Fan B, Ouamara N, Johnson TA, Rajasekharan S, Bar-Or A.

Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J Neuroimmunol* 2012; 246: 85–95.

14. Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000; 47: 707–717.

15. Luhder F, Graold R. Trial and error in clinical studies: lessons from ATAMS. *Lancet Neurol* 2014; 13: 340–341.

16. Mayer MC, Hohlfeld R, Meinl E. Viability of autoantibody-targets: how to tackle pathogenetic heterogeneity as an obstacle for treatment of multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2012; 319(1–2): 2–7.

17. Milo R. Therapeutic strategies targeting B-cells in multiple sclerosis. *Autoim Reviews* 2016; 15(7): 714–718.

18. Montalban X, Hemmer B, Rammohan K, Giovannoni G, de Seze J, Bar-Or A, Arnold DL, Sauter A, Kakarieka A, Master-

man D, Chin P, Garren H, Wolinsky J. On behalf of the ORATORIO clinical investigators. Efficacy and safety of ocrelizumab in primary progressive multiple sclerosis—results of the placebo-controlled, double-blind, phase III ORATORIO study. *Mult Scler* 2015; 21(Suppl.): 781–2 [Abstract 228].

19. Nielsen NM, Rostgaard K, Rasmussen S, Koch-Henriksen N, Storm HH, Melbye M, Hjalgrim H. Cancer risk among patients with multiple sclerosis: a population-based register study. *Int J Cancer* 2006; 118: 979–984.

20. Rao S, Sancho J, Campos-Rivera J, Boutin P, Severy P, Weeden T, Shankara S, Roberts BL, Kaplan JM. Human peripheral blood mononuclear cells exhibit heterogeneous CD52 expression levels and show differential sensitivity to alemtuzumab mediated cytotoxicity. *PLoS One* 2012; 7: e39416.

21. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F.

Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004; 14: 164–174.

22. Sorensen PS, Lisby S, Grove R, Derosier F, Shackelford S, Havrdova E, Drulovic J, Filippi M. Safety and efficacy of ofatumumab in relapsing–remitting multiple sclerosis: a phase 2 study. *Neurology* 2014; 82: 573–581.

23. Stangel M, Fredrikson S, Meinl E, Petzold A, Stuve O, Tumani H. The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2013; 9: 267–276.

24. Von Budingen HC, Kuo TC, Sirota M, Van Belle CJ, Apeltsin L, Glanville J, Cree BA, Gourraud PA, Schwartzburg A, Huerta G, Telman D, Sundar PD, Casey T, Cox DR, Hauser SL. B cell exchange across the blood–brain barrier in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2012; 122: 4533–4543.