

Interferon alfa: perspektywy zastosowania w leczeniu wirusowych zakażeń dróg oddechowych

Interferon alpha in the treatment of respiratory viral infections

ANNA GŁOBIŃSKA, MAREK L. KOWALSKI

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii, Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii
Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Interferon alfa jest cytokiną zaangażowaną w odpowiedź immunologiczną na infekcje wirusowe. Oprócz właściwości przeciwwirusowych, IFN- α posiada właściwości immunomodulacyjne oraz przeciwnowotworowe. Obecnie, IFN- α znajduje zastosowanie w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Wcześniej podejmowane były liczne próby wykorzystania interferonu w profilaktyce i leczeniu infekcji wirusowych dróg oddechowych, jednak nie wykazano jednoznacznie ich skuteczności. Dostępność nowych preparatów rekombinowanego interferonu stwarza możliwość ponownej weryfikacji użyteczności klinicznej stosowanego miejscowo interferonu w profilaktyce i leczeniu infekcji wirusowych dróg oddechowych. Zatem, głównym celem niniejszej pracy jest podsumowanie prób wykorzystania IFN- α w terapii chorób dróg oddechowych u ludzi.

Słowa kluczowe: interferon- α , wirusy oddechowe, rinowirus, syncytialny wirus oddechowy, przeziębienie, ostre zapalenie oskrzelików

Summary

Interferon alpha belongs to type I family of interferons which are involved in immune response to viral infections. In addition to antiviral properties, IFN- α shows an immunomodulatory and antitumoural activity. Nowadays, IFN- α therapy is applied in chronic hepatitis C infections. Attempts were made to evaluate the clinical applications of interferons in the prophylaxis and treatment of the upper respiratory tract infections; however, their effectiveness was not shown unambiguously. Availability of novel formulations of recombinant interferon creates the possibility to verify clinical efficacy of locally administered interferon in the prophylaxis and treatment of viral infections of the respiratory tract. Thus, the main purpose of this paper is to summarize studies of IFN- α in the therapy of the human airway respiratory diseases.

Keywords: interferon- α , respiratory viruses, rhinovirus, respiratory syncytial virus, common cold, acute bronchiolitis

© *Alergia Astma Immunologia* 2013, 18 (2): 97-103

www.alergia-astma-immunologia.eu

Przyjęto do druku: 30.06.2013

Adres do korespondencji / Address for correspondence

Prof. dr hab. med. Marek L. Kowalski

Klinika Immunologii, Reumatologii i Alergii
Katedra Immunologii Klinicznej i Mikrobiologii UM w Łodzi
92-213 Łódź, ul. Pomorska 251
tel. 42 675 73 09, fax 42 678 22 92
e-mail: Marek.Kowalski@csk.umed.lodz.pl

Interferon α (IFN- α) struktura i funkcje

Historia odkrycia interferonów sięga roku 1957, kiedy Isaacs i Lindenmann badając zjawisko interferencji wirusowej wykazali obecność białek chroniących komórki przed zakażeniem [1]. Jednakże pierwsze doniesienia na temat stanu niewrażliwości zainfekowanej wirusem komórki na zakażenie innym wirusem pojawiły się już w latach 30. ubiegłego wieku, a prekursorem tych badań był Magrassi [2].

Interferony są niskocząsteczkowymi glikoproteinami, należącymi do rodziny cytokin. Wykazują działanie zarówno parakrynowe, jak i autokrynowe. Pełnią funkcje immunomodulacyjne i są zaangażowane w odpowiedź przeciwwirusową oraz przeciwnowotworową. Uczestniczą w regulacji oddziaływań międzykomórkowych oraz modulują szlaki wewnątrzkomórkowe, zwiększając wydajność mechanizmów odpowiedzi swoistej oraz nieswoistej [2,3]. W związku z tym zaburzenia w produkcji interferonów, jak również upośledzone funkcjonowanie receptorów dla tych

białek przyczyniają się do zwiększenia podatności na infekcje bakteryjne i wirusowe oraz zakażenia pasożytnicze [4].

Komórki ludzkie wytwarzają różniące się strukturalnie izoformy interferonów, które zostały wyodrębnione jako interferony trzech typów. Grupa wysoce konserwatywnych interferonów I typu obejmuje IFN- α , - β , - ϵ , - κ oraz - ω , do typu II należy IFN- γ , natomiast typ III stanowi IFN- λ . Ekspresja interferonów I typu zachodzi w makrofagach oraz komórkach nabłonka. INF- α produkowany jest głównie przez leukocyty, INF- β przez fibroblasty, natomiast komórki NK (*natural killers*) oraz aktywowane limfocyty T wytwarzają IFN- γ [5-8].

Pośród wszystkich wymienionych interferonów, IFN- α posiada największą liczbę podtypów: IFN- α 1, -2, -4, -5, -6, -7, -8, -10, -14, -16, -17 oraz -21. Dodatkowo niektóre izoformy występują w kilku odmianach allelicznych, np. IFN- α 2 posiada warianty określane jako IFN- α 2a, IFN- α 2b, IFN- α 2c, których sekwencja różni się w obrębie pojedynczego aminokwasu [3].

Poszczególne podtypy ludzkiego IFN- α zawierają około 165-166 aminokwasów i wykazują wysoki stopień homologii (75-99% identyczność w obrębie sekwencji aminokwasów poszczególnych izoform) [9,10].

Wszystkie podtypy IFN- α kodowane są przez 13 genów zlokalizowanych na ramieniu krótkim chromosomu 9, przy czym jeden z nich jest pseudogenem, natomiast geny $\alpha 1$ i $\alpha 13$ kodują jednakowe białka [3].

Struktura receptora dla interferonów typu I

Interferony typu I oddziałują z komórką za pośrednictwem kompleksu receptorów, określanego jako IFNAR (IFN- α/β receptor). Receptor ten utworzony jest przez dwa łańcuchy z których pierwszy, określany jako IFNAR1, ma masę 63 kDa, natomiast drugi – IFNAR2c o masie 55 kDa, jest izoformą podjednostki IFNAR2 [11]. IFNAR2 posiada trzy izoformy powstające w wyniku alternatywnego splicingu tego samego genu. Dwie z nich to izoformy transmembranowe: dłuższa, podobna do mysiej – IFNAR2c i krótsza – IFNAR2b (51 kDa), która pełni funkcję negatywnego regulatora szlaków sygnałowych interferonów. Trzecia izoforma to obecny w ślinie, surowicy, moczu oraz płynie otrzewnowym, rozpuszczalny receptor o masie 24 kDa, określany jako sIFNAR2a [11,12]. Wszystkie wymienione izoformy posiadają identyczne domeny zewnątrzkomórkowe, natomiast różnią się pod względem sekwencji domen wewnątrzkomórkowych [11].

Mechanizmy transdukcji sygnału

Interferony typu I, produkowane w odpowiedzi na infekcję wirusową, indukują ekspresję ponad 100 genów, których produkty odgrywają istotną rolę w obronie przeciwwirusowej. W odpowiedzi na rozpoznanie komponentów wirusowych uruchamiane są szlaki transdukcji sygnału zależne oraz niezależne od receptorów Toll-podobnych (TLRs, ang. *Toll-like receptors*). Ścieżki sygnałowe z udziałem receptorów TLR angażują zlokalizowane w endosomach TLR3, TLR7 oraz TLR9, z których dwa ostatnie występują głównie w plazmacytoidalnych komórkach dendrytycznych, natomiast niezależne od TLRs szlaki transdukcji sygnału wymagają udziału cytoplazmatycznych białek MDA5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*) oraz RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*) [13,14].

Produkcja interferonów typu I następuje najczęściej po związaniu dwuniciowego RNA (ang. *double-stranded RNA*, dsRNA), powstającego w procesie replikacji materiału genetycznego RNA wirusów, takich jak syncytialny wirus oddechowy (ang. *respiratory syncytial virus*, RSV), rinowirus (ang. *rhinovirus*, RV) czy wirus paragrypy (ang. *parainfluenza*, PIV) z odpowiednim receptorem na komórce, wskutek czego dochodzi do aktywacji szlaków transdukcji sygnału [15,16]. Wśród receptorów odpowiedzialnych za przekazywanie sygnału generowanego związaniem wirusowego RNA wyróżnia się cytoplazmatyczne białka MDA5 i RIG-I. Transdukcja sygnału przebiegająca z udziałem tych receptorów angażuje mitochondrialne białko adaptorowe IPS-1 (IFN- β *promoter stimulator*), określane także jako MAVS/VISA/Cardif, a następnie kinazy TBK1 i IKKi, co ak-

tywuje ostatecznie czynnik transkrypcyjny IRF3 (*interferon regulatory factor 3*), prowadząc do produkcji interferonów typu I [16,17].

W odpowiedzi na wirusowy RNA uczestniczy również receptor TLR3 aktywujący ścieżki sygnałowe niezależne od białka adaptorowego MyD88, wymagające natomiast udziału białka TRIF (ang. *TIR domain-containing adaptor inducing IFN- β*), TRAF3 (ang. *TNF receptor-associated factor 3*), TBK1 oraz IKKi, co skutkuje aktywacją IRF3 i indukuje transkrypcję genów dla interferonów typu I [16].

Ekspresja IFN typu I może być wynikiem detekcji wirusowego DNA za pośrednictwem zależnego od DNA aktywatora IRFs – DAI (ang. *DNA-dependent activator of INF-regulatory factors*), określanego także jako białko wiążące Z-DNA – ZBP1 (ang. *Z-DNA binding protein 1*). Transdukcja sygnału z udziałem DAI odbywa się w szlaku wykorzystującym kinazę TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) oraz czynnik IRF3 [14,16].

Odpowiedź na interferony typu I zostaje zainicjowana pod wpływem interakcji interferonu z powierzchniowym receptorem IFNAR, co prowadzi do aktywacji białek Tyk2 i Jak1, należących do rodziny kinaz tyrozynowych Janus. Podjednostka IFNAR1 wiąże się z Tyk2, natomiast IFNAR2 z Jak1 [18,19]. Kolejnym etapem jest rekrutacja i fosforylacja czynników transdukcji i aktywacji transkrypcji – STAT1 oraz STAT2 (*signal transducers and activators of transcription*), które dimeryzują, tworząc hetero- i homodimeryczne kompleksy, dysocjujące następnie od receptora i przemieszczające się do jądra komórkowego, gdzie indukują ekspresję stymulowanych interferonem genów zwanych ISGs (ang. *interferon-stimulated genes*). ISGF3 (ang. *IFN-stimulated gene factor 3*), będący kompleksem utworzonym przez STAT1, STAT2 i IRF9, wiąże się z elementami ISRE (ang. *IFN-stimulated response elements*), obecnymi w rejonach promotorowych różnych genów stymulowanych interferonem [12,19,20].

Czynniki regulatorowe interferonów

Rodzina czynników transkrypcyjnych IRF utworzona jest przez 9 czynników regulatorowych, wykazujących wysoki stopień homologii w obrębie N-końcowej domeny wiążącej DNA (ang. *DNA binding domain*, DBD). Domeny te wiążą się z sekwencjami GAAANN oraz AANNNGAA, określanymi jako elementy regulatorowe stymulowane interferonem (ang. *IFN-stimulated regulatory element*, ISRE). Każdy z czynników IRF posiada także unikatową domenę C-końcową, odpowiadającą za funkcje poszczególnych czynników z rodziny IRF [13].

Kluczową rolę w ekspresji interferonów typu I w odpowiedzi na zakażenie wirusowe odgrywa czynnik IRF3, będący fosfoproteiną zbudowaną z 427 aminokwasów [13]. Nieaktywna, monomeryczna forma IRF3 jest zlokalizowana na terenie cytoplazmy, natomiast po aktywacji dochodzi do translokacji tego czynnika do jądra komórkowego. Następnie IRF3 jest fosforylowany w obrębie reszt seryny w pozycjach 385 i 386, po czym dimeryzuje, a powstały homodimer wraz z białkiem CBP/p300 tworzy kompleks, posiadający zdolność do wiązania się z motywami IRF [21].

IRF7, kolejny członek rodziny IRF, jest czynnikiem którego konstytutywną ekspresję wykazują komórki dendrytyczne oraz limfocyty B, natomiast w innych komórkach ekspresja tego czynnika jest indukowana przez wirusy, bakteryjny lipopolisacharyd oraz IFN [13,22].

Zarówno IRF3, jak i IRF7 odgrywają rolę w odpowiedzi na infekcję wirusową. Wykazano, że oba te czynniki regulacyjne wiążą się z motywem 5'-GAAANNGAAANN-3', obecnym w wielu genach indukowanych pod wpływem wirusa [13]. Jednakże, substytucja nawet pojedynczego nukleotydu w jednym z motywów GAA eliminuje zdolność wiązania oraz aktywność transaktywacyjną IRF3. Efektu takiego nie zaobserwowano w przypadku czynnika IRF7 [22].

Otrzymywanie rekombinowanego IFN- α

Pierwsze próby otrzymania interferonu do celów terapeutycznych prowadzone były już w latach 70. Metodę pozyskiwania IFN opracował jako pierwszy Kari Cantella, wykorzystując leukocyty ludzkie stymulowane wirusem Sendai. Uzyskany produkt poddawano oczyszczaniu za pomocą tiocyjanianu potasowego, otrzymując w ten sposób mieszaninę interferonów, składającą się głównie z IFN- α i IFN- β . Ze względu na ograniczoną dostępność leukocytów ludzkich wprowadzenie tej metody do powszechnego zastosowania nie było możliwe [23,24]. Co więcej, skład dostępnych komercyjnie preparatów uzależniony był od sposobu pozyskiwania oraz oczyszczania uzyskanej mieszaniny. Produkt otrzymany przy zastosowaniu metody wykorzystującej linie komórkowe zawierał IFN- α 2 jako główny składnik, natomiast w preparacie pochodzącym z ludzkich leukocytów dominował IFN- α 1 [10]. Obecnie, produkcja interferonu polega na zastosowaniu bakteryjnych systemów ekspresji rekombinowanych białek w komórkach. Najczęściej stosowany jest system ekspresyjny z wykorzystaniem *Escherichia coli* ze względu na dobrze poznaną sekwencję genomu tych drobnoustrojów oraz łatwość i stosunkowo niskie koszty prowadzenia hodowli. W przypadku produkcji białek na skalę przemysłową stosuje się hodowle komórek o dużej gęstości (ang. *high cell density cultures*, HCDC) [25,26].

Ze względu na krótki okres półtrwania IFN- α opracowano metodę łączenia IFN z glikolem polietylenowym. Proces ten, zwany pegylacją, wpływa na zahamowanie wydalania preparatu przez nerki, zwiększając tym samym efektywność terapeutyczną. Wprowadzenie pegylowanej formy interferonu umożliwiło także zmniejszenie częstotliwości podawania leku [10,24].

Zastosowanie IFN- α w terapii

Ze względu na swoje właściwości interferony stosowane są w terapii m.in. zespołu Churga-Strauss, stwardnienia rozsianego oraz w leczeniu nowotworów [27,28]. W połączeniu z retinoidami, IFN- α 2a powoduje regresję zaawansowanej postaci raka płaskonabłonkowego skóry oraz raka szyjki macicy. Ponadto hamuje proliferację komórek śródbłonka naczyń, znajdując zastosowanie w terapii naczyńniaków oraz czerniaka [29]. Badania kliniczne dowodzą także skuteczności stosowania interferonu w połączeniu z rybawiryną w le-

czeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu C, umożliwiając uzyskanie stanu trwałej odpowiedzi przeciwwirusowej (ang. *sustained virologic response*, SVR), definiowanego jako nieobecność wirusowego RNA w surowicy w czasie 6 miesięcy od zakończenia terapii. Skuteczność leczenia skojarzonego uzależniona jest od genotypu wirusa, wywołującego chorobę. Spośród wszystkich 6 genotypów HCV, w zakażeniach wirusami genotypów 2 i 3 terapia przynosi najlepsze rezultaty, o czym świadczy fakt, iż SVR uzyskuje się u 75-90% przypadków, natomiast u chorych zainfekowanych HCV genotypu 1 stan trwałej odpowiedzi przeciwwirusowej osiągany jest tylko u 40-50% pacjentów [30,31].

Efekty uboczne stosowania terapii IFN- α

Stopień ciężkości objawów niepożądanych występujących po zastosowaniu interferonu jest uzależniony od dawki oraz częstości podawania. Najczęściej występujące wczesne objawy niepożądane po podaniu dużych dawek IFN- α to objawy grypopodobne (gorączka, bóle stawów), których pojawienie się jest wynikiem uwolnienia cytokin: TNF- α , IL-1, IL-6. Cytokiny produkowane jako efekt odpowiedzi immunologicznej na interferon pobudzają receptory w podwzgórzu, wywołując gorączkę i dreszcze. Istotną rolę odgrywa również indukcja prostaglandyny E2. W obrębie krwi natomiast stwierdza się trombocytopenię oraz leukopenię [32,33]. Wśród efektów ubocznych długotrwałego leczenia stwierdzano zaburzenia czynności tarczycy, choroby autoimmunologiczne, retinopatię, cukrzycę, zaburzenia psychiczne, pojawienie się wysypki oraz utratę włosów [32]. Istotne znaczenie ma także występowanie objawów ubocznych po miejscowym stosowaniu IFN- α na śluzówki, które będzie omówione dalej.

Mimo iż podejmowane są próby wykorzystania IFN- α w leczeniu śródmiąższowego zapalenia płuc [34], opisano też przypadek wystąpienia śródmiąższowego zapalenia płuc po zastosowaniu interferonu oraz rybawiryny u pacjentki zakażonej HCV (ang. *hepatitis C virus*) [35]. U innej pacjentki z podejrzeniem śródmiąższowego zapalenia płuc/idiopatycznego włóknienia płuc, zastosowanie IFN- α w terapii wirusowego zapalenia wątroby typu C doprowadziło do zaostrzenia choroby i zgonu [36]. Istnieją również doniesienia o związku pomiędzy zastosowaniem leczenia wirusowego zapalenia wątroby interferonem α a zaostrzeniami astmy oskrzelowej o umiarkowanym stopniu ciężkości [37]. Przypuszcza się, że toksyczny wpływ interferonu na komórki płuc może być skutkiem działania kilku mechanizmów. Włóknienie tkanki płucnej wynika najprawdopodobniej z indukcji cytokin prozapalnych, zahamowania supresorowych limfocytów T oraz wzmożonej cytotoksyczności limfocytów [35]. Zatem u pacjentów z chorobami płuc bądź przewlekłą astmą oskrzelową przed wdrożeniem terapii interferonem α należy rozważyć, czy potencjalne korzyści wynikające z leczenia przeważają nad ryzykiem wystąpienia zaostrzeń choroby. Badania przeprowadzone na 12 zdrowych ochotnikach wykazały, że podanie niskich dawek rekombinowanego ludzkiego IFN- α wykazuje działanie immunostymulujące, natomiast

IFN- α podawany w wyższych dawkach oddziałuje immunosupresyjnie, czego dowodem są zmiany aktywności komórek NK, liczby limfocytów oraz ekspresji β -mikroglobuliny [38]. Po doustnym podaniu rekombinowanego IFN- α obserwowano również wzrost ilości limfocytów CD3+, CD4+, CD8+, CD25+ [38].

Przeciwwirusowe właściwości interferonu α

W trakcie trwania infekcji, zanim w organizmie uruchomione zostaną mechanizmy odporności swoistej, uwalnianie interferonów typu I, głównie IFN- α oraz IFN- β , ogranicza replikację wirusów, odgrywając tym samym kluczową rolę w odpowiedzi przeciwwirusowej. Jednakże, mimo wielu danych potwierdzających istotne znaczenie interferonów w obronie przeciwko wirusom pojawiają się informacje wskazujące na ich zróżnicowaną rolę, zależną od rodzaju wirusa. Badania opublikowane na łamach Journal of Virology w 2005 roku wskazują, że zarówno RSV, jak i ludzki metapneumowirus (ang. *human metapneumovirus*, hMPV) są wrażliwe na przeciwwirusowe działanie IFN- α . RSV wydaje się być słabszym induktorem wytwarzania IFN- α w porównaniu z hMPV, przy czym oba wirusy zakłócają szlaki sygnałowe IFN, o czym świadczy znaczący spadek produkcji IFN- α w płucach [39]. Z kolei Sperber i wsp. wykazali, że choć IFN- α , jak i IFN- β w warunkach *in vitro* hamują replikację rinowirusów (RV39 i RV1A), wirusa grypy oraz wirusa paragrypy, to nie ograniczają replikacji adenowirusa oraz RSV [40]. Odmienne wyniki uzyskali badacze z Ohio, którzy wykazali znaczne zahamowanie replikacji wirusa RSV w komórkach nabłonka po zastosowaniu IFN- β [41].

Badania *in vivo* na modelach zwierzęcych

Oprócz licznych prób klinicznych z zastosowaniem interferonu u ludzi, pojawiają się również prace, w których wykorzystano modele zwierzęce. Jedno z badań opublikowanych w 2011 roku opisuje rezultaty zastosowania interferonu u małp wąskonosych – *Macaca mulatta*. Zwierzętom podano ludzki IFN- α donosowo, dotchawiczo oraz domięśniowo w celu wywołania odpowiednio – lokalnej (w drogach oddechowych) lub systemowej indukcji produkcji interferonów typu I. Stopień odpowiedzi przeciwwirusowej wywołanej zastosowaniem IFN oceniono monitorując zmiany ekspresji dwóch kluczowych genów indukowanych przez IFN – OAS (syntetaza 2,5-oligoadenylowa) oraz MxA (białko związane z odpornością na myksowirusy), wykazując zwiększenie poziomu ekspresji obu badanych genów zarówno w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, jak i w komórkach z popłuczyn oskrzelowych. Dowiedziono także, że u małp zakażonych wirusem grypy, którym uprzednio podano interferon, parametry wskazujące na aktywność choroby (wzrost temperatury ciała, utraty masy ciała) charakteryzują się zmniejszonym nasileniem w porównaniu z wynikami uzyskanymi w grupie kontrolnej. Co więcej, podanie interferonu przed zakażeniem osłabia zdolność wirusa do replikacji [42].

Inne interesujące wyniki badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych opublikowali w roku 2011 amerykańscy naukowcy. W badaniach zastosowano pozbawiony zdolno-

ści do replikacji wektor adenowirusowy będący nośnikiem genu kodującego mysią postać interferonu alfa podtypu 5, określany jako mDEF201. Mysiom szczepu wsobnego BALB/c podawano mDEF201 donosowo przed lub po ekspozycji na letalną dawkę wirusa krowianki. W wyniku donosowej aplikacji preparatu, wektor adenowirusowy wnika do komórek nabłonka, co ostatecznie skutkuje produkcją białka zakodowanego przez gen, którego wektor jest nośnikiem. Wykazano, że mDEF201 może znajdować zastosowanie zarówno w profilaktyce, jak i w leczeniu zakażeń tym wirusem [43,44].

Leczenie zakażeń wirusowych dróg oddechowych u ludzi

Efektywność stosowania interferonu w profilaktyce chorób dróg oddechowych była przedmiotem intensywnych badań szczególnie na przełomie lat 80. i 90. ubiegłego wieku. Pojawiały się zarówno doniesienia wskazujące na skuteczność terapii [45], jak i prace, w których wykazano toksyczność stosowania interferonu [46]. Ze względu na potencjalne możliwości terapeutycznego zastosowania interferonu nadal trwają intensywne badania kliniczne, których celem jest ocena przydatności interferonu w terapii różnych chorób, m.in. chorób dróg oddechowych. Aktualne dane na temat prowadzonych na całym świecie badań klinicznych z udziałem ludzi zebrane są w bazie ClinicalTrials.gov. Obecnie prowadzone są próby wdrożenia terapii interferonem w leczeniu grypy, przewlekłej obturacyjnej choroby płuc oraz w zapobieganiu sezonowemu przeziębieniu i grypie. Celem innych badań jest ocena efektu zastosowania IFN- α u osób w podeszłym wieku szczepionych przeciwko grypie. Prowadzone są także próby opierające się na wykorzystaniu przeciwwirusowych i immunomodulacyjnych właściwości IFN- α w leczeniu zespołu ciężkiej niewydolności oddechowej, których celem jest ocena bezpieczeństwa oraz skuteczności terapii. Inne interesujące próby kliniczne obejmują grupę zakażonych wirusem HCV pacjentów przyjmujących metadon. Badania mają na celu porównanie skuteczności monoterapii IFN- α 2a z leczeniem skojarzonym (IFN- α 2a i rybawiryna).

W latach 80. i 90. przedmiotem badań była ocena efektywności zastosowania terapii interferonem w profilaktyce infekcji układu oddechowego. Oceniano przede wszystkim aktywność profilaktyczną interferonu w zapobieganiu infekcjom rinowirusowym. W roku 1984 ukazała się praca opisująca wyniki zastosowania interferonu u 151 osób dorosłych, którym przez 22 dni podawano donosowo IFN- α 2 w dawce 10^7 j.m. dziennie. Zaobserwowano, że częstość występowania choroby z objawami ze strony oskrzeli i tchawicy była niższa u osób przyjmujących IFN niż u osób z grupy kontrolnej. Paradoksalnie, w 2. i 3. tygodniu odnotowano częstsze występowanie objawów ze strony nosa (uczucie blokady nosa, dyskomfort, obecność krwi w wydzielinie z nosa) w grupie osób poddanych terapii. Opisane objawy były najprawdopodobniej wynikiem ubocznym zastosowanego leczenia, co sugeruje fakt, iż w materiale pobranym od osób poddanych terapii nie wykryto rinowirusów. Badanie to wskazywało na ograniczoną skuteczność IFN w profilaktyce infekcji powodowanych przez rinowirusy [45].

Douglas i wsp. przeprowadzili badania w grupie 120 dorosłych członków 46 rodzin, którym podawano donosowo IFN- α 2a w dawce $5 \cdot 10^6$ j.m. raz dziennie przez siedem dni, w czasie gdy u innego członka rodziny rozwinęły się objawy infekcji. U osób stosujących interferon, które były narażone na infekcję, wykazano skrócenie czasu występowania objawów choroby, co wskazywało na korzystne efekty zastosowania terapii interferonem [47]. Podobne wyniki pochodzą od badaczy z USA, którzy wykazali, że u osób stosujących interferon objawy choroby rozwinęły się jedynie u 14% badanych, podczas gdy w grupie kontrolnej objawy przeziębienia wystąpiły u 23% [48].

Odmienne wyniki uzyskali Tannock i wsp. [49] w 1988 roku, oceniając możliwości zastosowania rekombinowanego interferonu w profilaktyce sezonowego przeziębienia. W badaniu wzięto udział 412 zdrowych ochotników w wieku 18-65 lat, którym podawano donosowo IFN- α 2a w dawkach: $1,5 \cdot 10^6$ j.m., $3 \cdot 10^6$ j.m. lub $6 \cdot 10^6$ j.m. na dobę przez 28 dni. Nie wykazano skuteczności stosowania interferonu w profilaktyce sezonowego przeziębienia. Stwierdzono jednakże zależność pomiędzy podaną dawką interferonu a pojawieniem się objawów niepożądanych – krwawieniem z nosa i uczuciem zatkanego nosa [49]. Brak skuteczności interferonu w profilaktyce wykazały również badania Mon-

to i wsp. [50], w których interferon stosowano przez 5 dni, podając pierwszego dnia dawkę $5 \cdot 10^6$ j.m., a następnie $2,5 \cdot 10^6$ j.m. Nie stwierdzono wpływu interferonu na zmniejszenie ciężkości objawów choroby w grupie osób poddanych terapii [50].

Zastosowanie IFN- α w leczeniu infekcji dróg oddechowych u dzieci

Najczęstszą przyczyną ostrego zapalenia oskrzelików oraz wirusowego zapalenia płuc u niemowląt jest infekcja wirusem RSV. W 1989 roku pojawiły się doniesienia wskazujące, że u niemowląt z ostrym zapaleniem oskrzelików wywołanym przez RSV obserwuje się zaburzenia w produkcji IFN- α , zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* [51]. W tym samym czasie podjęto również próbę oceny poziomu IFN- α w wydzielinie z nosogardła u niemowląt z ostrym zapaleniem oskrzelików. Nie stwierdzono jednakże korelacji pomiędzy poziomem interferonu w wydzielinie a ciężkością choroby. Zaobserwowano natomiast, że IFN- α jest produkowany w znacznych ilościach jedynie u 48% badanych niemowląt [52]. Przeprowadzono badania kliniczne leczenia rekombinowanym interferonem niemowląt z zapaleniem oskrzelików wywołanym przez RSV. Niemowlętom podawano domięśniowo raz dziennie IFN- α 2a w dawce od $1 \cdot 10^4$ do

Tabela I. Zastosowanie IFN- α w leczeniu zakażeń wirusowych dróg oddechowych

Jednostka chorobowa	Liczba pacjentów (placebo)	Wiek	Dawka IFN- α	Droga podania	Efekt	Referencje
Ostre zapalenie oskrzelików wywołane przez RSV	52 (36)	< 1 r.ż.	$5 \cdot 10^4$ j.m. na kg masy ciała na dobę przez 3 dni	domięśniowo	<ul style="list-style-type: none"> ogólna poprawa kliniczna brak istotnych zmian temperatury ciała, tętna, parametrów oddechowych 	Sung, 1993 [54]
Zapalenie oskrzelików wywołane przez RSV	11 (0)	< 1 r.ż.	od $1 \cdot 10^4$ j.m. do $7 \cdot 10^4$ j.m. na kg masy ciała na dobę przez max. 5 dni	domięśniowo	<ul style="list-style-type: none"> brak efektów niepożądanych ogólna poprawa kliniczna 	Portnoy, 1988 [53]
Sezonowe przeziębienie – profilaktyka	412 (102)	18-65 lat	$1,5 \cdot 10^6$ j.m., $3 \cdot 10^6$ j.m. lub $6 \cdot 10^6$ j.m. na dobę przez 28 dni	donosowo	<ul style="list-style-type: none"> brak skuteczności stosowania interferonu w profilaktyce infekcji górnych dróg oddechowych 	Tannock, 1988 [49]
Sezonowe przeziębienie – profilaktyka	229 (109)	> 18 r.ż.	$5 \cdot 10^6$ j.m. na dobę przez 7 dni	donosowo	<ul style="list-style-type: none"> skrócenie czasu występowania objawów choroby 	Douglas, 1986 [47]
Sezonowe przeziębienie – profilaktyka	304 (153)	> 18 r.ż.	$1 \cdot 10^7$ j.m. na dobę przez 22 dni	donosowo	<ul style="list-style-type: none"> mniej częsta występowania objawów ze strony oskrzeli i tchawicy 	Farr, 1984 [45]
Sezonowe przeziębienie – profilaktyka i leczenie	228 (72)	18-65 lat	$1 \cdot 10^7$ j.m. lub $2 \cdot 10^7$ j.m. na dobę przez 5 dni	donosowo	<ul style="list-style-type: none"> brak skuteczności stosowania interferonu w leczeniu przeziębienia istotna klinicznie toksyczność terapii 	Hayden, 1988 [46]

$7 \cdot 10^4$ j.m. na kilogram masy ciała, nie stwierdzając toksyczności stosowania dużych dawek interferonu u niemowląt. Zaobserwowano ogólną poprawę stanu zdrowia dzieci po 3-5 dniach leczenia [53]. Badanie to było jednak badaniem pilotażowym, a uzyskane wyniki nie zostały odniesione do grupy kontrolnej, zatem nie można na jego podstawie wnioskować o skuteczności i bezpieczeństwie terapii interferonem u niemowląt. Podobne badania przeprowadzono w 1993 roku w grupie 52 niemowląt z ostrym zapaleniem oskrzelików wywołanym przez RSV. U niemowląt zastosowano leczenie rekombinowanym IFN- α 2a i oceniono wpływ terapii na przebieg choroby. Szesnastu niemowlętom przez 3 kolejne dni podawano domięśniowo IFN- α 2a w dawce $5 \cdot 10^4$ j.m. na kilogram masy ciała, natomiast pozostałe dzieci otrzymywały placebo. Ogólna poprawa kliniczna obserwowana w grupie leczonej IFN- α 2a była większa niż w grupie kontrolnej. Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian temperatury ciała i tętna, ani różnic parametrów oddechowych pomiędzy tymi grupami [54].

W 2009 roku opublikowano wyniki zastosowania u dzieci terapii anaferonem (interferon, formuła pediatriczna). Anaferon jest preparatem o działaniu immunomodulującym, stymuluje syntezę IgA oraz IgG, a także powoduje wzrost poziomu IFN- γ . Ponadto wpływa na polepszenie miejscowej odpowiedzi immunologicznej komórek nabłonka górnych dróg oddechowych, na co wskazuje zwiększona aktywność lizozymu oraz stężenie sIgA w popłuczynach nosa. Badaniu poddano 106 dzieci w wieku przedszkolnym, z których 40 wykazywało tendencje do częstego zapadania na choroby, natomiast u 66 potwierdzono astmę oskrzelową o lekkim lub umiarkowanym stopniu ciężkości. Potwierdzono spadek częstości incydentów ostrych infekcji wirusowych dróg oddechowych u dzieci podatnych na choroby

oraz dzieci z astmą oskrzelową. Wykazano, iż zastosowanie leczenia anaferonem u dzieci jest bezpieczne i wykazuje skuteczność w profilaktyce ostrych wirusowych infekcji dróg oddechowych [55]. Przedmiotem innych badań była ocena skuteczności stosowania interferonu w terapii ostrych infekcji dróg oddechowych, których czynnikiem etiologicznym był wirus grypy lub inne wirusy oddechowe. W badaniu udział wzięło 101 pacjentów w wieku od 1 m.ż do 18 r.ż, którym podawano anaferon. U dzieci poddanych terapii, w 2-3 dniu leczenia wykazano zmniejszony odsetek wykrywanych antygenów wirusowych w porównaniu z grupą dzieci przyjmujących placebo. Zaobserwowano także wzrost aktywności lizozymu w grupie pacjentów poddanych terapii. Podanie preparatu nie wywoływało żadnych efektów niepożądanych, w tym reakcji alergicznych, co potwierdzono w testach laboratoryjnych. Zatem anaferon może być rekomendowany w terapii ostrych infekcji dróg oddechowych u dzieci [56].

Podsumowanie

Uwalnianie interferonów stanowi główny mechanizm obrony przeciwwirusowej i przeciwnowotworowej w komórkach, a ich zastosowanie terapeutyczne poprawiło jakość życia milionów pacjentów na całym świecie. Ze względu na szerokie spektrum właściwości tych cząsteczek, cały czas pokłada się nadzieję w badaniach nad potencjalnymi możliwościami profilaktycznymi i terapeutycznymi wynikającymi z zastosowania interferonów. Mimo, iż liczne próby stosowania interferonu w terapii nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, nie należy przesądzać o braku możliwości wykorzystania potencjału tych cząsteczek w leczeniu wielu innych chorób.

Piśmiennictwo

- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res* 1987; 7: 429-38.
- Borden EC, Sen GC, Uze G i wsp. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 975-90.
- Foster GR, Finter NB. Are all type I human interferons equivalent? *J Viral Hepat* 1998; 5: 143-52.
- Smith PL, Lombardi G, Foster GR. Type I interferons and the innate immune response-more than just antiviral cytokines. *Mol Immunol* 2005; 42: 869-77.
- Orion E, Matz H, Wolf R. Interferons: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol* 2002; 20: 493-504.
- George PM, Badiger R, Alazawi W i wsp. Pharmacology and therapeutic potential of interferons. *Pharmacol Ther* 2012; 135: 44-53.
- Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2000; 81: 2341-64.
- Patel AA, Lee-Lewis H, Hughes-Hanks J i wsp. Opposing roles for interferon regulatory factor-3 (IRF-3) and type I interferon signaling during plague. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002817.
- Moll HP, Maier T, Zommer A i wsp. The differential activity of interferon-alpha subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine* 2011; 53: 52-9.
- Antonelli G. Biological basis for a proper clinical application of alpha interferons. *New Microbiol* 2008; 31: 305-18.
- Kumaran J, Wei L, Kotra LP i wsp. A structural basis for interferon-alpha-receptor interactions. *FASEB J* 2007; 21: 3288-96.
- de Weerd NA, Samarajiwa SA, Hertzog PJ. Type I interferon receptors: biochemistry and biological functions. *J Biol Chem* 2007; 282: 20053-7.
- Hiscott J. Triggering the innate antiviral response through IRF-3 activation. *J Biol Chem* 2007; 282: 15325-9.
- Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 2007; 449: 819-26.
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84.
- Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010; 207: 2053-63.
- Kawai T, Akira S. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1143: 1-20.
- Thomas C, Moraga I, Levin D i wsp. Structural linkage between ligand discrimination and receptor activation by type I interferons. *Cell* 2011; 146: 621-32.
- Honda K, Yanai H, Takaoka A i wsp. Regulation of the type I IFN induction: a current view. *Int Immunol* 2005; 17: 1367-78.

20. van Boxel-Dezaire AH, Rani MR, Stark GR. Complex modulation of cell type-specific signaling in response to type I interferons. *Immunity* 2006; 25: 361-72.
21. Iwamura T, Yoneyama M, Yamaguchi K i wsp. Induction of IRF-3/-7 kinase and NF-kappaB in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes Cells* 2001; 6: 375-88.
22. Lin R, Genin P, Mamane Y i wsp. Selective DNA binding and association with the CREB binding protein coactivator contribute to differential activation of alpha/beta interferon genes by interferon regulatory factors 3 and 7. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 6342-53.
23. Cantell K, Hirvonen S. Large-scale production of human leukocyte interferon containing 10(8) units per ml. *J Gen Virol* 1978; 39: 541-3.
24. Halota W, Pawłowska M, Andrejczyn M. [Interferons alpha in the treatment of chronic HCV infections]. *Przegl Epidemiol* 2004; 58: 405-11.
25. Lim HK, Jung KH, Park DH i wsp. Production characteristics of interferon-alpha using an L-arabinose promoter system in a high-cell-density culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 2000; 53: 201-8.
26. Yang XM, Xu L, Eppstein L. Production of recombinant human interferon-alpha 1 by *Escherichia coli* using a computer-controlled cultivation process. *J Biotechnol* 1992; 23: 291-301.
27. Termeer CC, Simon JC, Schopf E. Low-dose interferon alfa-2b for the treatment of Churg-Strauss syndrome with prominent skin involvement. *Arch Dermatol* 2001; 137: 136-8.
28. Uka K, Aikata H, Takaki S i wsp. Similar effects of recombinant interferon-alpha-2b and natural interferon-alpha when combined with intra-arterial 5-fluorouracil for the treatment of advanced hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2007; 27: 1209-16.
29. Srivastava P, Bhattacharaya P, Pandey G i wsp. Overexpression and purification of recombinant human interferon alpha2b in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 2005; 41: 313-22.
30. Abbasi A, Bhutto AR, Butt N i wsp. Efficacy of interferon-ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. *J Coll Physicians Surg Pak* 2011; 21: 276-9.
31. Burke JD, Fish EN. Antiviral strategies: the present and beyond. *Curr Mol Pharmacol* 2009; 2: 32-9.
32. Okanou T, Sakamoto S, Itoh Y i wsp. Side effects of high-dose interferon therapy for chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1996; 25: 283-91.
33. Sleijfer S, Bannink M, Van Gool AR i wsp. Side effects of interferon-alpha therapy. *Pharm World Sci* 2005; 27: 423-31.
34. Lutherer LO, Nugent KM, Schoettle BW i wsp. Low-dose oral interferon alpha possibly retards the progression of idiopathic pulmonary fibrosis and alleviates associated cough in some patients. *Thorax* 2011; 66: 446-7.
35. Midturi J, Sierra-Hoffman M, Hurley D i wsp. Spectrum of pulmonary toxicity associated with the use of interferon therapy for hepatitis C: case report and review of the literature. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1724-9.
36. Ling VY, Mortimore M, Serisier DJ. Suspected acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis associated with interferon alpha therapy for hepatitis C: case report. *Springerplus* 2013; 2: 101.
37. Bini EJ, Weinshel EH. Severe exacerbation of asthma: a new side effect of interferon-alpha in patients with asthma and chronic hepatitis C. *Mayo Clin Proc* 1999; 74: 367-70.
38. Cummins JM, Krakowka GS, Thompson CG. Systemic effects of interferons after oral administration in animals and humans. *Am J Vet Res* 2005; 66: 164-176.
39. Guerrero-Plata A, Baron S, Poast JS i wsp. Activity and regulation of alpha interferon in respiratory syncytial virus and human metapneumovirus experimental infections. *J Virol* 2005; 79: 10190-9.
40. Sperber SJ, Hayden FG. Comparative susceptibility of respiratory viruses to recombinant interferons-alpha 2b and -beta. *J Interferon Res* 1989; 9: 285-93.
41. Merolla R, Rebert NA, Tsiviste PT i wsp. Respiratory syncytial virus replication in human lung epithelial cells: inhibition by tumor necrosis factor alpha and interferon beta. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1358-66.
42. Matzinger SR, Carroll TD, Fritts L i wsp. Exogenous IFN-alpha administration reduces influenza A virus replication in the lower respiratory tract of rhesus macaques. *PLoS One* 2011; 6: e29255.
43. Smee DF, Wong MH, Russell A i wsp. Therapy and long-term prophylaxis of vaccinia virus respiratory infections in mice with an adenovirus-vectored interferon alpha (mDEF201). *PLoS One* 2011; 6: e26330.
44. Julander JG, Ennis J, Turner J i wsp. Treatment of yellow fever virus with an adenovirus-vectored interferon, DEF201, in a hamster model. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 2067-73.
45. Farr BM, Gwaltney JM Jr, Adams KF i wsp. Intranasal interferon-alpha 2 for prevention of natural rhinovirus colds. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 26: 31-4.
46. Hayden FG, Kaiser DL, Albrecht JK. Intranasal recombinant alfa-2b interferon treatment of naturally occurring common colds. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 224-30.
47. Douglas RM, Moore BW, Miles HB i wsp. Prophylactic efficacy of intranasal alpha 2-interferon against rhinovirus infections in the family setting. *N Engl J Med* 1986; 314: 65-70.
48. Hayden FG, Albrecht JK, Kaiser DL i wsp. Prevention of natural colds by contact prophylaxis with intranasal alpha 2-interferon. *N Engl J Med* 1986; 314: 71-5.
49. Tannock GA, Gillett SM, Gillett RS i wsp. A study of intranasally administered interferon A (rIFN-alpha 2A) for the seasonal prophylaxis of natural viral infections of the upper respiratory tract in healthy volunteers. *Epidemiol Infect* 1988; 101: 611-21.
50. Monto AS, Schwartz SA, Albrecht JK. Ineffectiveness of post-exposure prophylaxis of rhinovirus infection with low-dose intranasal alpha 2b interferon in families. *Antimicrob Agents Chemother* 1989; 33: 387-90.
51. Isaacs D. Production of interferon in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1989; 64: 92-5.
52. Taylor CE, Webb MS, Milner AD i wsp. Interferon alfa, infectious virus, and virus antigen secretion in respiratory syncytial virus infections of graded severity. *Arch Dis Child* 1989; 64: 1656-60.
53. Portnoy J, Hicks R, Pacheco F i wsp. Pilot study of recombinant interferon alpha-2a for treatment of infants with bronchiolitis induced by respiratory syncytial virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32: 589-91.
54. Sung RY, Yin J, Oppenheimer SJ i wsp. Treatment of respiratory syncytial virus infection with recombinant interferon alfa-2a. *Arch Dis Child* 1993; 69: 440-2.
55. Kondrat'eva EI, Matveeva LA, Shemyakina TA i wsp. The use of anaferon (pediatric formulation) for prophylaxis of acute respiratory viral infections in preschool children. *Bull Exp Biol Med* 2009; 148: 266-9.
56. Obraztsova EV, Osidak LV, Golovacheva EG i wsp. Interferon status in children during acute respiratory infections. Therapy with interferon. *Bull Exp Biol Med* 2009; 148: 275-8.