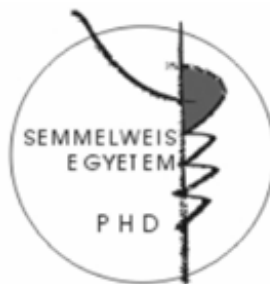


# Komplement aktivációs pszeudóallergia és állatmodelljei

Doktori tézisek

**Dr. Bedőcs Péter**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti orvostudományok doktori iskola



Témavezetők:

Dr. Tóth Miklós, az MTA doktora  
Dr. Szebeni János, az MTA doktora

Bírálok:

Dr. Cervenak László, tudományos főmunkatárs  
Dr. Nékám Kristóf, osztályvezető főorvos

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Prohászka Zoltán, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Varga Lilián, tudományos főmunkatárs, Ph.D.  
Dr. Barkai László, egyetemi tanár, az MTA doktora

Budapest  
2013

## Bevezetés

A komplement aktivációs pszeudóallergia (CARPA) a túlérzékenységi reakciók egy viszonylag új alfaja. Az IgE-közvetítette allergiával szemben ezek a reakciók előzetes szenzitizáció nélkül is kiválthatóak, és a tünetek gyakran enyhülnek, illetve megszűnnek a kiváltó anyaggal történő ismételt találkozások során. A komplement rendszer különböző „útvonalakon” történő aktivációja anafilatoxinok képződéséhez, opszonizációhoz, és lízishez vezethet. Mindezek következtében hízósejtek, granulociták és vérlemezkék aktiválódnak, érhatású mediátorok szabadulnak fel (pl. tromboxán és hisztamin), ami kardiovaszkuláris és egyéb változásokkal jár.

Számos gyógyszerről és egyéb anyagról bizonyosodott be, hogy CARPA kiváltó hatásuk van. Ezek közé tartoznak röntgen kontraszt anyagok, egyes gyógyszer szállító rendszerek, mint például karbon nanocsövek, bizonyos liposzómák (Doxil, Ambisome), micelláris oldószeresek. A CARPA reakciók vizsgálata a gyógyszerkészítmények kifejlesztésének fontos aspektusává vált. Ezen túlérzékenységi reakciók

fontosságát hangsúlyozza az is, hogy az amerikai Food and Drug Administration javasolja in vitro és in vivo komplement aktivációs toxikológiai vizsgálatok elvégzését. A különböző nanorészecskék és a komplement rendszer közötti interakció megértésére in vitro és in vivo módszerek kombinációjának használata szükséges. Számos in vitro módszer áll jelenleg is rendelkezésre a biokompatibilitás és a különböző komplement aktivációs útvonalak vizsgálatára humán szérumban. In vivo tesztekre állati modelleket lehet használni, melyek az emberi körülményeket szimulálják. Ezekben az esetekben a komplex szabályozó mechanizmusok megtartottak, ami lehetőséget ad a különböző fiziológiás és patofiziológiás folyamatok eredeti környezetben történő vizsgálatára.

## **Célkitűzések**

A mikro- és nanoméretű gyógyszerhordozók új generációja fokozott veszélyét hozza magával annak, hogy az immunrendszer ezeket idegenként ismeri fel. A CARPA várhatóan visszatérő probléma lesz a

nanogyógyszerek korában, ezért megértése és megelőzése kritikus fontosságú ezen készítmények K+F folyamata során.

A következő célokat tűztük ki a különböző anyagok komplement aktivációs hatásának vizsgálatára, illetve használatuk biztonságosabbá tételére:

- Létrehozni egy in vivo állatmodellt az intravénásan adagolt anyagok komplement aktivációs pszeudoallergiát kiváltó hatásának vizsgálatára.
- Az in vivo modell összehasonlítása in vitro módszerekkel.
- Ismételt Doxil injekciók hemodinamikai hatásának vizsgálata.
- Doxil in vivo tesztje során tett megfigyelések felhasználása a gyógyszer által kiváltott CARPA reakció kivédésére.
- Polietilénimin polimer nanorészecskék CARPA kiváltó hatásának vizsgálata in vivo és in vitro módszerekkel, illetve azok eredményei közti

különbségek elemzése.

- Egyéb állatfajok CARPA tesztelésre történő használhatóságának vizsgálata.

## **Módszerek**

### **Komplement aktiváció hemodinamikai hatásainak in vivo vizsgálata**

A malac és kutya kísérletek Magyarországon a Semmelweis Egyetemen, valamint az Egyesült Államokban a Uniformed Services University of the Health Sciences (USUHS) egyetemen, az adott intézmények jóváhagyásával történtek. A sertéseket intramuszkuláris ketaminnal történő szedálás után pentobarbitállal vagy isofluránnal altattuk. Előkészítés után a következő paramétereket folyamatosan monitoroztuk és rögzítettük: pulmonális artériás nyomás (PAP), szisztémás artériás nyomás (SAP), centrális vénás nyomás (CVP), elektrokardiogram (EKG), szívfrekvencia (HR), kilélegzett szén-dioxid (ETCO<sub>2</sub>). A tesztanyagokat a Swan-Ganz katéteren keresztül juttattuk a pulmonális keringésbe, 5 ml fiziológiás sóoldattal bemosva. A

különböző tesztanyagok beadása között legalább 20 perces stabilizációs időszakot tartottunk.

### **In vitro komplement teszt**

Humán szérum mintákat gyűjtöttünk egy jóváhagyott protokoll szerint, és azokat felhasználásig  $-70^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. S-fehérjéhez kötött C-terminális komplex és komplement faktor B Bb alegységének koncentrációját mértük ELISA-alapú módszerrel. A tesztelt polimereket  $\text{IC}_{50}$ -nek megfelelő koncentrációban 45 percig inkubáltuk  $37^{\circ}\text{C}$ -on a szérumokkal. A reakció 20-szoros mennyiségű jéghideg diluenssel történő leállítása után a minták SC5b-9 és Bb koncentrációját a megfelelő ELISA kitekkel mértük, a gyártói utasításoknak megfelelően. Minden mérést két ismétléssel végeztünk.

### **Eredmények**

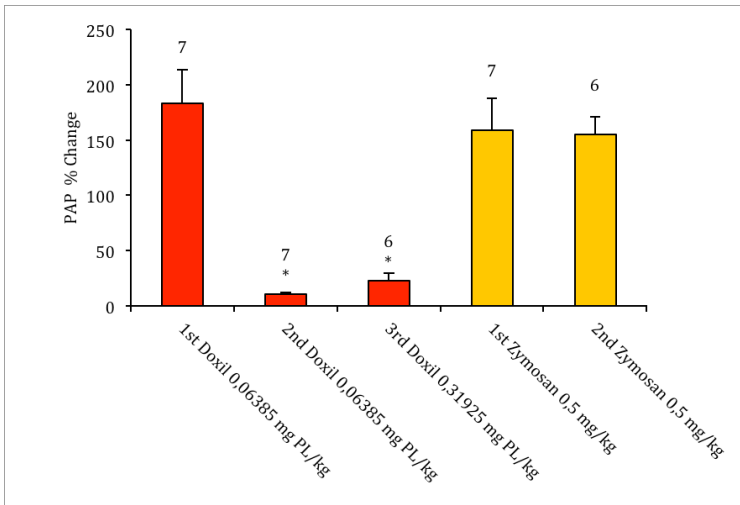
A Doxil komplement aktiváló hatásának vizsgálata céljából 12 malacot első kezelésként  $0.01\text{ mg/kg}$  Doxillal injektáltunk, ami  $0.06385\text{ mg}$  foszfolipid per testsúlykilogramm dózissal felel meg ( $0.06385\text{ mg PL/kg}$ ). A Doxil beadását követően minden állatban akut

pulmonális nyomásemelkedés volt megfigyelhető, pár perccel a beadást követően. A pulmonális artériás középnyomás (PAP) jelentősen emelkedett ( $p=0.0005$ ,  $n=12$ ) 16.5 (15-20.25) Hgmm középértékről 42 (34.5-48) Hgmm-re.

Az első reakció megismételhetőségének vizsgálata céljából hét állatnak az első Doxil injekciót követően egy második azonos dózissal (0.06385 mg PL/kg) Doxil bólust adtunk. Ugyan a PAP 17 (14-19) Hgmm-ről 19 (16-20) Hgmm-re történő változása statisztikailag szignifikánsnak bizonyult ( $p=0.0177$ ,  $n=7$ ), ilyen enyhe emelkedés klinikailag nem releváns, ezért nem tekintjük súlyos pszeudoallergiás reakciónak.

Annak tesztelésére hogy a tolerancia áttörhető-e magasabb dózissal, hat állat egy további, ötszörös Doxil dózist kapott (0.31925 mg PL/kg). Sem a pulmonális (17 (12.75-19.5) és 20 (17.75-22.25) Hgmm,  $p=0.625$ ,  $n=5$ ), sem a sziszémás (89.5 (77.75-97.75) és 86 (74.5-99.75) Hgmm,  $p=0.7865$ ,  $n=5$ ) artériás nyomás injekció előtti és utáni értéke között nem volt szignifikáns különbség.

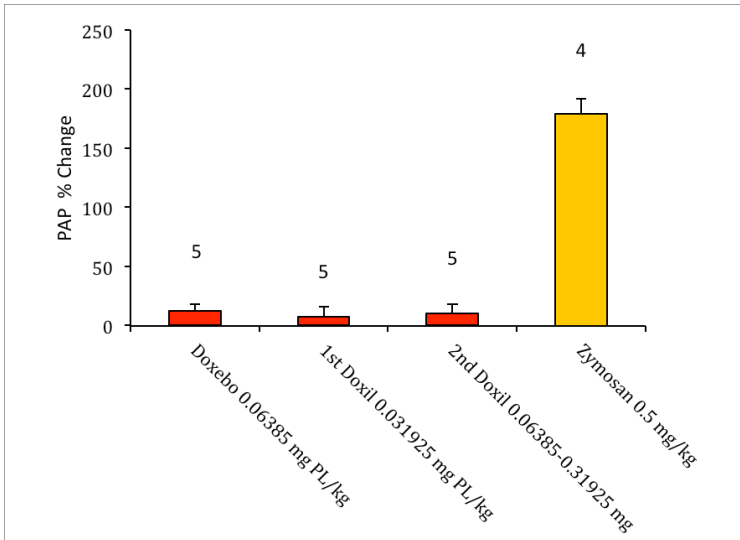
A tolerancia Doxil specifikusságának vizsgálatára a Doxil injekciókat követően két 0.5 mg/kg dózisú Zymosan bólust adtunk az állatoknak, melyek közül mindkettő PAP emelkedést váltott ki, 17-ről 46 Hgmm-re ( $p=0.0156$ ,  $n=7$ ), illetve 21-ről to 50.5 Hgmm-re ( $p=0.0355$ ,  $n=6$ ).



Annak vizsgálatára, hogy a tahiflaxiss jelenség felhasználható-e a Doxil által kiváltott CARPA megelőzésére öt állatot alacsony koncentrációjú lassú Doxebo infúzióval előkezeltünk. Ez egy liposzóma készítmény, mely mindenben azonos a Doxillal azzal az egyetlen különbséggel, hogy nem tartalmaz doxorubicint. Sem a Doxebo ( $p=0.25$ ), sem az ezt követő alacsony



( $p=0.4164$ ) és magas ( $p=0.625$ ) dózisú Doxil injekciók nem okoztak CARPA-t.



Különböző polietilénimin (PEI) polimerek és PEGilált származékaik in vitro komplement aktiváló hatásának vizsgálatára 19 SC5b-9 ELISA mérésorozatot végeztünk hat különböző humán szérummal. Kizárólag a PEI-25kDa változat okozott szignifikáns ( $p=0.0273$ ), dóziszfüggő komplement aktivációt a fiziológiás sóoldat kontrollhoz viszonyítva kilencből három szérumban. A többi változat nem mutatott komplement aktivációt.

A polimerek in vivo komplement aktiváló hatásának vizsgálatára 13 malacot injektáltunk a készítményekkel és a hemodinamikai változásokat elemeztük. Minden vizsgált polimer okozott hemodinamikai változásokat, beleértve PAP emelkedést, SAP emelkedést vagy csökkenést, szívfrekvencia változást, és EKG változásokat. Bizonyos esetekben a reakció annyira súlyos volt, hogy aktív újraélesztésre volt szükség az állat megmentésére. Mindazonáltal a csoportonkénti alacsony elemszám miatt nem tudtunk az egyes polimerekre vonatkozóan statisztikailag értékelhető következtetéseket levonni. Az összes állatot figyelembevéve a pulmonális artériás nyomás jelentősen emelkedett az első bólus után, 14 (12-15.75) Hgmm-ről 34 (19.75-44.75) Hgmm-re ( $p=0.0039$ ,  $n=10$ ). A második injekció utáni emelkedés is szignifikáns volt, 16 (11.5-21.25) Hgmm-ről to 28.5 (16.25-43.75) Hgmm-re, ( $p=0.0059$ ,  $n=10$ ) és statisztikailag nem volt különbség az első és a második bólust követő pulmonális artériás nyomásváltozás között (148.8% (31.73-233.6) vs. 82% (28.27-195.6) emelkedés;  $p=0.2324$ ,  $n=10$ ).

Annak vizsgálatára, hogy kutyák használhatóak-e alternatív in vivo modellként komplement aktiváció tesztelésére a liposzómás gyógyszer Ambisome keringésváltozást kiváltó hatását elemeztük. Akut szisztémás vérnyomásesés volt megfigyelhető az első beadást követően, a SAP 146.5 Hg-ról 81 Hgmm-re csökkent ( $p=0.0313$ ,  $n=6$ ). A malac modelhez hasonlóan itt is megfigyelhető volt tahifilaxis az ismételt bólusok beadása során, és az első injekciót követően sem alacsony, sem magas dózisu Ambisome nem okozott PAP ( $p=0.0625$ , illetve  $p=0.0938$ ,  $n=6$ ) vagy SAP ( $p=0.8438$ , valamint  $p=1$ ,  $n=6$ ) változást.

## **Következtetések**

1. Doxil első beadáskor akut pulmonális hipertenziót okoz. A malac modell komplement aktiváció tekintetében kifejezetten érzékeny erre a liposzóma készítményre. A megfigyelt hemodinamikai változások megfelelnek az egyes érzékeny emberek esetében Doxil kezelés során jelentkező mellékhatások klinikai tüneteinek.

2. Az ismételt Doxil injekciókra tahifilaxis alakul ki, és ezek nem okoznak klinikailag jelentős akut pulmonális hipertenziót vagy szisztémás keringésváltozásokat. A tolerancia még ötszörös dózisonál is fennáll.
3. Doxeboval történő előkezelés felhasználható a Doxil által kiváltott súlyos CARPA reakciók megelőzésére. Ez felveti annak lehetőségét, hogy a jelenséget klinikai körülmények között is kihasználjuk. A gyakran súlyos túlérzékenységi mellékhatások megelőzése elérhetővé teszi ezen kifinomult gyógyszeres kezeléseket azok számára is akik előnyeiket eddig nem élvezhették.
4. A tolerancia Doxebo és Doxil specifikus. A tahifilaxis gyors kialakulása felveti, hogy nem aktív immunmemória sejt aktivációhoz kapcsolódó kialakulásával függ össze. A komplement faktorok felhasználása és kimerülése szintén kizárható, hiszen az erős komplement aktiváló Zymosan hatása a liposzómákkal deszenzitizált állatokban is megmarad.

5. PEI-25kDa dóziszfüggő komplement aktivációt okoz in vitro, míg az összes tesztelt PEI készítmény CARPA-t okoz az in vivo sertés modellben. PEI 25kD váltotta ki a legerősebb reakciót a malac modellben is, és a korlátozott számú kísérletek során nem figyeltünk meg teljes tahifilaxist.
  
6. Kutyák is mutatnak CARPA tüneteket Ambisome beadás hatására, azonban ezek különböznek a malacokban Doxil által kiváltott hemodinamikai változásoktól. Kutyákban a tipikus reakció Ambisome injekció után szisztémás artériás nyomáscsökkenés pulmonális artériás nyomásváltozás nélkül, míg Zymosan hatására a malacokhoz hasonlóan pulmonális artériás nyomásemelkedés alakul ki.

## **Saját közlemények**

### **A disszertáció témájában:**

1: Szebeni J, Bedőcs P, Csukás D, Rosivall L, Büngrer R, Urbanics R. A porcine model of complement-mediated

infusion reactions to drug carrier nanosystems and other medicines. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Dec;64(15):1706-16.

2: Szebeni J, Bedöcs P, Urbanics R, Büngrer R, Rosivall L, Tóth M, Barenholz Y. Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: a porcine model. *J Control Release.* 2012 Jun 10;160(2):382-7.

3: Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszár Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Báthori G, Tóth M, Büngrer R, Barenholz Y. Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine.* 2012 Feb;8(2):176-84.

4: Merkel OM, Urbanics R, Bedocs P, Rozsnyay Z, Rosivall L, Toth M, Kissel T, Szebeni J. In vitro and in vivo complement activation and related anaphylactic effects associated with polyethylenimine and polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Biomaterials.* 2011 Jul;32(21):4936-42.

5: Szebeni J, Alving CR, Rosivall L, Bünger R, Baranyi L, Bedöcs P, Tóth M, Barenholz Y. Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *J Liposome Res.* 2007;17(2):107-17. Review.

**Egyéb témában:**

6: Hood MN, Song T, Bedocs P, Capacchione JF, Kasper CE, Haigney MC, Ho VB. Multiacquisition t1-mapping MRI during tidal respiration for quantification of myocardial t1 in Swine with heart failure. *AJR Am J Roentgenol.* 2013 Oct;201(4):W563-70.

7: Buckenmaier CC 3rd, Capacchione J, Mielke AR, Bina S, Shields C, Kwon KH, McKnight G, Fish DA, Bedocs P. The effect of lipid emulsion infusion on postmortem ropivacaine concentrations in swine: endeavoring to comprehend a soldier's death. *Anesth Analg.* 2012 Apr;114(4):894-900.