

Komplement aktivációs pseudoallergia: Biofizikai, immunológiai és fiziológiai vizsgálatok a mechanizmus felderítésére

Doktori értekezés

Mészáros Tamás

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Szebeni János, D.Sc., egyetemi tanár
- Hivatalos bírálók: Dr. Jedlovszky-Hajdú Angéla, Ph.D., tud. munkatárs
Dr. Prechl József, Ph.D., tud. főmunkatárs
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zrínyi Miklós, az MTA tagja, egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Dobó József, Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Mócsai Attila, D.Sc., egyetemi tanár

Budapest
2018

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Irodalmi háttér	5
2.1 Nanotechnológia és nanomedicina	5
2.2 A komplementrendszer.....	6
2.3 Immunológiai problémák a nanomedicina világában	11
2.3.1 Immunogenitás.....	13
2.3.2 Immunogenitás mechanizmusa.....	13
2.4 Hemokompatibilitási problémák nanomedicinák és biológikumok esetében ..	17
2.5 Túlérzékenységi reakció (HSR)	20
2.5.1 Nanomedicinák okozta HSR.....	20
2.5.2 Nanomedicinák okozta HSR tünetei és jellemzői.....	21
2.5.3 Nanomedicinák komplement általi felismerésének okai	22
2.5.4 CARPA koncepció.....	27
2.5.5 Komplement aktivációban és a CARPA-ban szerepet játszó mechanizmusok	29
2.5.6 Komplement aktiváció szerepe a CARPA-ban.....	33
2.5.7 CARPA klinikai és tudományos jelentősége	34
2.5.8 CARPA előrejelzése és megelőzése	35
2.5.9 CARPA mechanizmusa: „double hit” hipotézise	35
2.5.10 CARPA sertés modellje	38
2.6 Nanomedicinák gyorsított eltávolítása (ABC jelenség)	38
2.7 Liposzóma okozta immunszuppresszió.....	39
2.8 Hemokompatibilitási vizsgálat, elérhető tesztek és hiányosságok	40
2.9 CARPA előrejelző tesztei.....	41
3. Célkitűzések	46
3.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációjának vizsgálata	47
3.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban.	47
3.3 Komplement aktiváció <i>in vitro</i> gátlása H-faktoral.....	48
3.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában.....	48
4. Módszerek	50

4.1	PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációjának vizsgálata	50
4.2	Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban.	54
4.3	Komplement aktiváció <i>in vitro</i> gátlása H-faktoral.....	58
4.4	Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában.....	59
5.	Eredmények.....	64
5.1	PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata	64
5.2	Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban.	75
5.3	Komplement aktiváció <i>in vitro</i> gátlása H-faktoral.....	83
5.4	Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában.....	86
6.	Megbeszélés	97
6.1	PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata	97
6.2	Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban.	98
6.3	Komplement aktiváció <i>in vitro</i> gátlása H-faktoral.....	100
6.4	Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában.....	101
7.	Következtetések.....	103
7.1	PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata	103
7.2	Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban	103
7.3	Komplement aktiváció <i>in vitro</i> gátlása H-faktoral.....	105
7.4	Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásában.....	106
8.	Összefoglalás.....	108
9.	Irodalomjegyzék.....	110
10.	Saját publikációk.....	138
10.1	Disszertáció alapjául szolgáló közlemények.....	138
10.2	Disszertációtól független közlemények.....	138
11.	Köszönetnyilvánítás	141

1. Rövidítések jegyzéke

ABC	Accelerated blood clearance (Felgyorsult vér kiürülés)
ADA	Anti-drug antibody (Anti-gyógyszer antitestek)
ADR	Adverse drug reactions (Nemkívánatos gyógyszerhatások)
AFM	Atomic force microscopy (Atomerő mikroszkópia)
AP	Alternative pathway (Alternatív útvonal)
APC	Antigen-presenting cell (Antigén bemutató sejt)
AS	Ammónium-szulfát
ATR-FTIR	Attenuated total reflection Fourier transform infrared (gyengített teljes reflexiós Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia)
AUC	Area under the curve (Görbe alatti terület)
BVVS	Birka vörösvérsejt
C	Complement (Komplement)
CARPA	Complement activation-related pseudoallergy (Komplement aktivációfüggő pszeudoallergia)
CAS	Cardiac abnormality score (Kardiovaszkuláris eltérés érték)
CCP	Complement control protein (Komplement kontroll fehérje)
CIPA	Complement-independent mechanism of pseudoallergy (Pszeudoallergia komplement független mechanizmusa)
CP	Classical pathway (Klasszikus útvonal)
CR	Complement receptor (Komplement receptor)
CrEL	Cremophor EL
CRP	C-reaktív protein
DAF	Decay accelerating factor (Bomlást gyorsító faktor)
DC	Dendritic cell (Dendritikus sejt)
DLS	Dynamic light scattering (Dinamikus fényszórás)
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (Etilén-diamin-tetraecetsav)
ELISA	Enzym-linked immunosorbent assay (Enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat)
FACS	Fluorescence activated cell sorting (Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás)
FDA	Food and Drug Administration (Élelmiszer- és Gyógyszerfelügyeleti Hatóság)

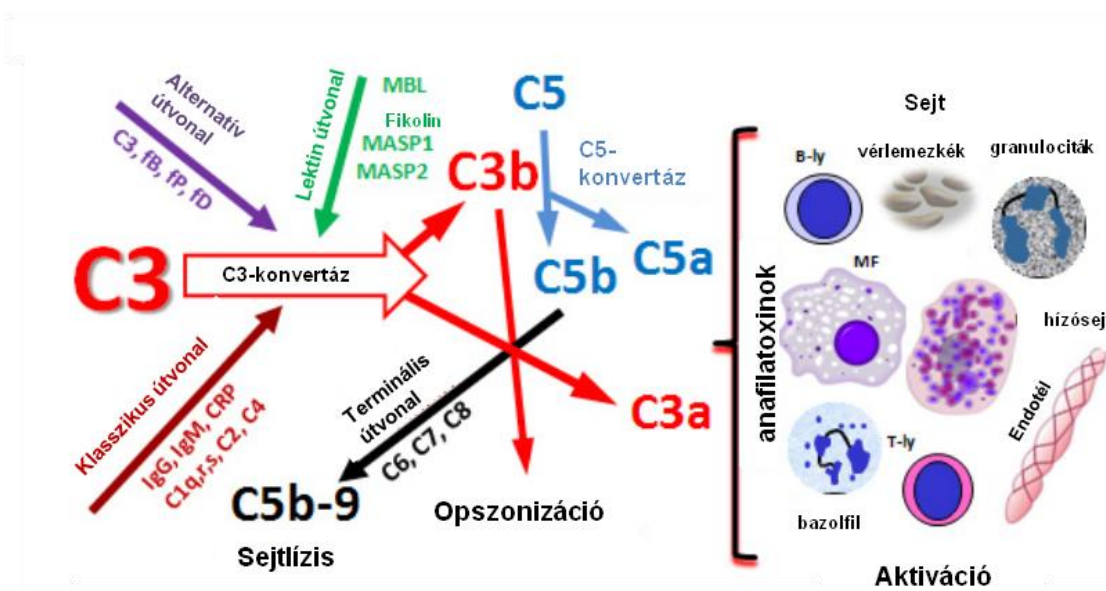
FH	H-faktor
FITC	Fluorescein isothiocyanate (Fluoreszcein-izotiocianát)
GdmCl	Guanidin klorid
HED	Human ekvivalens dózis
HSPC	Hydrogenated soybean phosphatidylcholine (Hidrogénezett szója-foszfatidil-kolin)
HSR	Hypersensitive reaction (Túlérzékenységi reakció)
mAb	Monoclonal antibodies (Monoklonális ellenanyag)
MAC	Membrane attack complex (Membránkárosító komplex)
MASP	Mannose-associated serine protease (Mannóz asszociált szerint proteáz)
MBL	Mannose-binding lectin (Mannán kötő lektin)
MCP	Membrane cofactor protein (Membrán kofaktor protein)
MLV	Multilamelláris vezikula
NHS	Normál humán szérum
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns (Patogén asszociát molekula mintázat)
PAP	Pulmonary arterial pressure (Pulmonális artéria nyomás)
PBS	Phosphate-buffered saline (Foszfát pufferes fiziológiás sóoldat)
PEG	Polietilénglikol
PL	Phospholipid (Foszfolipid)
PIM	Pulmonális intravaszkuláris makrofág
PS-NP	Polystyrene nanoparticle (Poliszitirén nanorészecske)
RPR	Rapid phagocytic response (Gyors fagocita válasz)
SAP	Systemic arterial pressure (Szisztémás artériás nyomás)
SD	Standard deviation (Standard deviáció)
SEM	Standard error of the mean (Átlag standard hibája)
SUV	Small unilamellar vesicle (Kis unilamelláris vezikula)
TLR	Toll-Like Receptor

2. Irodalmi háttér

2.1 Nanotechnológia és nanomedicina

A nano szó, a görög „nanosz” szóból ered, jelentése törpe. Előtagként az utána lévő mértékegység ezermilliomod (10^{-9}) részét jelzi. A nanotechnológia leginkább az 1-100 nm-es tartományra fókuszál és annak megismerése révén próbál beavatkozni, illetve létrehozni olyan struktúrákat, amelyek hagyományos módon nem hozhatók létre. Ennek a tartománynak különlegessége (és sikere a kémiában és az orvostudományban) legfőképpen annak köszönhető, hogy más fizikai, kémiai és biológiai szabályok és sajátságok érvényesek, mint a korábban megismert magasabb mérettartományban.

A nanomedicina egy olyan tudományág, amely a nanotechnológia eszközeit és tudását alkalmazza az orvostudomány területén, a diagnózisban, a terápiában, a betegségek megelőzésében és kezelése során. A nanomedicina magában foglalja nanoméretű anyagok, például biokompatibilis nanorészecskék és nanorobotok használatát az élő szervezetben a diagnózis, a szállítás, az érzékelés vagy a működtetés céljából.



1. ábra Komplement kaskád és a komplement reaktív vérsejtek. Az ábra a komplement aktiváció főbb útvonalait és hatásait, valamint az anafilatoxinokra reagáló vérsejteket mutatja. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

CRP: C-reaktív protein, f: faktor, MBL: mannan kötő lektin, MASP: mannoz asszociált szerin proteáz, MF: makrofág

2.2 A komplementrendszer

Szervezetünk egyik legfontosabb védekező rendszere az immunrendszer, ami *természetes* (veleszületett/natív) és *szerzett* (tanult/adaptív) részekre tagolható. A veleszületett immunitás részét képző komplementrendszer felfedezését Jules Bordet-hez kötik, de már előtte 1887-ben Fodor József leírta a vérsavó baktériumölő hatását, míg a komplement (C) elnevezés Paul Ehrlich-hez (1899) kapcsolható.

1. táblázat Komplementrendszer főbb komponensei. (Prohászka, 2007 nyomán módosítva) (2)

CR: komplement receptor

KOMPONENS	FUNKCIÓ	SZÉRUM KONCENTRÁCIÓ (mg/L)
<i>Aktivációban résztvevő fehérjék</i>		
C1q	IgG és IgM immunkomplexeket köt	100-180
C1r	aktiválja a C1s-t	50
C1s	aktiválja a C4-et és a C2-t	50
C4	kovalensen a C2 aktivátor felszínéhez köt	300-600
C2	aktiválja a C3-at	20-25
MBL	szénhidrát struktúrákat köt	0,002-10
MASP-2	aktiválja a C4-et és a C2-t	0,5
D-faktor	aktiválja a B-faktort	1
B-faktor	aktiválja a C3-at és C5-öt	200
Properdin	stabilizálja a C3bBb-t	55 (monomer)
C3	aktivátor felszínhez köt, aktiválja a C5-öt	1200-1300
C5	C6-ot köt	70
C6	C7-et köt	60
C7	C8-at köt	55
C8	C9-et köt	55
C9	Polimerizálódik, és pórust képez	60
<i>Szabályozó fehérjék (lásd az 1. mellékletben)</i>		
<i>Komplementreceptorok</i>		
CR1	C3b-t és C4b-t köt, az immunkomplexek eliminációját biztosítja	sejthez kötött
CR2	C3d-t köt, B-sejteket aktiválja, és az antitestválaszt szabályozza	sejthez kötött
CR3	Beindítja a fagocitózist, fokozza a fehérvérsejtek adhézióját	sejthez kötött
CR4	Beindítja a fagocitózist, fokozza a fehérvérsejtek adhézióját	sejthez kötött

A komplementrendszer (1. ábra) egy proteolitikus kaszkád, amely 35 glikoproteinekből áll, ezek közül 13 a sejtmembránhoz kötődik és 22 szolubilis formában található meg a plazmában (1. táblázat). A C megjelenik szinte az összes testfolyadékban és a szövetekben proenzimatikus és aktiválatlan állapotban. Fő funkciói az idegen kórokozók (baktérium, vírusok és gombák) szembeni védekezés, részt vesz az immunkomplexek eltávolításában és a gyulladási folyamatokban. Aktivációs

termékeivel együtt kulcsszerepet játszik a szerzett immunrendszer szabályozásában, a T sejt válaszok regulációjában (3). Ezenkívül alapvető fiziológiás funkciója is van a testben (szövetfejlődés, regeneráció apoptótikus sejtek eltávolítása) (2. táblázat) (4-7). Jól kiegyensúlyozott és korlátozott C aktiváció nemcsak a késői apoptótikus sejtek felvételét, de a gyulladásos állapotot fenntartását is segíti. Túlzott vagy hiányos aktivitás, illetve a rendszer egyéb rendellenessége számos betegség egyik legfőbb oka vagy kofaktora (8), beleértve az allergiát és a pszeudoallergiát is.

2. táblázat Komplementrendszer fő biológiai funkciói. (Walport, 2001 nyomán módosítva) (9)

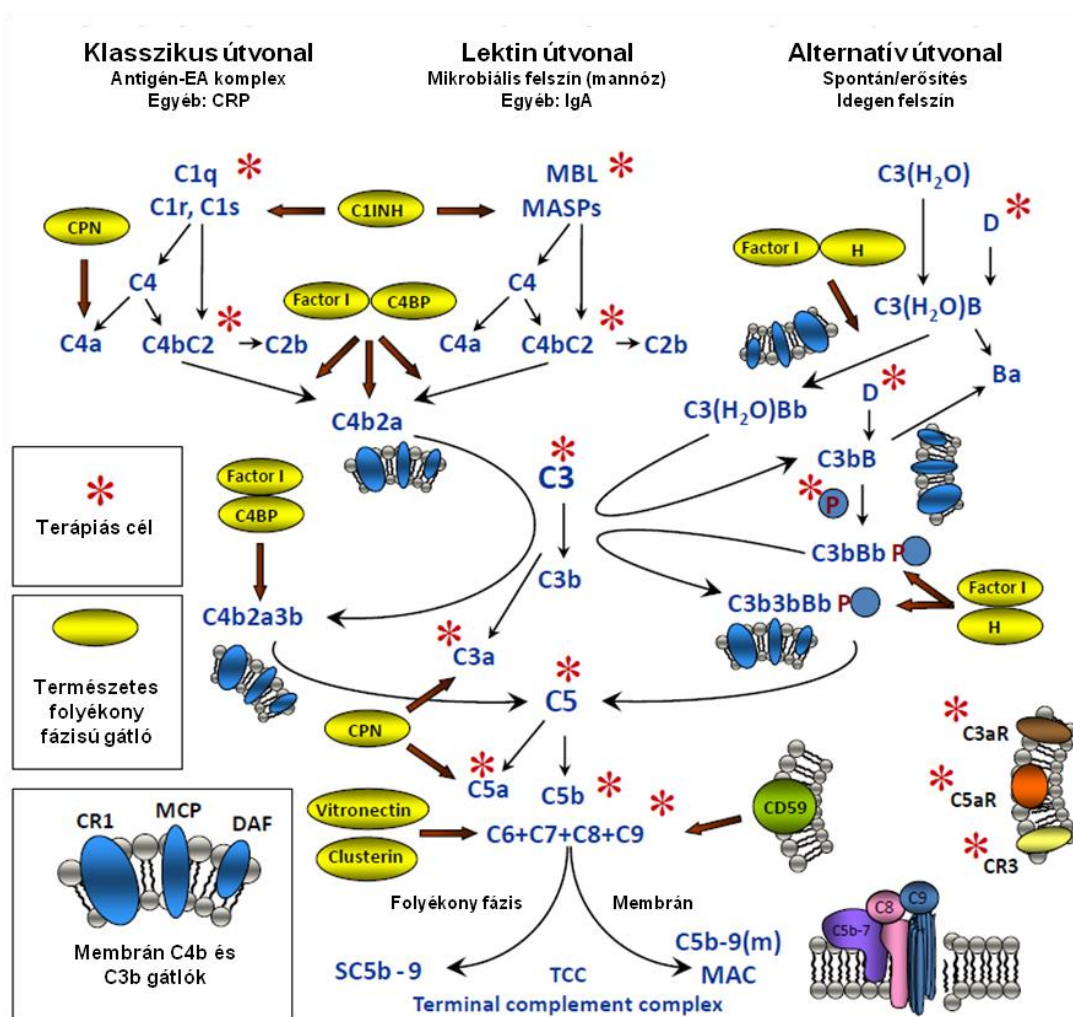
MAC: membránkárosító komplex, MCP: membrán kofaktor protein, DAF: bomlás gyorsító faktor

Biológiai aktivitás	Effektor molekula
<i>Fertőzésekkel szembeni védelem</i>	
Opszonizáció Kemotaxis és leukocita aktiváció, gyulladásos sejt aktiváció Sejtlízis	<ul style="list-style-type: none"> • C3b, iC3b, C4d • C5a, C3a, C4a (anafilatoinok) és ezek receptorai • MAC (C5b-9)
<i>A természetes és szerzett immunválasz összekapcsolása</i>	
Az antitest válasz erősítése Az immunológiai memória fokozása T-sejt válaszok szabályozása	<ul style="list-style-type: none"> • Immunkomplexekhez és antigénekhez kötött C3b és C4d; B-sejteken és antigén prezentáló sejteken kifejeződő CR2 • Immunkomplexekhez és antigénekhez kötött C3b és C4d; folliculáris dendritikus sejteken kifejeződő CR2 • MCP, DAF, CD59
<i>Törmelékek eltávolítása</i>	
Immunkomplexek eltávolítása Apoptótikus sejtek eltávolítása	<ul style="list-style-type: none"> • C1q; kovalensen kötött C3 és C4 fragmentumok • C1q; kovalensen kötött C3 és C4 fragmentumok

Három ismert C aktivációs útvonal létezik (10-16), a klasszikus útvonal (CP), az alternatív útvonal (AP) és a lektin (LP) útvonal (2. ábra). A CP-t aktiválhatják IgG és IgM antitestekből álló antigén-antitest komplexek és a C-reaktív protein (CRP), míg az AP aktivációját leginkább olyan aktiváló struktúrák idézhetik elő, mint a bakteriális felszíni, a C3 vagy a properdin (17). A LP antitestektől függetlenül aktiválódhat MBL vagy fikolinok és olyan szénhidrát tartalmú felületek kölcsönhatása révén, mint ami a baktériumokon és vírusokon található. Az M-fikolin, L-fikolin és az H-fikolin (más néven fikolin-1, 2 és 3) ezen kívül felismerik a patogének, az apoptótikus és a nekrotikus sejtek szénhidrátjait is. A fertőző ágens felismerésén túl a fikolinok két eltérő úton hatnak, egyrészt a MASP-on (MASP-1-3, MASP19 (18, 19) és MASP44) (20, 21) keresztül a lektin útvonal beindítása révén, másrészt a fagocitózis kezdeményezésével.

Nemrég egy ötödik felismerő molekulát is leírtak: a kollektin-11-et (CL11) (22), ami ismétlődő felszíni struktúrákat ismer fel, polimer bevonatokat, fehérje és peptid ligandumokat, töltött felszíni csoportokat vagy cukor maradványokat.

A különböző útvonalakon keresztül történő C aktiválódás független vagy egyidejű lehet. Az AP aktivációja azonban nem csak függetlenül aktiválódhat, hanem egy pozitív visszacsatolási hurok révén a két másik útvonal aktiválódása által is, így eredményezve az aktivációs folyamatok hatékony erősítését. Ezen felül a C3 és C5-ből származtatott anafilatoxinok többszörös funkciója (stimulálja az összes véresejtet valamint az endotél sejteket) és a C3-ból származtatott opszoninok (főleg C3b) lerakódása az idegen vagy az elhalt sejteken, mind a hatékony idegen anyag eltávolítást szolgálják (1. ábra).



2. ábra Komplement aktiváció és gátlás útvonala. (Mollnes, 2002 nyomán módosítva) (23)

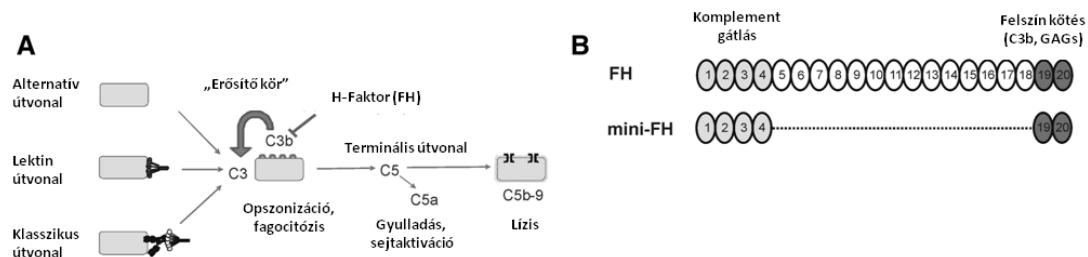
A CP C1 aktiváció révén indul el, ami 3 alegységből tevődik össze (C1q, C1r, C1s). Az aktiválódás első lépésében a C1q kölcsönhatásba kerül az immunkomplexek antitesteknek Fc részeivel, ami maga után vonja a C1r autoaktivációját, aminek hatására a C1s aktiválódik. Az aktiválódott C1s felelős a C4 és C2 hasításáért, melynek révén klasszikus C3-konvertáz (C4bC2a) alakul ki, ami hasítja a C3-t. A C3 hasítása után létrejön a klasszikus C5-konvertáz (C4bC2aC3b). A C5 hasítása után az aktivátor felszínén a terminális C komponensek kapcsolódnak (C6-9) a C5b-hez. A folyamat a membránkárosító komplex (C5b-9) kialakulásához vezet.

A C4bC2a kialakulása a C1 aktivációtól függetlenül szintén megtörténhet, a lektin útvonalon keresztül. Az MBL kötődése aktivátorhoz (mannóz, N-acetilglükózamin tartalmú glikoproteinekhez) maga után vonja a hozzákapcsolódott szerin proteázok (MASP-1, MASP-2, és MASP-3) aktivációját. Bizonyítottan a MASP-2-nek van szerepe a C4 és C2 aktiválásában (24). Az ezutáni lépések megegyeznek a klasszikus útvonalon már ismertetett aktivációs mechanizmussal.

Az AP folyamatosan aktiválódik egy alacsony szinten - a kezdeti aktivációtól függetlenül - egy „tick-over” mechanizmus révén (25). A „tick-over” a C3-ban levő labilis tioészter kötés folyamatos hidrolízise, ami a C3-nak B faktorral való kölcsönhatásához vezet, ezáltal a C3-t a C3(H₂O) bioaktív formává alakítja a folyadékfázisban (26). A B faktort az állandóan aktív formában található D faktor hasítja. A hidrolizált C3-hoz kötött Bb további natív C3-at képes hasítani és így létrejön az alternatív C3-konvertáz (C3bBb), amit a properdin stabilizál. Ez a folyamat önmagát képes gerjeszteni, számos alternatív C5-konvertázt generál (C3bBbC3b), és C5a fragment valamint a MAC kialakulását vonja maga után.

C aktiválódást számos sejtfelszínhez kötött vagy folyékony fázisban található inhibitor szabályozza (2. ábra és 3. táblázat). Az alternatív amplifikáció szintjénél a szabályozás az I- és H-faktor révén valósul meg. Az egyik legfontosabb szolubilis C szabályzó egy 155 kDa-os glikoprotein, a H-faktor (FH) (27-29). 20 C kontroll fehérje (CCP) doménből áll, amiből az 1-4 a FH C gátló funkciójáért felelős, míg a 19-20 a FH felszíni kötődéséért (például alaphártyához és endotél sejtekhez) felel (3B. ábra). Ennek köszönhetően nemcsak a testnedvekben képes gátolni a C aktivációt, hanem a sejtfelszínhez kötötten is (28). FH szabályozza a komplementet AP C3-konvertáz szintjén, mivel gátolja C3bBb konvertáz kialakulását, elősegíti a már kialakult

konvertáz disszociációját és az I-faktor proteázt a C3b enzimatisz inaktivációjában. Ezek a tulajdonságok teszik a FH-t a C aktiváció potens gátlószerévé (3A. ábra).



3. ábra H-faktor (FH) hatásmechanizmusa, illetve a FH és a mini-FH sematikus rajza. (A) Komplement kaszkád egyszerűsített rajza. A C aktiváció három úton keresztül indulhat be, amelyek a központi komponensnél a C3-nál kapcsolódnak össze, ami C3a-ra és C3b-re hasad. Ez utóbbi képezi az ún. alternatív amplifikációs visszacsatolást, illetve a terminális útvonal alapját. A FH játszik szerepet a C3b inaktiválásában és C3b keletkezéséhez szükséges enzim disszociációjában. (B) FH 20 CCP doménből áll. A mini-FH csak a FH főbb funkcionális doménjeit tartalmazza (CCP 1-4 és 19-20) (30). (Mészáros, 2016 nyomán módosítva) (31)

A reguláció a folyékony fázisban nemcsak megfelelő mederben tartja a C aktivációt, hanem hozzájárul ahhoz, hogy megvédje a saját sejteket a C támadástól. A sejtek és szövetek épségéhez ezenkívül a nagyszámban jelenlévő membránkötött C regulátorok is hozzájárulnak. (3. táblázat).

3. táblázat A komplement rendszer főbb regulátor elemei.

Regulátor (mg/L)	CD szám	Funkció	Autoantitestek
<i>Membránkötött komplement regulátorok</i>			
CR1	CD35	Kötődik és inaktiválja C4b-t és C3b	van
DAF	CD55	Gátolja az AP és a CP konvertázt	nincs
MCP	CD46	Gátolja az AP és a CP konvertázt	van
Protektin	CD59	Gátolja a MAC-t	van
<i>Fluid fázisú komplement regulátorok</i>			
C1-Inh (200-240)		Gátolja az aktivált C1s-t, C1r-t és a MASP-kat	van
C4-BP (150-300)		Szabályozza a CP C3/C5 konvertázokat	nincs
H-faktor (200-600)		Szabályozza az AP és a CP C3/C5 konvertázokat	van
I-faktor (30-50)		Szabályozza az AP és a CP C3/C5 konvertázokat	nincs
Properdin		Stabilizálja az AP C3 konvertázát	van
S-protein (300-500)		Gátolja a MAC fuzionálást a membránokban	nincs
Clusterin (50-100)		Gátolja a MAC fuzionálást a membránokban	nincs

Adaptív immunválaszok fokozása C aktiváción keresztül

A 4. táblázatban azok a tényezők vannak felsorolva, amelyek a C kulcsszerepét bizonyítják a specifikus immunválasz kialakulásában. Tulajdonképpen a C szinte minden folyamatot elősegít az adaptív immunitásban, beleértve az antigén prezentációt, az ellenanyag termelést és a segítő valamint a citotoxikus T-sejt válaszokat (anafilatoxinok, opszoninok és C3b és származékai révén).

4. táblázat Specifikus (adaptív) immunitást elősegítő C hatások. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

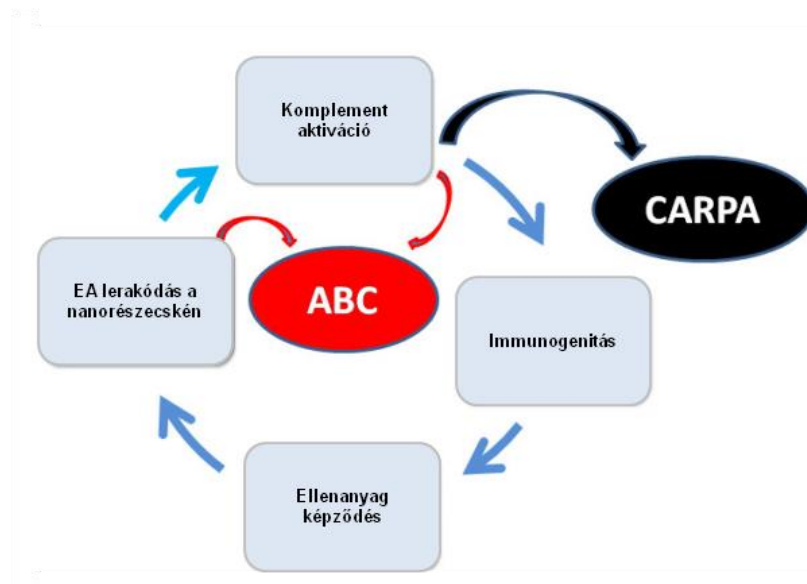
C3 ligandumok: C3b, C3c, C3dg, C3d; APC: antigén bemutató sejt; DC: dendritikus sejt; PBMC: perifériás vér mononukleáris sejtjei

C hatása C3 ligand révén	Cél sejt	Referencia
Kooperáció elősegítése APC és T sejt között	APC, T-sejt	(32, 33)
CD21/CD19/CD81 jelátvitellel járó stimuláció	B-sejt, follikuláris DC	(32, 34-36)
CD21/CD35 jelátvitellel járó stimuláció	B-sejt, follikuláris DC	(32, 34-36)
Sejt túlélés növelése CD21/CD19/Tapa-1-en keresztül	B-sejt	(37-40)
Nyirokcsomóban kialakuló csíráközpontok stimulálása	B és T-sejt	(41-43)
Megnövekedett citotoxicitás a CR2 (CD21)+ célsejtekkel szemben felszín kötött C3b révén	CD8 T-sejt	(44)
Ellenanyag affinitás érlelésének gyorsítása a CR2-hez történő kötődéssel	B-sejt	(45)
IL-1 és IL10 termelés indukálása	Monocita	(46, 47)
IL-6, IL-12, TNF α szuppressziója	Monocita, makrofág, DC, PBMC	(41, 46, 48, 49)

2.3 Immunológiai problémák a nanomedicina világában

A nanomedicinák mérete és komplexitása jelentősen nagyobb, mint a hagyományos kis molekulájú gyógyszereké. Emiatt az immunrendszer idegenként ismerheti fel őket, amihez jelentősen hozzájárul, hogy a nanorészecskék méretben, alakban és bizonyos felületi tulajdonságokban nagyon hasonlóak a vírusokhoz, melyek ellen az immunrendszer hatékonyan fellép.

A C aktiváció, az immunogenitás, a nanomedicinákhoz kötődő gyógyszerellenes antitestek (ADA) képződése egy olyan ördögi kör, aminek megjelenő káros hatásai a komplement aktiváció-függő pszeudoallergia (CARPA) és a felgyorsult vér kiürülés (ABC) jelensége (4. ábra).



4. ábra Nanorészecskék okozta komplement aktiváció, immunogenitás, ellenanyag képződés és lerakódás ördögi köre káros mellékhatásaival: CARPA (komplement aktiváció-függő pseudoallergia) és ABC (felgyorsult vér kiürülés) mechanizmusok. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

Több, mint 50 évvel a liposzómák felfedezése (50, 51), 40 évvel az első liposzóma terápia - Gaucher-kór ellen (52) - és több mint 10 liposzómális gyógyszer (53-55) általános elterjedése után is elmondható, hogy a liposzómák káros immunhatásainak mechanizmusa a mai napig sincs részletesen feltárva. Ez a közeljövőben remélhetően változni fog, mivel egyre több *in vivo* kísérleteket végeznek liposzómális gyógyszerekkel. A korszerű „harmadik generációs” nanoliposzómák tartalmaznak célzó ligandumokat és/vagy fehérjéket, vagy nukleinsavakat (mint aktív alkotórészek), ezáltal sokkal bonyolultabb összetételűek, mint a jelenleg is jóváhagyott liposzómális gyógyszerek. Ezeket azonban az immunrendszer fokozottan felismerheti, mint idegen anyagot. A liposzómák immunológiai hatásainak vizsgálata, a jelenleg fókuszban lévő vakcinális használat mellett, ki fog terjedni a túlérzékenységi reakciók (HSR) és az immunogenitási reakciók útvonalának feltérképezetlen hálózatára. Mivel a gyógyászati nanopartikulumok biztonsága egyre inkább előtérbe kerül, a reaktogenitás és az immunogenitás vizsgálata helyet követel magának a regulációs hatóságok által előírt toxicitás és minőségellenőrzési vizsgálatokban.

2.3.1 Immunogenitás

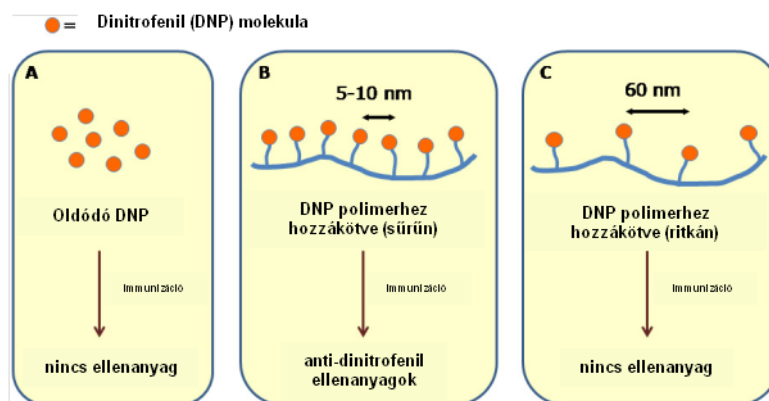
Immunogenitás alatt azt értjük, amikor egy gyógyszer vagy más ágens specifikus immunválasz indukálására képes. Ez lehet ellenanyag közvetített (humorális), sejt közvetített (celluláris) vagy mindkettő egyszerre. Az immunogenitás specifikus antitestek vagy specifikus T-sejt válaszok mérésével értékelhetők. Az anti-gyógyszer antitestek (ADA) megváltoztathatják a gyógyszer farmakokinetikai tulajdonságát az első és a második beadás után, így ronthatják a gyógyszer terápiás hatékonyságát. Ezenkívül az ADA káros immunreaktivitás kialakulásához vezethetnek, sőt bizonyos esetekben súlyos toxicitást is okozhatnak melyek megelőzésére a regulációs hatóságok számos tesztet írnak elő (56, 57).

2.3.2 Immunogenitás mechanizmusa

B-sejtek T-sejt független aktivációja ismétlődő antigén motívumok által

Az immunválasz ezen speciális esetében a B-sejteket az antigének közvetlenül aktiválják, segítő T sejt közreműködése nélkül. Elvileg bármilyen molekula vagy struktúra lehet antigén, de direkt B-sejt aktiválás csak akkor történhet meg, amikor az antigének ismétlődő módon vannak bemutatva ezeknek a sejteknek.

Dintzis és munkatársai mutatták be, hogy még az olyan kis molekulát (más néven haptént), mint a dinitrofenol, is immunogénné lehet tenni, ha polimer hordozóval kötjük össze (58). Hasonlóan a sima poliszacharidokhoz, ezekből a konjugátumokból is hiányoznak a segítő T-sejthez kapcsolódó epitópok. Ellenanyag mégis képződhet, mivel egy B-sejt epitóp (azaz haptén) által a B-sejt receptor keresztükötése révén direkt B-sejt aktiválódás történhet (59). Ezt más haptén-polimer konjugátumok esetében számos munkacsoport is megerősítette és a vizsgálatok kimutatták, hogy a direkt B-sejt aktiválódás fő jellemzői a B-sejt epitópok egy rövid szakasza (5-10 nm) és az ismétlődő egységek minimálisan szükséges száma (10-20) (5. ábra).



5. ábra Ellenanyag T-sejt független keletkezésének sematikus bemutatása. (Dintzis, 1976 nyomán módosítva) (58)

Ha ezek az egymáshoz közel lévő repetitív struktúrák a nanomedicinák felszínén megjelennek, a B-sejtek receptoraikon keresztül felismerik és aktiválódásuk során ellenanyag termelő plazma sejtekké proliferálódnak. Ha nincs jelen további jelátvivő molekula, akkor ez jellemzően egy átmeneti IgM válaszhoz vezet. Ez a legvalószínűbb útja annak a mechanizmusnak, amikor liposzómák beadása során a liposzóma lipid kettősréteg felszínén megjelenő alkotórészei (foszfolipidek és koleszterin) ellen ellenanyagok képződőnek (60-63).

Az i.v. alkalmazott polietilén-glikol (PEG) tartalmú liposzómák kiváltotta IgM válasz közismert az irodalomban (57). Korábban azt gondolták ezekről az ellenanyagokról, hogy a PEG láncok ellen irányul, de a legújabb kutatások szerint az ellenanyag a PEG-et a liposzóma kettősréteggel összekapcsoló része ellen irányul (64). Bár az IgM válaszok esetében hiányzik a memória és viszonylag gyenge (összehasonlítva azzal, ami egy hatékony vakcinához kellene), az ilyen ellenanyagok jellemzően az ismételt alkalmazott nanomedicinák ABC jelenségeihez vezetnek (65-74). Nemrégiben a szubkután alkalmazott PEGilált nanorészecskék esetében is megfigyelték ezt a jelenséget (75).

T-sejt-függő antigén válaszok

Egy korai IgM válaszból kialakuló erőteljes IgG válaszhoz segítő T-sejtek szükségesek. Ez azt jelenti, hogy egy lehetséges immunválasz kockázata jelentősen növekedhet, ha a nanomedicinák olyan fehérje alapú anyagokat (hordozó, gyógyszer vagy célzó ligandum) tartalmaznak, amik T-sejt epitópokat is tartalmaznak. Ebben az

esetben valószínűleg a dendritikus sejtek (DC) játszanak kulcsszerepet, melyek professzionális antigén bemutató sejtek (APC). A DC-k felveszik az anyagokat, feldolgozzák a fehérjéket és bemutatják ezeket a feldolgozott fehérje epitópokat a MHC II-es molekulájukon keresztül a CD4+ segítő T-sejteknek, amelyek aktiválják a B-sejteket. A vakcina irodalomból tudható, hogy ennek mértéke számos tényezőtől függ, a részecske tulajdonságtól (méret, felületi töltés), a kostimulátor molekulák jelenlététől, a dózistól, az adagolástól vagy a kezelés útvonalától (76-78). Továbbá az a tény, hogy a víruszerű részecskék gazdag repetitív struktúrát tartalmaznak felszínükön és a virális fehérjék T-sejt epitópokat hordoznak, amelyek hatásos immunválaszt váltanak ki, azt mutatja, hogy a közvetlen és a DC-mediált B-sejt aktiváció valószínűleg szinergikus folyamat (79).

Az immunogenitás a fehérje terápia egyik legfontosabb kérdése a fehérjék ismételt vagy krónikus kezelése során. Egy terápiás fehérje immunogenitása ezért nagy klinikai jelentőséggel bír, mind az ADA indukált abnormalitás diagnózisában, mind a preklinikai fejlesztések alatt a lehetséges káros hatások előrejelzésében. Emiatt jelentős erőfeszítéseket tesznek, hogy kvantitatív módszereket dolgozzanak ki a fehérje immunogenitás meghatározására, többek közt az ellenanyag kötő tesztek révén (80-87). Ilyen tesztek közé tartozik az enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat (ELISA) és a *surface plasmon resonance* (Biacore) tesztek, amelyek az ADA kötődést mérik a felszínen immobilizált fehérje hatóanyaghoz (ELISA plate, Biacore chip). Általában egy kezdeti szűrést megkötött ADA-ra, a specifikusság megerősítésével és további tesztekkel kell követni annak érdekében, hogy kiderüljön a keletkező és kötött ellenanyagok funkcionálisan aktívak vagy sem, azaz semlegesítik a gyógyszer hatását vagy nem (neutralizáló vizsgálatok). A fent említett ellenanyag vizsgálatok és a fehérje terápiás fejlesztések szintén hasznosak a nanomedicinában (5. táblázat).

Elttekintve ezektől a korlátoktól a legsúlyosabb probléma, hogy a fehérjék és a nanomedicinák immunogenitása emberben csak a humán vizsgálatokban értékelhető véglegesen és még ezek sem fogják teljes mértékben előre jelezni az ADA termelését és következményeit egyedi szinten. A jelenleg rendelkezésre álló ADA-tesztek diagnosztikus jellegűek és nincs olyan *in vitro* vagy állatmodell, amit minden esetben előrejelzésre tudnánk használni annak érdekében, hogy vajon a fehérje hatóanyag vagy a nanomedicinák ellen képződő ellenanyag jelentéktelen vagy jelentős klinikai hatással

lesz-e (88, 89). Ezért felmerül a kérdés, hogy a jelenleg rendelkezésre álló vizsgálatok validálása és optimalizálása helyett nem lenne-e hasznosabb olyan újfajta technológiák bevezetése, amelyek már a gyógyszerfejlesztés preklinikai fázisában segíthetnének az immunogenitás előrejelzésben.

5. táblázat Fehérje terápiában használt immunogenitási vizsgálatok hiányosságai. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

• Alacsony érzékenység (különösen alacsony affinitású ellenanyagok detektálásában)
• Immunglobulinok detektálásának hiánya, amelyek nagy affinitással kapcsolódnak a gyógyszer molekulához
• Alacsony jel—zaj arány a nem specifikus kötődés és a már létező lehetséges (természetes) antitestek jelenlétének következtében
• Háttér és a kiugró értékhatárok önkényes megválasztása
• Rögzített, lebegő vagy dinamikus vágási pontok szubjektív használata a pozitív minták megkülönböztetésére a negatív mintáktól
• Statisztikák következtelen használata, pl. parametrikus vagy nem-parametrikus
• Magas inter-assay változékonyság
• Alacsony „assay hatóanyag tolerancia” (a vizsgált hatóanyag nagy valószínűséggel befolyásolja a tesztet)
• Mátrixhatások esetleges jelenléte

Liposzóma immunogenitás

A természetes vagy természetes alapú (sztereokémiára és összetételre vonatkozóan), szintetikus vagy félszintetikus foszfolipidekből felépülő liposzómák általában nem immunogének. Ez az állítás látszólagos ellentétben van a liposzómális vakcinák folyamatos intenzív kutatás és fejlesztésével. Azonban nem szabad megfeledkezni, hogy ezek a vakcinák fehérjéket, szénhidrátokat, lipid antigéneket és adjuvánsokat valamint más mediátorokat is tartalmaznak, pl. a lipid A, muramil-dipeptid és származékaik, Interleukin-1 és 2, valamint maga a foszfolipid (PL) kettősréteg is viselkedhet adjuvánsként (90). Mikor adjuvánsokat alkalmaznak, specifikus ellenanyagok keletkeznek a liposzóma komponenseire, beleértve a szerkezeti (foszfo)lipideket, a koleszterint, a szkvaléneket és a koleszterin prekursor triterpéneket is (91-94).

A PL kettősréteg elősegíti a liposzómális antigének és a nem-antigén lipid összetevők (további adjuvánsok nélkül) elleni specifikus immunválaszt, amire az „array teória” (95) nyújt egy valószínű magyarázatot. Az elméletet szerint az immunogén liposzómák felszínén lévő konjugátumok vagy blokk formájában ismétlődő felületi

elemek a virális kapszid glikolipidek és glikoproteinek szabályos és szimmetrikus térbeli elrendezéseihez hasonlítanak. Ezekre az APC és más immunsejtek (monociták/makrofágok, dendritikus sejtek, B-sejtek és hízósejtek) az ún. mintázatfelismerő receptorokon keresztül reagálnak, ami veleszületett immunválaszokat eredményezhet.

Eredetileg a Toll-like receptorok (TLR) ismerik fel a patogén felületén lévő jellegzetes mintázatokat (Patogén asszociált molekula mintázat - PAMP), a lipopoliszacharidokat, lipoproteineket, lipopeptideket, flagellineket, kettős szálú RNS-t vagy a bakteriális és vírus DNS metilálatlan CpG szigeteit. A liposzóma tömbök - PAMP hiányának ellenére - szintén kiválthatják ezt a „veszély” jelet immunsejtekben, ami végső soron ellenanyag termelődéshez vezethet a „pszeudo-PAMP”-ok ellen. A kapott immunválasz az immunaktiváció útvonalától függ.

2.4 Hemokompatibilitási problémák nanomedicinák és biológikumok esetében

A nanomedicinák közé a szintetikus és félszintetikus gyógyszerek, hatóanyagok és gyógyszer szállító rendszerek széles köre tartozik, melyeknek összetettsége és nanométeres tartományban lévő méretük különbözteti meg őket a hagyományos (Lipinski típusú) kis molekula tömegű gyógyszerektől (96). A biológikumok szintén nagy molekula tömegű gyógyszerek, melyek élő szervezetekből és termékeikből származnak. A legismertebb biológikumok (antitestek, szérum fehérjék, enzimek) méret tartománya (8-20 nm) és molekuláris összetettsége, szintén a nanomedicinák közé emeli őket, azonban gyakorlati okokból csak a funkcionálisan módosított (PEGilált vagy konjugált) biológikumok tekinthetők nanomedicináknak.

A nanomedicinák és biológikumok közös jellemzői, hogy bár a modern gyógyszerterápia frontvonalában vannak és példátlan piaci növekedést mutatnak, mégis van egy egyedi toxicitási problémájuk, amit mind a mai napig nem sikerült megoldani. Képesek stimulálni az immunrendszert, ami allergia-szerű túlérzékenységhez vagy infúziós reakcióhoz vezethet. Ez egy jelentős és potenciálisan letális hemoinkompatibilitás, amelynek tünetei szinte az összes szervrendszert érintik (6. táblázat).

6. táblázat Infúzió indukálta hiperszenzitív reakciók tünetei. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

Keringési rendszer	Légzőrendszer	Gyomor-bélrendszer	Bőr/Nyálkahártya	Szomatikus idegrendszer	Vegetatív idegrendszer
Angiödéma	Légzésszünet	Hányinger	Elkékülés	Hátfájás	Hidegrázás
Aritmia	Hörgögörcs	Hányás	Bőrpír	Mellkas fájdalom	Izzadás
Kardiogén sokk	Köhögés	Fémes íz	Elpirulás	Mellkasi nyomásérzés	Láz
Magas vérnyomás	Légszomj	Hasmenés	Bőrkiütés	Fejfájás	Zihálás
Alacsony vérnyomás	Hiperventiláció	Görcsölés	Orrnyálkahártya gyulladás	Halálfélelem	Forróság-érzés
Oxigén hiány	Gégegörcs	Puffadás	Duzzadás	Félelem	
Szívinfarktus	Tüdő - infiltrates		Csalánkiütés	Pánik	
Gyors szívverés	Légzési nehézség		Orrdugulás	Hidegrázás	
Kamrafibrilláció	Nehézlégzés		Zihálás	Nyomásérzése torokban	
Ödéma	Tüsszentés		Viszketés	Szorongás	
Halál	Rekedtség		Angiödéma	Zavarodottság	
Tudatvesztés	Sípoló légzés		Könnyezés	Szédülés	
Ájulás			Kötőhártya gyulladás		

Az infúziós reakció jelenthet „valós” allergiát, ami a reaktogén hatóanyag ismételt beadása után lép fel. Ilyenkor részt vesz immunmemória is a specifikus IgE képződése során. A másik típusú reakció nem függ az IgE-től és részben a C rendszer aktivációjának következményeképp alakulhat ki. Ezt hívják CARPA-nak.

A C aktiváció hozzájárulhat, vagy egyedüli oka lehet az infúziós reakcióknak. Számos egyedi sajátága van az IgE által közvetített allergiához képest (7. táblázat), legfontosabb, hogy a CARPA már az első beadás után megfigyelhető és a reakció idővel és ismétlés során veszít az erejéből (6).

7. táblázat Valódi és a pszeudoallergiát megkülönböztető jellemzők és a reakciók osztályozása. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

Tulajdonság	Valódi allergia (IgE mediált)	Pszeudoallergia (komplement mediált)
Reakció első beadáskor	nincs	van
Megismételt beadás esetén a lappangási idő	rövidül	elnyúlik
Ismételt reakció erőssége	növekvő	csökkenő
Tolerancia (tachyphylaxis)	nincs	lehetséges
Gyulladásgátló premedikáció hatásossága	nem	igen
Akut pulmonális infiltráció	nincs	van
Tünetek fokozatai		
I. fokozat	Enyhe és átmeneti tünetek, infúzió megszakítás, beavatkozás nem szükséges	
II. fokozat	Infúzió megszakítást és/vagy terápiát igényel, tünetek azonnal válaszolnak a kezelésre (antihisztaminok, NSAID, narkotikumok, i.v. folyadékok), profilaktikus gyógyszerek 24 órán keresztül	
III. fokozat	Hosszantartó (vagyis nem reagál gyorsan a kezelésre és/vagy az infúzió rövid megszakítására), a tünetek megismétlődnek a kezdeti javulás után, kezelés más klinikai következményekre (pl.: vesekárosodás, tüdő infiltráció)	
IV. fokozat	Életveszélyes anafilaxis, korhízi életmentő beavatkozást igényel	
V. fokozat	Halál	

Liposzóma okozta immunválaszok típusai és jellemzői

A liposzómák immunhatásai lehetnek stimulálóak és gátlóak, gyengék, közepesek, súlyosak, mindegyik egy széles egyedi variációval, a kezdet idejétől és az elhúzódás mértékétől függően (8. táblázat). Az említett időfüggő különbségeken túl a liposzómák okozta immunhatások az immunrendszer különböző részeiben, a veleszületett vagy az adaptív immunrendszeren keresztül fejthetik ki stimuláló vagy gátló hatásukat. A reaktogenitás kifejezés olyan aktivációs folyamatra utal, amelyben részt vesz a veleszületett és az adaptív immunrendszer is, míg az immunogenitás rendszerint B és T sejtek közreműködésével keletkező adaptív immunválaszra utal. Antigenitás, azaz a liposzómák antigénként való viselkedése, nem feltétlen jelent reaktogenitást vagy immunogenitást, mivel az antigének akár felismerhetetlenek maradhatnak vagy immunszuppressziót (toleranciát) okozhatnak.

8. táblázat Liposzóma által kiváltott immunválaszok típusai, a kezdet és az időtartam függvényében. (Barenholz, 2012 nyomán módosítva) (98)

Változás típusa	Kezdet	Időtartam	Példa és hivatkozás
Stimuláció	Azonnali (mp-percen belül)	Percek-órák	Liposzóma okozta HSR (99-102)
	Késleltetett (órákon belül)		
	Késői (nap-hónapokon beleül)	Hetek-évek	Immunitás Liposzóma antigénekre (50, 52, 90-93, 103-107)
Gátlás	Rövid időszak	Órák-napok	Liposzómális alendronát (108)
	Hosszú időszak	Nap-hónapok	Doxil indukálta immunszuppresszió (109-111)

Eddig a liposzómák immunrendszerre gyakorolt hatásának két aspektusával foglalkoztak. Az első, az 1970-es években, a PL kettősréteg későn megjelenő és tartós immunogén hatása, amit a liposzómális vakcinák hasznosítanak antigén hordozóként és adjuvánsként. A liposzómák általi immunstimuláció második „rossz” aspektusa, azaz, a káros következményekkel járó immunreakciók növekedése csak 20 évvel később jelent meg, miután klinikai vizsgálatok kezdődtek a liposzómális gombaellenes és rákellenes gyógyszerekkel (Amibsome és Doxil) (107, 112-116).

Liposzómák okozta akut HSR-rel kapcsolatban időről-időre jelentek meg cikkek azóta, hogy az első klinikai vizsgálatot 1986-ban elvégezték (117). Mindenféle liposzóma és lipid alapú gyógyszer képes okozni ilyen reakciót, melyeknek igen széles irodalmuk van (118-127). Gyakorisága, premedikációt és/vagy más óvintézkedéseket követően, mint például a kezelés idejének megnyújtása az infúzió nagyon lassú kezdeti sebességével, általában 10% alatt marad (8, 99, 128).

2.5 Túlérzékenységi reakció (HSR)

2.5.1 Nanomedicinák okozta HSR

A 9. táblázat az olyan klinikumban használt gyógyszereket és hatóanyagokat sorolja fel, melyekről ismert, hogy akut HSR-t okoznak. Ezek közül a liposzómák és a micellumok tipikus nanomedicinák, ellentétben a monoklonális antitestekkel és egyéb fehérje alapú gyógyszerekkel, amelyek nanomedicina státusza vitatott. Bár méretük a nano tartományban van (8-10 nm), de gyártási technológiájuk inkább bio-, mintsem nanotechnológia. Összességében elmondható, hogy nem minden C reaktogén gyógyszer

nanomedicina, de minden nanomedicina képes kiváltani a C aktivációt és a hozzá kapcsolódó HSR-t.

A kereskedelmi forgalomban kapható liposzómák, micelláris gyógyszerek, oldószerek és a radiokontraszt anyagok esetében számos *in vivo* és *in vitro* bizonyíték van a C aktivációra (8, 98, 129-145), amelyek alapján feltételezhetjük, hogy a HSR oka CARPA.

9. táblázat Klinikumban használt gyógyszerek és anyagok, amelyek CARPA-t okoznak. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

Liposzómális gyógyszer	Micelláris gyógyszer	Monoklonális ellenanyag	Kontraszt anyag	Enzim	Egyebek
AmBisome	Etoposide	Avastin	Iodixanol	Abbokinase	Copaxone
Amphocyl	Fasturec	Campath	Iohexol	Actimmune	Eloxatin
Amphotec	Elitec	Erbix	Iopromide	Activase	Orencia
DaunoXome	Taxol	Herceptin	Iothalamate	Aldurazyme	Salicilates
Doxil	Taxotere	Mylotarg	Ioversol	Avonex	
Myocet	Vumon	Remicade	Ioxaglate	Fasturtec	
Visudyne		Rituxan	Ioxilan	Neupogen	
		Vectibix	Lopamidol	Plenaxis	
		Xolair	Magnevist	Zevalin	
			Odixanol		
			SonoVue		

2.5.2 Nanomedicinák okozta HSR tünetei és jellemzői

A CARPA leggyakoribb tünetei (8, 99, 136, 137, 146) a kiütések, hasfájás, légszomj, mellkasi fájdalom, alacsony és magas vérnyomás, hidegrázás és a tachycardia

10. táblázat). Mindemellett az allergia szinte bármilyen szisztémás manifesztációja előfordulhat, akár hirtelen halál is (0,01–0,1%-ban), ami masszív anafilatoxin (C3a, C5a) felszabadulás és azok szívre gyakorolt hatása következtében fordulhat elő (99, 100). A gyógyszer indukálta akut HSR diagnózisára, sajátosságaira, értékeléseire és kezelésére az irodalomban számos cikket lehet találni (98, 142, 143, 147-152).

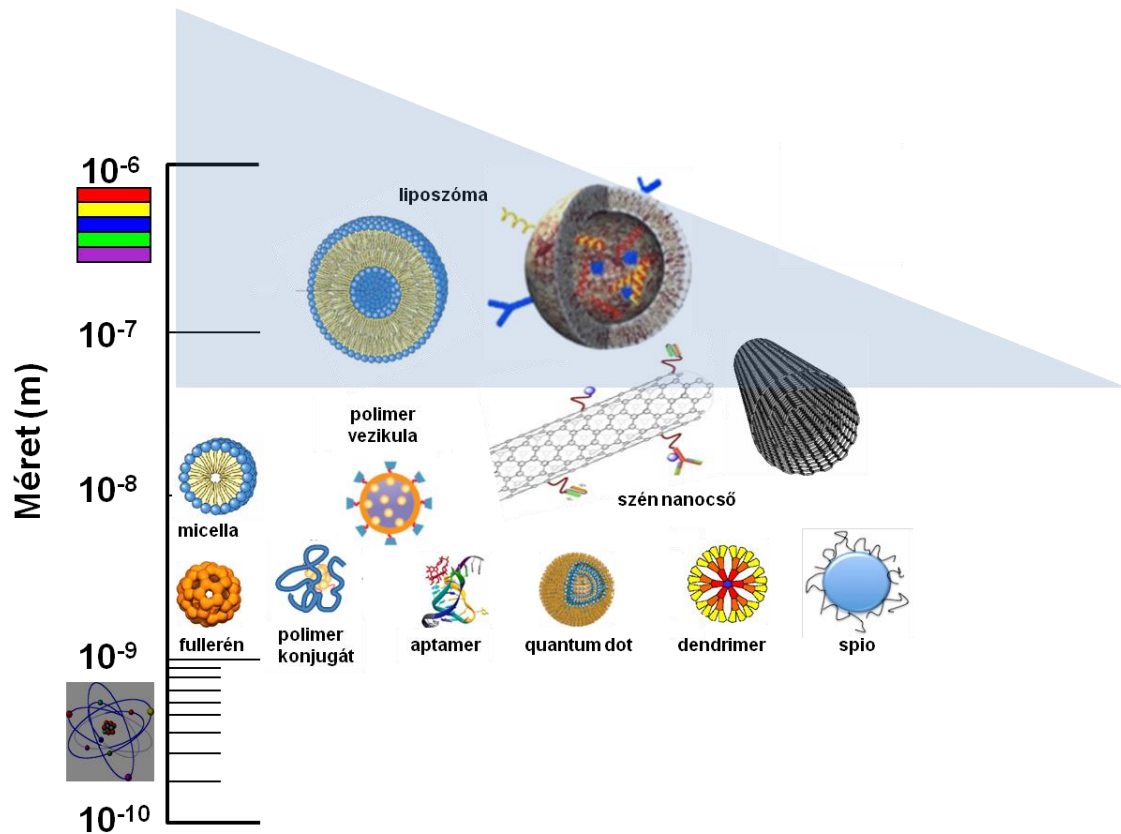
10. táblázat Doxil okozta HSR különböző tüneteinek gyakorisága^a. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

^aA százalékos becslések a Doxil mellékhatásairól szóló jelentések weboldaláról származnak (http://www.patientsville.com/medication/doxil18_side_effects.htm#reports).

Tünet	%	Tünet	%
Kiütés	31,3	Bőrpír	8,4
Hasfájás	29,8	Aritmia	6,8
Légszomj	29,5	Tüdő infiltráció	6,3
Mellkasi fájdalom	26,5	Lassú szív működés	6,1
Alacsony vérnyomás	20,6	Anafilaxis	6,0
Magas vérnyomás	19,4	Többszervi elégtelenség	5,7
Hidegrázás	16,6	Mentális állapot változás	5,7
Tachycardia	16,4	Anafilaktikus sokk	4,6
Sokk	15,3	Zavartság	3,4
Fibrilláció	14,6	Elmezavar	2,9
Szívleállás	13,5	Légzésszünet	2,3
Szívinfarktus	12,5	Kamrafibrilláció	1,3
Szívelégtelenség	10,3	Hirtelen halál	0,4
Viszketés	10,2		

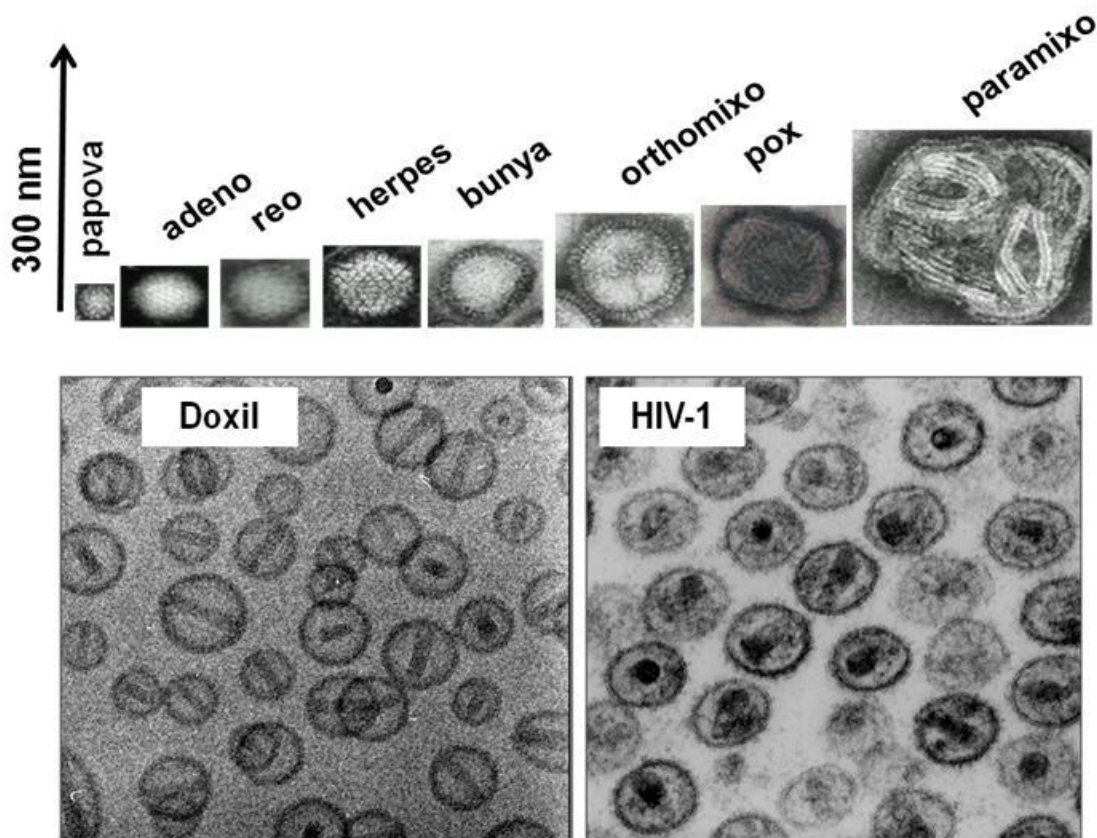
2.5.3 Nanomedicinák komplement általi felismerésének okai

A nanomedicinák (6. ábra), bár nem immunogén molekulákból vagy polimerekből állnak, méretük (50-200 nm) és felületi jellemzőik (molekuláris elrendezések és ismétlődő elemek) miatt hasonlítanak a C rendszer által felismerhető emberi patogén vírusokra.



6. ábra Gyógyszert szállító nanorendszerek és az immunrendszer felismerés határa (kék háromszög). (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

A legtöbb kórokozó human vírus osztály a 40-300 nm-es tartományban van (7. ábra felső kép), ahol a legtöbb globuláris vírus nagyon hasonlít a nagy unilamelláris vezikulákhoz (LUV), míg a paramixovírusok a multilamelláris vezikulákkal (MLV) mutatnak hasonlóságot. Érdeemes azt is megjegyezni, hogy a hepatitis B felszíni antigén részecskék szintén megkülönböztethetetlenek a kis unilamelláris vezikulától (SUV) (153). Az általános természeti erők okozta hasonlóságnak egy kitűnő példája a Doxil (amely az első FDA elfogadott nanomedicina volt (154)), ami szinte teljesen ugyanúgy néz ki, mint a HIV-1 vírus (7. ábra alsó kép).



7. ábra Kórokozó humán vírusok méretei (felső), illetve a Doxil és a HIV közötti hasonlóság (alsó). (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

Ez a méret átfedés a liposzómák és vírusok között nem véletlen, hanem azon általános fizikai szabályok és erők következménye, amelyek a PL kettős membránokat vezikulákká alakítja élő rendszerekben és a kémcsőben egyaránt.

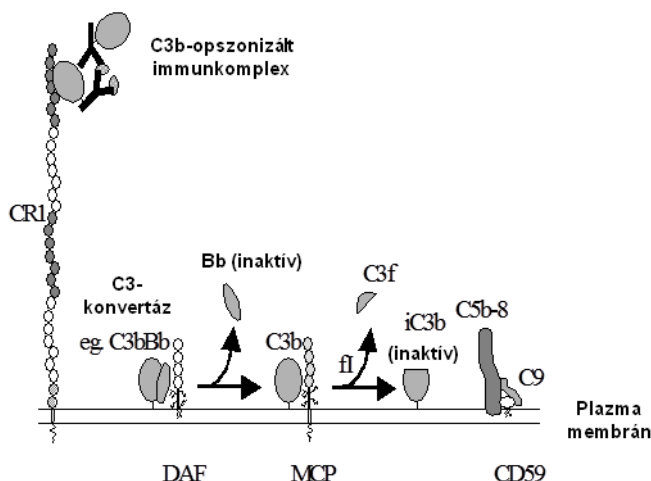
A vírusok mellett a liposzómák szintén hasonlítanak az ektoszómákhoz - azaz olyan membrán molekulákhoz, amelyek leszakadtak a sejtről, valamint a legtöbb ektoorganellumhoz és a sejthalál során keletkező sejtörmelékekhez. Nanobaktériumok (amelyek a legkisebb önreprodukáló patogének) is szintén ebben a liposzóma mérettartományban vannak (100-200nm) (155). Lényegében a liposzómák a patogén mikrobák és néhány szubcelluláris struktúrák méretét és alakját utánozzák, amelyek ellen a természet kifejlesztett egy erős elimináló mechanizmust a humorális és a sejtes immunválaszon keresztül.

11. táblázat Klinikailag alkalmazott liposzómák és humán vírusok mérettartománya. (Barenholz, 2012 nyomán módosítva) (98)

„*” Alsó és felső határok a minimum és a maximum értékeket mutatják, amelyek mikrobiológiai (vírus) szakkönyvből, gyógyszer leírásból (liposzómák) vagy más internetes forrásokból származnak. Megjegyzendő, hogy sok más FDA által jóváhagyott liposzóma (például Abelcet, Visudyne, DepoCyt, Extrasorb, DepoDur) mérete eltér a táblázatban felsoroltaktól vagy nem találhatóak meg a szakirodalomban.

Liposzómális gyógyszer	Méret* (átmérő, nm)		Vírus család	Méret* (átmérő, nm)	
	Alsó határ	Felső hatás		Alsó határ	Felső hatás
AmBisome	45	80	Adeno	70	90
Amphocyl	115	115	Arena	50	300
Amphotec	115	115	Calici	35	40
DaunoXome	45	45	Corona	120	160
Doxil	80	95	Flavi	40	60
Epaxal	100	200	Hepadna	42	42
Inflexal V	100	200	Herpes	100	120
			Orthomyxo	80	55
			Papova	45	250
			Paramyzo	120	300
			Pox	250	75
			Reo	75	120
			Retro	80	180
			Rhabdo	75	70

A második fő ok, amely a liposzóma immunfelismerésének alapjául szolgál, hogy a kettős membránról hiányoznak az C aktiválást gátló molekulák. Az 8. ábra mutatja, azokat a CCP-eket, melyek normál esetben megvédik a sejteket a C aktiválás hatásaitól. Ezek közé tartozik a CR1, a DAF, az MCP és a CD59. Ezek a nagymértékben konzervált CCP-k általában ismétlődő aminosav szekvenciákat tartalmaznak, amiket „Sushi” doméneknek hívunk (156). Felgyorsítják a membránon lerakódott C fehérjék, legfőképpen a C3-konvertáz és a C3b bomlását (98, 157).



8. ábra Komplement támadástól megvédő membrán proteinek a gazda sejteken. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

CR1 megköti a C3b-t és a C4b-t, elősegítve fizikai disszociációjukat (DAF), fokozza a plazma szerin proteáz okozta C3-konvertázok katalitikus bomlását (I-faktor; kofaktor aktivitás), Továbbá a CR1 megköti a C3b-opszónizált részecskéket és az immunkomplexeket, kiemeli az aktivációs kaszkádból és elszállítja őket a retikuloendotéliális rendszer sejtjeihez. A DAF szintén megköti a C3-konvertázt és felgyorsítja részekre bomlásukat. Az MCP kofaktorként segíti az I-faktor enzimet, míg a CD59 - mint az utolsó védelmi vonal -, megakadályozza a C9 kötődését és polimerizációját, és így a MAC kialakulását (158). Ezen membrán fehérjék hiányában a liposzómális gyógyszerek támadási felületet nyújtanak az immunrendszer számára, amely során a gyulladásozó reakciók károsítják a szervezetet és a liposzómákat is.

Még egy további, fontos szempont a nanomedicinák okozta C aktivációban, hogy a felszínükön olyan molekulák jelenhetnek meg, amiket a C fehérjék képesek megkötni. Ide tartoznak bizonyos lipidek, szénhidrátok, polimerek és fehérjék. A nem saját fehérje általában számos antigén epitópot hordoz, ami ellen a szervezet ellenanyag termeléssel válaszol. Az ilyen ellenanyagok kötődnek az idegen fehérjéhez és aktiválják a C rendszert. A liposzómák koleszterinje és foszfolipidjei kötődhetnek természetes antitestekhez, amiről kimutatták, hogy a liposzómális C aktiváció és a bezárt összetevők felszabadulásának is az alapja lehet (60, 62, 63, 92, 104, 159).

A nanomedicinák (beleértve a liposzómákat (159) és a dendrimereket (160)) felszínén lévő negatív vagy pozitív töltések közvetlen kötést alakíthatnak ki a C1q-val

ellenanyagokon vagy CRP-n keresztül (136). A liposzómákon lévő PEG kötődik anti-PEG-ellenanyagokhoz (66, 67, 70, 71), míg a szén nanocsövek - proteinek mellett - főként az MBL és fikolinhoz kötődnek (132, 161, 162). Különböző antitest osztályoknak különböző C aktiváló képessége van, a legerősebb ezek közül az IgM.

2.5.4 CARPA koncepció

A „nemkívánatos gyógyszerhatások” (Adverse Drug Reactions - ADRs) lehetnek allergiás és nem-allergiás, más néven A- és B-típusú reakciók (149). Az A-típusú reakciók dóziszfüggőek és előrejelezhetőek, míg a B nem dóziszfüggő és nem jelezhető előre. Az „allergiás” vagy túlérzékenységi reakció kifejezés tág és korlátozott jelentéssel bír. A reakció tág jelentése a Gell és Coombs (163, 164) négy féle klasszikus kategorizálásából származik, amik lényegében lefedik az összes rendellenes immunjelenséget emberi betegségekben. Ezzel szemben a túlérzékenység vagy az allergia mindennapos jelentése, akut immunreakció egy bizonyos allergénre (pollenre, vegyi anyagokra, gyógyszerekre). A túlérzékenység állapota gyógyszerre vagy hatóanyagra, vagyis hajlam a „valódi” vagy pseudoallergia kifejlődésére, öröklött valamint szerzett tényezőkből állhat (12. táblázat). Számos egyéb osztályozás és besorolás létezik az ADR-re (149, 165-169), amik közül az egyik a CARPA koncepció, ami azután született meg, hogy a C aktiváció sok nem-allergiás (pseudoallergiás vagy B-típusú) reakciót magyarázhat meg.

12. táblázat A túlérzékenységi reakciók kialakulásának kockázati tényezői (152). Néhány kockázati tényező súlyos pseudoallergiához vezethet. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

• Atópiás összetétel
• Keringő limfocita szám $\geq 25\ 000\ \text{mm}^3$
• Egyidejű β -adrenerg blokkoló kezelés
• Egyidejű autoimmun betegség
• Női nem
• Gyógyszerallergia története
• Kor
• Rosszindulatú limfóma (köpenysejtes limfóma, krónikus limfoid leukémia)
• Meglévő szív- és tüdőbetegség

Később a CARPA-t a Gell és Coombs I. típusú reakció alkategóriájának javasolták (163), ezzel enyhítve azt a megoldatlan paradoxont, hogy számos HSR és ADR nem volt beilleszthető ebbe a rendszerbe (170). A CARPA koncepció kimondja, hogy a B-típusú nem-allergiás ADR-ek és HSR-ek nagy hányada C aktiválódáshoz kapcsolható (99).

A koncepciót, miszerint a C aktiváció alapjául szolgálhat a nem IgE közvetített infúziós reakcióknak, az 1999-es i.v. liposzóma kísérletek alapján javasolták. Liposzomális Doxorubicinnel (Doxil) végzett kísérletek során a bizonyítékok - a hemodinamikai változások sertésben, amik a betegek kardiovaszkuláris változásait utánozták Doxil kezelést követően -, mind a C aktiváció szerepére mutattak (102). Később számos tanulmány támasztotta alá a C aktiváció okozati szerepét, amelyek közül a C blokkolók általi specifikus gátlás, a Zymosan (erős C aktivátor) általi kiváltott tünetek hasonlósága és sertésekben felfedezett korreláció C aktiváció és reaktivitás között a legfontosabb megfigyelések (8, 171).

Ezek a tényezők és az, hogy a reakció a liposzóma infúziójának megkezdése után percekben belül kifejlődik - ami az IgE szerepét kizárja -, indokolják a CARPA kifejezés használatát. Figyelem véve, hogy a nagyobb hemodinamikai-, bronchopulmonális- és bőrváltozások sertésben, valamint a szívritmuszavarok nagyon hasonlítanak az emberben megfigyelt liposzóma-indukálta túlérzékenységi szindróma tüneteinek (6. táblázat), a sertés CARPA modell hiteles állatmodellt jelent a liposzómák és más gyógyszerek túlérzékenységi reakciójának tanulmányozására.

Terminológia tekintetében azt is érdemes megemlíteni, hogy *World Allergy Organization* által ajánlott név erre az infúziós reakcióra (melyet anafilaktoid vagy idioszinkráziás reakcióként is ismertek), a „nem allergiás túlérzékenység” (167). Ez a nomenklatúra azonban megkérdőjelezhető az allergia és a túlérzékenység szinonimaként való használatának megegyezésének fényében. Ami a CARPA kifejezés újdonságát és észszerűségét illeti, a liposzómák C aktiválása már közel félévszázada ismert (104, 172-174), és az is régóta ismert tény, hogy a C aktiváció hozzájárul az allergiás jelenségekhez (175). Ezért a két jelenség összekapcsolása egy kifejezésben segíthet az infúziós reakciók lehetséges okainak tudatosításában.

A CARPA kifejezés homályos a tekintetben, hogy nem foglalja magába a direkt vagy indirekt okozati viszonyt, mégis jól kiemeli a C rendszer szerepét. A taxonómiai újítás a

terápiában is innovációt eredményezhet, például ha egy C inhibitorról kiderül, hogy hasznosabb az ilyen reakciók megelőzésében, mint bármelyik anti-allergiás kezelés.

2.5.5 Komplement aktivációban és a CARPA-ban szerepet játszó mechanizmusok

A nanomedicinák strukturális tényezői közül, a méret, az alak, a görbület és az aggregátumok jelenléte mind kulcsszerepet játszhat. Ezeknek a tényezőknek a hatásai könnyen ésszerűsíthetők a felszínfüggő C aktiváció elterjedésével, a CP és az AP C3-konvertázainak folyamatos lerakódása által. Figyelembe véve ezeknek a kezdeti bimolekulák (C4bC2b és C3bBb, 2–300 kDa, $\geq 8-10$ nm), később trimolekuláris komplexek molekulatömegeit és molekuláris dimenzióit, sorozatos lerakódásuk nem képzelhető el nagy görbületű nanopartikulumok ($d \geq 20-30$ nm) esetében. Így a felületaktív C aktiváció létező paradigmája szerint, a kis nanorészecskék, a dendrimerek (3-5 nm) és a micellák (8-20 nm) amennyiben aggregátumként vannak jelen oldatban képesek aktiválni a komplementet, mivel a C3- és C5-konvertázok számára megfelelő méretű helyet biztosítanak. Hasonló okokból, a liposzómák és egyéb $\geq 80-100$ nm-es részecskék okozta C aktiváció magyarázata is viszonylag egyszerű, a C lerakódáshoz rendelkezésre álló relatíve nagy felszín miatt. Mindazonáltal, a dendrimerek okozta C aktiválás, amelyek a 3-4 nm-es részecskék magas kationos felületi töltésének tulajdoníthatóak (176) éppúgy, mint a PEG-polietilén-imin (PEI) polimerek (177) nem tudnak elegendő felszínt nyújtani a C3- és C5-konvertáz képződéséhez (kivéve, ha aggregálódnak).

A nanopartikulumok és liposzómák által indukált C aktiváció talán legismertebb erősítője, a felületi töltés. Az ezzel kapcsolatos megfigyelések alapján úgy gondolják, hogy a C aktiválódás specifikus a savas csoportok szerkezetére és a negatív töltés vagy Zeta-potenciál önmagában nem feltétlenül jelent C aktivációs potenciált (178, 179).

Doxorubicin vagy hasonló hatóanyagok hatásai esetében - amelyek képesek liposzómákat vagy lipideket kötni és aggregálni -, úgy tűnik fontos figyelembe venni, hogy a kezelés során sok liposzóma kerül be a keringésbe (10^{13} -on liposzóma), ami jelentős PL kettős felszínt jelent ($10-30$ cm²). Így egy kis változás a liposzóma felszínén, nagy változást jelent az összfelszín tekintetében, amelynek jelentős biológiai hatása lehet. A vérbe bejutó Doxil vezikulumok - alacsony ovális görbületű, hosszúkás

(kávébabszerű) vagy szabálytalan liposzómák és aggregátumok lehetnek (142) - felszínének jelentős hatása lehet. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a Doxorubicin közvetett módon hozzájárulhat a liposzómák felszíni görbülete által okozott klasszikus úton (IgM kötésén keresztül) (180) végbemenő C aktivációhoz.

13. táblázat Megfigyelések az *in vitro* liposzóma okozta komplement aktivációval kapcsolatban. (Barenholz, 2012 nyomán módosítva) (98)

1) Tojás foszfatidil-kolin SUV-ot adtak be egy dózisban (>300 mg/kg) 10 emberbe (6 hetes injekció) anélkül, hogy C aktivációt indukált volna (Shmeeda, Barenholz, és Chaiejceck, publikálatlan). 2) PE: foszfatidil-etanolamin, DS: disztearoil-észter. 3) Például a szolubilis 1-es típusú C receptor (sCR1) (102, 181).

<ul style="list-style-type: none"> • Minden liposzóma típus képes aktiválni a komplementet, neutrális SUV-ok a legkevésbé reaktogének.¹
<ul style="list-style-type: none"> • Humán szérum szenzitivitása jelentős egyedi variabilitást mutat a különböző liposzómák okozta C aktivációra.
<ul style="list-style-type: none"> • Egy bizonyos liposzómára szenzitív szérum nem szükségszerűen szenzitív más liposzómára: az egyedi (emberenként változó) szenzitivitás variációja széles és formája specifikus.
<ul style="list-style-type: none"> • C aktiváció a klasszikus és az alternatív úton is kialakulhat
<ul style="list-style-type: none"> • Aktiválást kiválthatják a vezikulákhoz kötődő IgG, IgM, CRP, C1q, C3, és potenciálisan a MBL és a fikolin.
<ul style="list-style-type: none"> • C aktiváció erősödik: <ul style="list-style-type: none"> - Pozitív vagy negatív felületi töltés - Növekvő liposzóma méret (70–300 nm) - Inhomogenitás - Endotoxin szennyeződés - Aggregátumok jelenléte - Doxorubicin vagy hasonló hatóanyagok jelenléte extraliposzómában - Médium, ami liposzómát képes kötni és aggregációt és/vagy felületmódosítást indukál - Magas koleszterin jelenlét a kettős membránban (például 71 mól %) - Liposzómák PEGilációja negatív töltésű foszfolipiden keresztül (DSPE) - PEG-PE, de nem neutrális PEG-DS beillesztése által² - Poliamino fedés
<ul style="list-style-type: none"> • C aktiváció gátolható ismert C inhibitorokkal.³

Liposzóma-indukálta CARPA

Liposzómák okozta C aktiváció 1968-69-es felismerése óta (104, 172-174), számos különböző *in vivo*, *in vitro* tanulmány vizsgálta ezt a jelenséget. Ezeknek a kísérleteknek az eredményei nagyon váltakozók voltak, a vizsgált vezikulumok, az állatmodellek, a szérum forrás és a kísérleti körülmények jelentős különbségei következtében (8, 99,

136, 137, 146). Mindazonáltal a jelenség számos közös és alapvető jellemzőit tártak már fel, mind *in vitro* (99, 105, 132, 136, 137, 146, 160, 161, 172, 174, 181-191) és mind *in vivo* (100-102, 140, 142) (13. táblázat és 14. táblázat).

14. táblázat Megfigyelések a liposzóma okozta CARPA-val kapcsolatban. (Barenholz, 2012 nyomán módosítva) (98)

<ul style="list-style-type: none"> • Minden liposzóma képes CARPA-t okozni állatban és emberben, a neutrális SUV a legkevésbé (4. táblázat).
<ul style="list-style-type: none"> • Különböző állatok szenzitivitása különböző liposzómákra egyedi variabilitást mutat.
<ul style="list-style-type: none"> • Különböző fajok liposzóma okozta CARPA szenzitivitása drasztikusan csökken: sertés > kutya > ember (hiperszenzitiv) > nyúl > birka > patkány > egér.
<ul style="list-style-type: none"> • A minimálisan hatékony liposzóma dózis 10–100-szor magasabb patkányban, mint sertésben vagy kutyában.
<ul style="list-style-type: none"> • A kardiopulmonális változások egyedi variációjával összekapcsolódó liposzóma indukált CARPA sertésben kisebb, mint a kutyáknál.
<ul style="list-style-type: none"> • Sertésben a pulmonális hipertenzió, míg kutyában a szisztémás hipotenzió a CARPA domináns kardiopulmonális tünete.
<ul style="list-style-type: none"> • Sertésben és kutyában a kardiopulmonális változások csökkennek vagy teljesen eltűnnek a második vagy a harmadik dózis során; tachyphylaxis (tolerancia kialakulása).
<ul style="list-style-type: none"> • A tachyphylaxis lehetővé teszi, hogy deszenzitiváló protokollt fejlesszenek ki, üres (placebo) liposzómák segítségével.
<ul style="list-style-type: none"> • Sertésben és kutyában a leukopéniát követő leukocitózis és trombocitopénia változó hematológiai rendellenességek CARPA-ban.
<ul style="list-style-type: none"> • A plazma tromboxán (TX) A₂ növekedése (mérése TXB₂-vel) szorosan követi a hemodinamias változásokat sertésben, mutatva, hogy TXA₂ egy limitáló mediátor. TXB₂ más fajokban szintén növekszik CARPA során.
<ul style="list-style-type: none"> • CARPA gátolható sertésben C inhibitorokkal (például: sCR1, anti-malac C5 ellenanyag és indometacin).
<ul style="list-style-type: none"> • A minimálisan hatékony reaktogén dózis alapján, a sertés és a kutya CARPA modell alkalmas lehet a humán hiperszenzitiv egyedekben kialakuló CARPA vizsgálatára.

Jelenleg több tucat liposzómális gyógyszer van a piacon és több klinikai vizsgálatokban. A 15. táblázat mutatja azokat a piacon lévő liposzómákat, amikről már köztudott, hogy CARPA-t okoznak. A különböző gyógyszerek okozta reakciók gyakorisága 3-45% között változik (136).

15. táblázat Infúziós reakciót okozó liposzómális gyógyszerek. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

Márka név (gyártó)	Aktív hatóanyag	Javallat	Típus
Doxil, Caelyx (Johnson & Johnson)	Doxorubicin	Petefészekrák, Kaposi-szarkóma, Myeloma multiplex	Liposzóma (80-100 nm)
Myocet (Elan)			
Abelcet (Elan)	Amphotericin B	Gombás fertőzés	Szolid mikrorészecske (1,6-11 µm)
AmBisome (Gilead, Fujisawa)			Liposzóma (45 nm)
Amphotec, Amphocyl (Elan)			Lemez alakú szolid nanorészecske (115 nm)
DaunoXome (Gilead)	Daunorubicin	Kaposi-szarkóma	Liposzóma (45 nm)
Visudyne (Novartis)	Verteporfin	Időskori makula-degeneráció	Multilamelláris liposzóma

Monoklonális ellenanyag terápia okozta CARPA

A legtöbb, mintegy 20 monoklonális ellenanyag (mAb) alapú készítmény esetében mind a mai napig fennáll az infúziós reakció kockázata. A 16. táblázat mutatja az ilyen gyógyszerek okozta tünetek specifikus információit, amik lényegében hasonlóak, mint a liposzómáknál felsoroltak (6. táblázat). Lényeges különbség van a mAb-indukált és a nanorészecskék által kiváltott CARPA között, mivel a legtöbb mAb reakció kicsivel később (kb. 30 perc elteltével), míg a liposzómás és micelláris gyógyszerek esetében azonnal jelentkezik a reakció. A különbség a nanorészecskék és a mAb-k C aktivációjának különböző kinetikájában keresendő. Míg a nanorészecskék szinte azonnal megkötik a komplementet a felületükön, addig a mAb-nak sztérikus változásokon kell keresztülmenniük, hogy C aktivátorokká váljanak.

16. táblázat Infúziós reakciót okozó piacon lévő terápiás ellenanyagok. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

mAb: monoklonális ellenanyag; r.h.: rekombináns humanizált; RA: rheumatoid arthritis

Márka név (gyártó)	mAb, típus (cél antigén)	Javallat
Rák ellen		
Avastin (Genetech/Roche)	Bevacizumab, r.h. IgG1 (VEGF-A)	Áttétes vastagbél-, tüdő-, veserák és glioblasztóma kombinált kemoterápiája
Campath (Genzyme)	Alemtuzumab)–IH, r.h. IgG1κ (CD52)	B-sejtes krónikus limfoid leukémia (B-CLL)
Erbix (Bristol-Myers Squibb, Eli Lilly)	Cetuximab, kiméra IgG1κ (human EGFR)	Áttétes végbél-, fej- és nyakrák, laphámrák
Herceptin (Genentech)	Trastuzumab, humanizált IgG1κ (humán EGFR receptor 2, HER2/neu / erbB2)	Áttétes mell és gyomorrák
Mylotarg (Pfzer Inc./Wyeth Pharmaceuticals)	Gemtuzumab ozogamicin, r.h. IgG4κ (CD33)	CD33 pozitív akut myeloid leukémia első visszaesésekor
Vectibix (Amgen)	Panitumumab, r.h. IgG2κ (humán EGFR)	KRAS+ áttétes végbélrák
Rituxan (Genentech)	Rituximab, kiméra IgG1κ (CD20)	B sejt leukémia, RA és non-Hodgkin B-sejtes limfóma
Gyulladás ellen		
Remicade (Janssen Biotech. Inc.)	Infliximab, kiméra IgG1κ (TNFα)	Crohn betegség, RA, Bechterew-kór, arthritis psoriatica, fekélyes vastagbélgyulladás
Xolair (Genetech)	Omalizumab, r.h. IgG4 (IgE)	Atopia, asztma

2.5.6 Komplement aktiváció szerepe a CARPA-ban

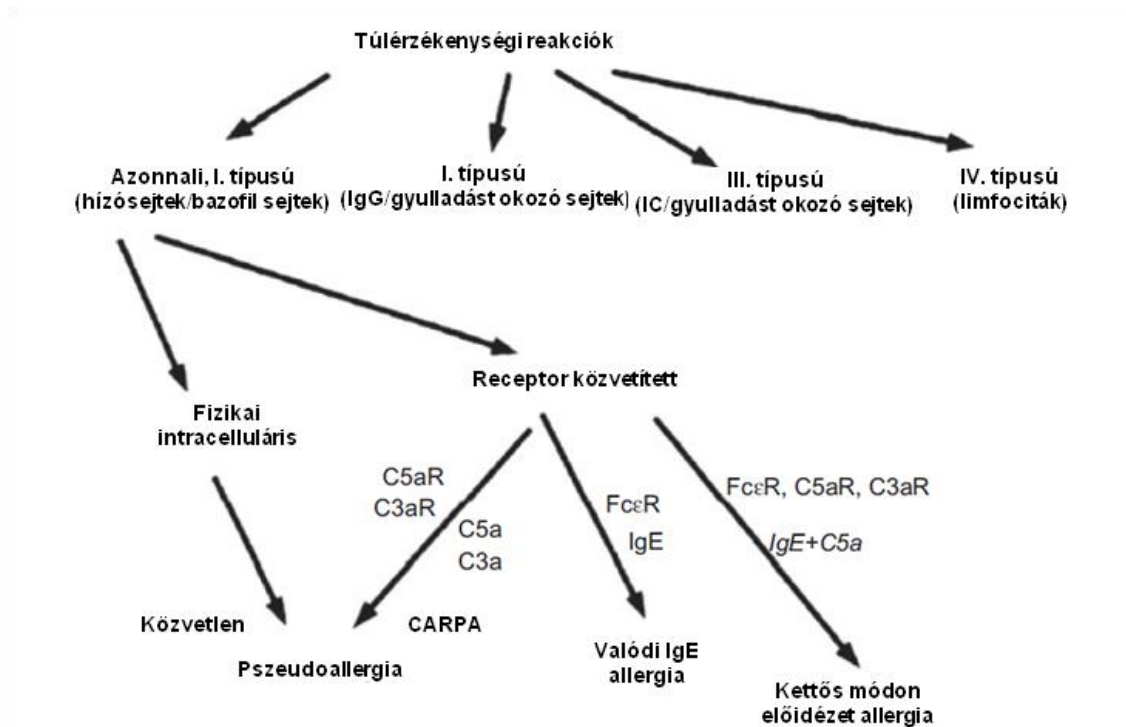
A C aktiváció CARPA-ban betöltött pontos szerepét Chanan-Khan és mts-i (192) finomították tovább, ahol a C aktivációt mérték Doxillal kezelt rákos betegekben. Klinikai tüneteket (klinikai reakciókat) mutatott betegek száma kisebb volt, mint azon betegek száma, ahol a C rendszer egy fontos markere, a szolubilis C5b-9 (sC5b-9) szignifikánsan emelkedett. Ez arra utal, hogy a C aktiváció hozzájárul a reakcióhoz, de nem limitáló HSR-re nézve, mivel számos más kofaktor és kontroll lépés van a CARPA komplex patomechanizmusa mögött. További eltérő tények a CARPA koncepciót illetően, hogy bizonyos liposzómák és más nanorészecskék, amelyek humán szérumban nem aktiválják a komplementet, sőt még képesek hemodinamikai változást

okozni, amelyek a CARPA enyhe tünetei. Dózisfüggést és tiszta korrelációt találtak *in vitro* C aktiváció és a sertés reaktogenitása között, de csak az olyan liposzómák esetében, amelyek erős C aktivátorok (100, 101, 142). A gyenge C aktivátor anyagok, mint például a PEGilált polietilén-imin, a sertés CARPA ellentmondó aktivátorai (177). Ezek a tények, valamint a PEGilált liposzómák (Doxil) okozta tachyphylaxis (tünetek csökkenése vagy eltűnése ugyanazzal a gyógyszerrel történő ismételt kezelések hatására) jelenségével együtt (143), mind azt sugallják, hogy a CARPA valójában bonyolultabb lehet, mint egy egyszerű anafilatoxin-hatás és más folyamatok is lejátszódhatnak. A reaktogén részecskék kötődnek hízósejteken és/vagy a makrofágokon lévő receptorokhoz, amelyek azonos vagy hasonló intracelluláris jelátvitelen keresztül a sejtek „release” folyamataihoz vezethet (143, 193).

2.5.7 CARPA klinikai és tudományos jelentősége

A CARPA klinikai jelentőségével kapcsolatban ismert, hogy az ADR a kórházban lévő emberek 10-20%-át érintik, míg a HSR körülbelül ADR 25-30%-ban jelenik meg (149, 194). A nem IgE mediált HSR aránya az összes ADR-en belül 10-15%. A súlyos és halálos reakció előfordulása hozzávetőlegesen 2, illetve 0,1% lehet (194), ami évente mintegy 2 millió komoly és 100000 halálos reakciót jelent. USA-ban a gyógyszerek okozta káros reakciók a 4-6. vezető ok halálozások tekintetében (194). Mindazonáltal ezek a statisztikai adatok igen változatosak a különböző szerzők körében (149). Egy másik elemzés szerint a káros gyógyszerreakciók 25%-a allergiás természetű (195) és ennek 77%-a nem IgE közvetített, tehát pszeudoallergiás eredetű (166), ami évente mintegy 400000 súlyos és 20000 halálos pszeudoallergiás reakciót jelent az Egyesült Államokban.

Elteltekintve a HSR patomechanizmusának jobb megismerésétől, a CARPA koncepció a HSR egy újszerű funkcionális kategorizációját kínálja, amely elkülöníti az akut reakciókat (I. típusú) a hízósejtek és a bazofil sejtek felszabadulási reakciók alapjául szolgáló mechanizmusai szerint. Két alosztály különböztet meg, a közvetlen sejt aktivációt és a receptor közvetített aktivációt. Ez utóbbi 3 alkategóriát tartalmaz, az IgE kiváltotta (Fc receptor mediált), az anafilatoxinok kiváltotta (C3a/C5a receptor mediált) CARPA és a kevert típusú reakciókat (9. ábra).



9. ábra HSR javasolt új rendszere. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

2.5.8 CARPA előrejelzése és megelőzése

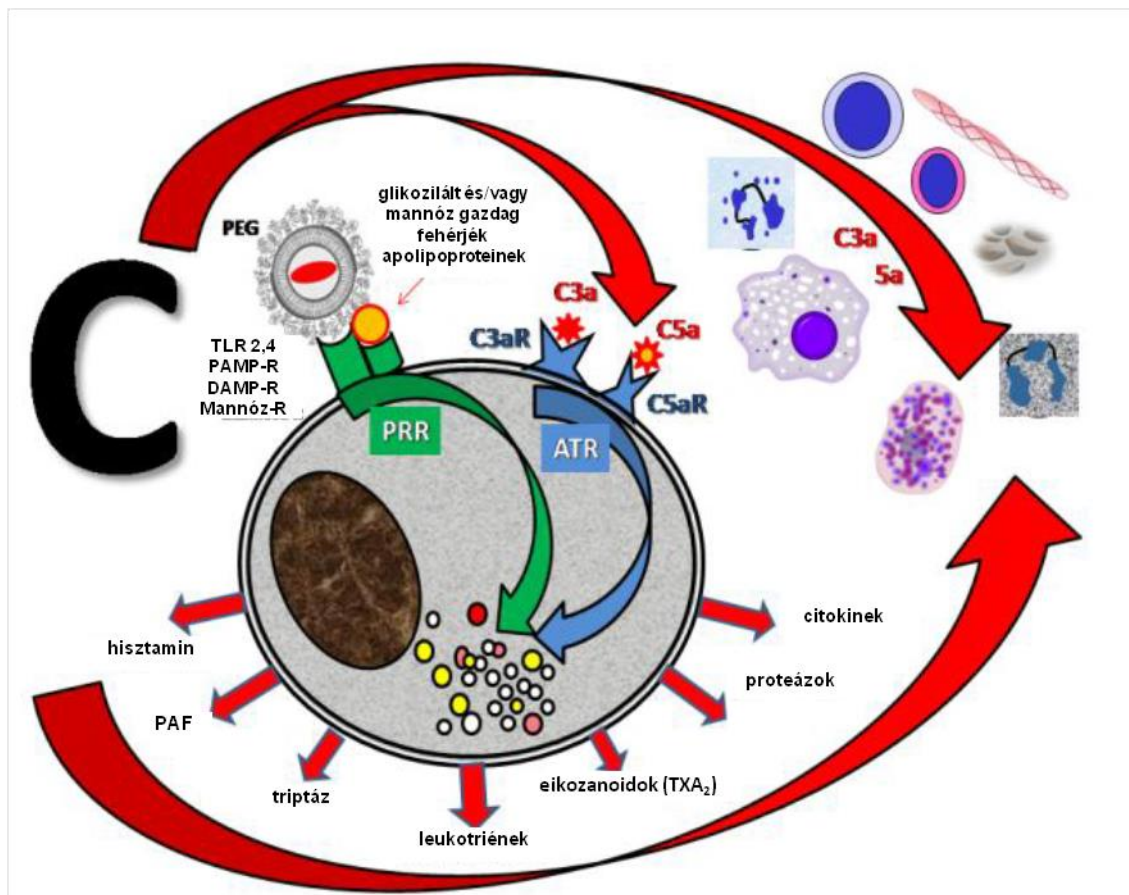
A CARPA egy kiszámíthatatlan káros immunhatás, mivel emelkedése, tartóssága és pontos tünetei nem jelezhetőek előre standard allergia tesztekkel (196) vagy bármilyen más orvosi gyakorlatban rendelkezésre álló teszttel. Nehézzé vagy lehetetlenné teszi időben a reakció specifikus megelőzését egyénileg, akár kivédve az okát, akár azon betegek felismerését, akik általában hajlamosak az allergiás reakciókra. Jelenleg megelőzésre alkalmazott megközelítések közé tartoznak a szteroidok, az antihisztaminok és a nem szteroid gyulladáscsökkentők használata, valamint a lassú és/vagy megszakított és/vagy fokozódó infúzió alkalmazásával történő nem specifikus előkezelés (147, 150, 152, 197).

2.5.9 CARPA mechanizmusa: „double hit” hipotézise

A HSR tünetei közt (6. táblázat) nincs egyetlen vagy egyedi tünet, amely specifikus lenne valamilyen nanogyógyszerre. Különböző anyagok az események egy komplex láncolatának előidézését okozhatják. Az eredetileg gondolt, miszerint a hízó- és bazofil sejt anafilatoxin aktivációja magyarázhat minden fiziológiai változást, valószínűleg

túl egyszerű (8, 99, 139). Az anafilatoxin hatás csak egy útvonal a CARPA mechanizmusában, ahol a reaktogén részecskék és gyógyszerek kötődnek a hízó és/vagy makrofág felszíni receptoraihoz, amelynek intracelluláris jelátvitelét elindíthatják vagy összhangban aktiválhatják G-fehérjével összekapcsolt anafilatoxin receptorokat (C3a/C5a/C5L2 receptorok). A két folyamat együttes aktiválódása a „release”-reakciók kiváltásához vezethet (10. ábra). A másodlagos vasoaktív mediátorok későbbi felszabadulása, többek közt a hisztamin, triptáz, vérlemezke aktiváló faktor (PAF - Platelet Activating Factor), leukotriének (LTB₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄), TXA₂, Prostaglandin D₂ és TXD₄) a simaizom, a tüdő, a szív, a bél és számos más szerv endotélsejtjeire hatnak, amik a CARPA tüneteit okozzák. Közülük némelyik (például PAF, hisztamin, triptáz és TXA₂) aktiválás után alakulnak át és azonnal felszabadulnak a sejtekből, míg mások *de novo* szintetizálódnak és lassabban szabadulnak fel.

A hízósejt és/vagy a makrofág felszín receptorokat, mintafelismerő receptorként ismerték (pattern recognition receptors - PRRs) (98, 143, 193), mivel a részecske-kötött polimerek - beleértve a PEG-et is – bizonyos körülmények között patogénekhez kapcsolható molekuláris mintázatként viselkednek (98, 132, 162). Liposzómák felszínén lévő PEG-ek kritikus tényezők lehetnek a reakció indukálásában és a tachyphylaxisban (177). A PEG-mentes AmBisome - amelynek mérete hasonló a Doxilhoz és amely Doxilhoz hasonló első reakciókat okoz sertésben -, nem veszíti el a reaktogenitását ismételt beadás után sem (hatása nem tachyphylactikus).



10. ábra „Double hit” hipotézis. Nanorészecskék kiváltotta komplement aktiváció, ami anafilatoxinok felszabadulásához vezet. Anafilatoxinok kötődnek a hízósejteken (vagy sertésekben pulmonális intravaszkuláris makrofágon - PIM) lévő receptoraikhoz (anafilatoxin receptor - ATR), amely vazóaktív másodlagos mediátorok felszabadulásához vezet. A részecskék mintázat felismerő receptorok (PRR) - toll-like receptors (TLR 2 és 4), PAMP-receptor, veszély kapcsolt molekuláris mintázat receptor (danger-associated molecular pattern receptors - DAMP-R) vagy mannose receptors (mannose-R) - révén is kötődnek. A mintázat felismerő receptorokhoz való kötődés mellett az apolipoproteinek és a glikozilált és/vagy mannóz gazdag fehérjék közvetíthetik a részecskék hízósejtekhez való kötődését. (Jiskoot, 2014 nyomán módosítva) (1)

Figyelemre méltó a CARPA tünetek óriási változatosságát illetően, hogy a fenti többlépcsős, hízósejt aktiváció komplex patomechanizmusán felül, különböző egyéneknek és szöveteknek különböző allergomedin mintázatuk van, és ezek a receptorok különböző funkciókat közvetítenek a különböző szövetekben. Például a bőr és szív hízósejtei különböző allergomedin ingerekre válaszolnak (198). Továbbá, H1 receptorok aktivációja érösszehúzódáshoz és érszivárgáshoz vezethet, illetve felelősek az anafilaxia kardiovaszkuláris és bőrtüneteierért. H2 receptorok növelik a sejt cAMP szintet, értágulást, fokozott szívverést és pulzusnyomást okoznak (199). A fokozott érpermeabilitás a súlyos CARPA (IV. fokozatú) jele, ami 10 percen belül maga után

vonhatja az intravaszkuláris folyadék több mint 50%-nak kiáramlását az extravaszkuláris térbe (131). Egy másik lehetséges tényező a HSR tünetek egyedi változataira, hogy a reaktív sejtek relatív mennyisége eltérő a bőrben, tüdőben, szívben és a bélben (99, 131, 199, 200).

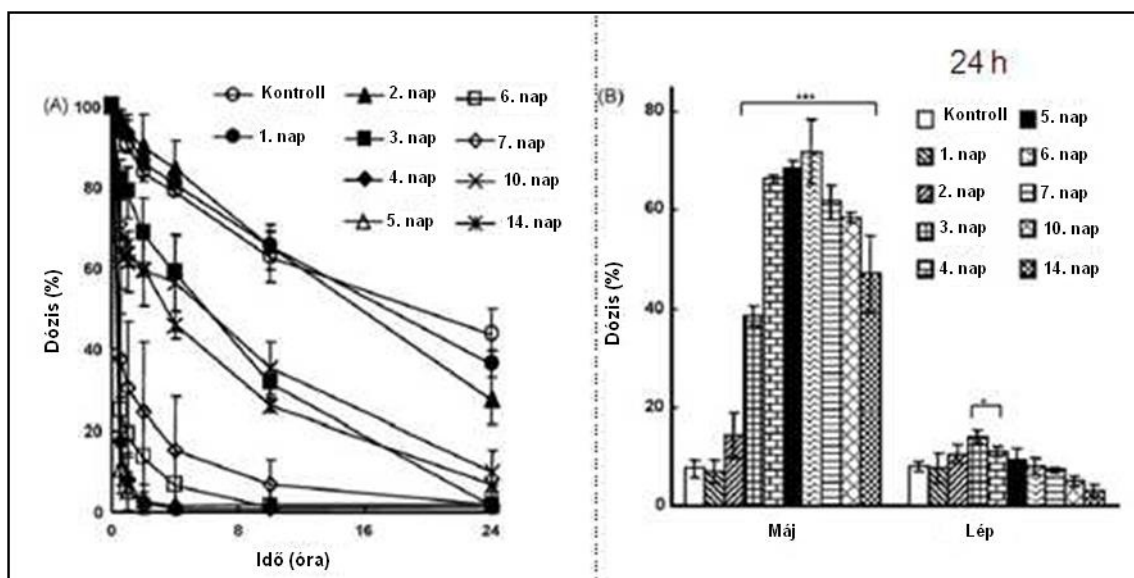
2.5.10 CARPA sertés modellje

A humán CARPA legérzékenyebb modellje a sertés (2-3 hónaposak, 18-22 kg), mivel ezek az állatok relatíve kis individuális változással utánozzák a humán HSR tüneteit. A sertések liposzómákra és egyéb részecskékre kiváltott egyedi reaktivitása leginkább a tüdejükben található Pulmonális intravaszkuláris makrofágoknak (PIM) köszönhető (201). Az alveoláris, intersticiális, pleurális és szabad vaszkuláris makrofágok mellett a PIM sejtek a tüdő makrofágrendszerének részei, amelyek a tüdőkapillárisokban találhatóak meg. A májban lévő Kupffer-sejtekhez hasonlóan fő feladatuk a vérben lévő részecskék (celluláris törmelék, a baktériumok, a vírusok és az endotoxinok stb.) gyors és közvetlen eltávolítása. Glikokalixsal fedett állábaikkal és tüskéikkel ezek a sejtek magas fagocita hatékonyságot és azonnali valamint jelentős szekréción reakciót mutatnak, amelyek gyors választ adnak az i.v. beadott liposzómákra és egyéb részecskékre.

2.6 Nanomedicinák gyorsított eltávolítása (ABC jelenség)

A részleges immunogenitás egyik példája a PEGilált liposzómák esetében megfigyelhető ABC jelenség. Ishida és mts-i fedezték fel (65-68, 70-73, 202), hogy PEGilált liposzóma ismételt beadása egérben és patkányban, a liposzómák gyors kiürülését eredményezi a véráramból, miközben anti-PEG IgM képződik a lépben (11. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a jelenség hiányzik a Doxorubicint tartalmazó PEGilált liposzómák esetében, ami összhangban van az ABC hiányával Doxillal kezelt daganatos betegekben. A Doxil-ekvivalens szabad Doxorubicin adagolása, visszaállítja az ABC-t. Ezek az adatok azt mutatják, hogy az ABC jelenségért felelős immunsejtek szelektíven befolyásolhatók a Doxorubicint tartalmazó PEGilált liposzómák révén (immunszuppresszió). A kutatócsoport arra következtetésre jutott, hogy az ellenanyag

termelés egy T-sejt független B-sejt válasz, és a PEGilált liposzómákat a B-sejtek ismerik fel, mint egy tímusz-független 2-es típusú antigén (TI-2) (73).



11. ábra PEGilált liposzómák vérkiürülésének aránya patkányokban (A) és szöveti felhalmozódás 24 órával a beadás után. A reprodukált (B) ábra (66) a liposzómák kiürülésének felgyorsulását mutatja ismételt beadás után (2-14. napon), liposzóma lerakódás párhuzamos növekedése májban és a lépben. (Barenholz, 2012 nyomán módosítva) (98)

2.7 Liposzóma okozta immunszuppresszió

Mivel a liposzómákat elsősorban májban, lépben, csontvelőben és másutt előforduló retikuloendotéliális rendszer sejtjei veszik fel, a makrofág telítettség és az ezzel járó másodlagos immunszuppresszió lehetőségei - ami lehetséges kockázat fertőzésre - mindig is problémát jelentett (52). Jelentős bizonyíték van arra, hogy a klinikailag alkalmazott nem citotoxikus liposzómák dózisa általában nem okoz immunszuppressziót - legalábbis nem jelentőset -, klinikailag fontos makrofág funkciók blokkolását. Azonban a helyzet eltér az olyan rákellenes citotoxikummal töltött liposzómák esetében, amelyek az immunszuppresszió különböző szintjeit okozhatják.

Az egerekben beadott Doxil megakadályozza a baktérium kiürülését a vérből, amit a makrofág szuppresszióval magyaráztak (111). Doxil dózisfüggő farmakokinetikája függvényében vizsgált részleges retikuloendotéliális rendszer blokkolása során, a liposzómális Doxorubicin magasabb dózisokban egy lassú kiürülést és a tumor felvétel aránytalan növekedését mutatta (2,5-20 mg/kg tartományban) (110). A kiürülés lassú

hatása nem volt megfigyelhető hasonló dózisú szabad Doxorubicin jelenlétében vagy Doxorubicin mentes liposzóma és szabad Doxorubicin együttes beadása után (114).

Habár a Doxil-kezelt betegekben nem találtak semmilyen zavaró hatást a veleszületett antibakteriális védekezésében, a részleges makrofág szuppresszió klinikai jelei mégis jelentkezhettek esetükben. A Doxil okozta részleges immunszuppresszió jelentőségeit figyelembe kell venni, valamint a karboplatinval együtt beadott Doxil HSR gátló hatását is (109). Ennek egyik bizonyítéka, hogy az ismételt beadás után a Doxil keringési felezési ideje növekszik, ami két lehetséges klinikai előnyt jelent. Egyrészt, a Doxil tumor felvevő képessége ismételt dózissal növelhető (110), ezáltal azonos dózis alkalmazása mellett a terápia hatékonysága növelhető vagy lehetőség van dózis csökkentésére anélkül, hogy a hatékonyság csökkenne. A másik, hogy a Doxil terápiás előnyt jelenthet paclitaxelen vagy gemcitabinen felül a karboplatin kombinált kemoterápiák során, mivel a karboplatin dózislimitáló a platina érzékeny visszatérő rák kezelése során (109).

2.8 Hemokompatibilitási vizsgálat, elérhető tesztek és hiányosságok

A hemokompatibilitási tesztek olyan biokompatibilitási vizsgálatok, ami az idegen anyagok és a vörsejtek vagy fehérvérsejtek közötti lehetséges káros hatások feltárásával foglalkozik. Mivel ezek a káros hatások gyakoriak és komoly egészségügyi kockázatot jelenthetnek, a vérben lévő anyagok klinikai használata erősen szabályozott. Az FDA, az *European Medicines Agency* (EMA) és más regulációs hatóságok hivatalos útmutatásai állnak rendelkezésre, valamint ajánlásokat tesznek a gyártók számára elvégzendő vizsgálatokra annak érdekében, hogy a vérben lévő idegen anyagok okozta ártalmas hatások megelőzhetőek legyenek.

A vérbe bekerülő idegen anyagok az orvosi készülékek, gyógyszerek és a diagnosztikus szerek is lehetnek. Az orvosi készülékek hemokompatibilitási vizsgálataival kapcsolatban, az ISO 10993-4 (melyet az *International Organization for Standardization*, az *American National Standards Institute* és az *Association for the Advancement of Medical Instrumentation* 2002-ben kiadott és 2009-ben átdolgozott) egy olyan lista (203), ami az ezekkel kapcsolatos ajánlott vizsgálatokból áll. Ez a lista C aktivációs tesztek is tartalmaz, mivel ezek az eszközök gyakran nagy felületet nyújtanak a C lerakódáshoz, és így a C aktiválódáshoz. A C tesztek célja, hogy jobban

felismerhető legyen az AP (204) és az egész C aktivációs kaszkád (205). Az i.v. gyógyszerek és a diagnosztikai szerek hemokompatibilitását illetően, ugyanazok a C tesztek alkalmazhatóak, mint az orvostechikai eszközök esetében, de diszpergált, vízdékony vagy oldhatatlan molekulák helyénvaló alkalmazásával.

A túlérzékenységre vagy infúziós reakciókra vonatkozó C tesztek még nem szerepelnek a regulációs hatóságok által ajánlott tesztek listájában, habár lehetőség lenne mérni vagy megjósolni ezeket az i.v. alkalmazott nanomedicinák és biológikumok reakcióját. Ennek oka leginkább az, hogy a legmodernebb farmakológia, a nem standard toxikológia és a molekuláris immunológia erre vonatkozó ismeretei és tapasztalatai viszonylag korlátozottak. Mindazonáltal a jelenségre egyre nagyobb figyelem irányul, mivel a FDA (*Immunotoxicity Evaluation of Biologicals*) is arra utal, hogy a C közvetített túlérzékenységi reakció megelőzésére alkalmas teszt szükséges lehet (206). Legutóbb az EMA is tett egy specifikus megjegyzést generikus liposzóma termékek engedélyezésére vonatkozó szabályozási követelmények során a túlérzékenységi reakciók kapcsolatában (207).

2.9 CARPA előrejelző tesztjei

Normál humán szérumban történő komplement aktivációs ELISA mérések

Cél: Teszt anyagok C aktiváló képességének mérése normál humán szérumban (NHS) (CARPA kockázatának mérése).

Használat: Preklinikai biztonságossági vizsgálatok, az i.v. gyógyszerek és hatóanyagok C mediált immunreaktogenitásának, valamint a C mediált egyedi túlérzékenység megállapítása.

Alapelv: Teszt anyag megfelelő koncentrációját frissen preparált vagy korábban lefagyasztott és tárolt (-80°C-on) hígítatlan NHS-ban inkubáljuk 37°C-on legfeljebb 60 percig és ELISA-val mérjük a C különböző hasított termékeit.

Előnyök: Rendkívül érzékenyek és specifikus tesztek, nem csak kvantifikálják a C aktivációt, hanem megmutathatják az aktivációs útvonalat is.

Korlátok: Jelentős egyéni különbségek lehetnek egy aktivátor C válaszában, így szükséges több szérumban tesztelni az anyagot annak érdekében, hogy értékelhető legyen a reakció gyakorisága és az aktiváció mértéke a reaktív szérumokban.

Teljes vérben történő komplement aktivációs ELISA mérések

Cél: Teszt anyagok C aktiváló képességének mérése friss vérben (CARPA kockázatának mérése).

Használata: Preklinikai biztonságossági vizsgálatok, az i.v. gyógyszerek és hatóanyagok C mediált immunreaktogenitásának, valamint a C mediált egyedi túlérzékenység megállapítása.

Alapelv: Hasonló, mint a szérum/plazma esetében, itt azonban jelen vannak a vörsejtek is. Ezek módosíthatják a C reakció útját a sejtek különböző hatásai révén, beleértve az anafilatoxin receptorokat és a fehérvörsejtek, vérlemezkék és vörösvörsejteken lévő C gátló felszíni molekulákat (8. ábra).

Előnyök: Vörsejtek jelenléte miatt ez a humán vér egy közelebbi modellje.

Korlátok: Figyelembe kell venni az antikoagulánsok használatát, mivel ezek jelentős hatással lehetnek a C aktivációra. Az egyetlen antikoaguláns amelyről ismert, hogy nincs hatással a C aktivációra, az a Lepirudin (Hirudin) (208).

Komplement aktiváció hemolitikus tesztje állati vérben vagy szérumban

Cél: Teszt anyagok C aktiváló képességének mérése különböző állati vérben vagy szérumban (CARPA kockázatának mérése).

Használata: Preklinikai biztonságossági vizsgálatok, az i.v. gyógyszerek és hatóanyagok C mediált immunreaktogenitásának, valamint a C mediált egyedi túlérzékenység megállapítása.

Előnyök: Faj független és olcsó teszt.

Korlátok: Viszonylag alacsony az érzékenysége.

sC5b-9 szintjének vizsgálata humán szérumban vagy plazmában Fluoreszcencia-aktivált sejtválogatás (FACS) alapú eljárással

Cél: Többszörös C hasított termékek egyszerre történő mérése, részecskealapú gyors vizsgálattal.

Használata: Preklinikai biztonságossági vizsgálatok, az i.v. gyógyszerek és hatóanyagok C mediált immunreaktogenitásának, valamint a C mediált egyedi túlérzékenység megállapítása. Diagnosztikus teszt a különböző betegségekben megállapított C aktivációra.

Előnyök: Számos C hasított termék egyidejű mérése. Rövidebb, mint egy hagyományos ELISA. Legmodernebb (miniatürizált vagy asztali) FACS gépek használatával a betegágy mellett is használható gyors teszt.

Korlátok: A FACS jelenleg kevésbé elérhető technológia, mint az ELISA.

Bazofil leukocita aktiváció vizsgálata FACS-sal teljes vérben

Cél: I.v. gyógyszerek és hatóanyagok bazofil leukocita-aktiváló képességének meghatározása teljes vérben. Alternatív módszer a CARPA kockázatának megállapítására.

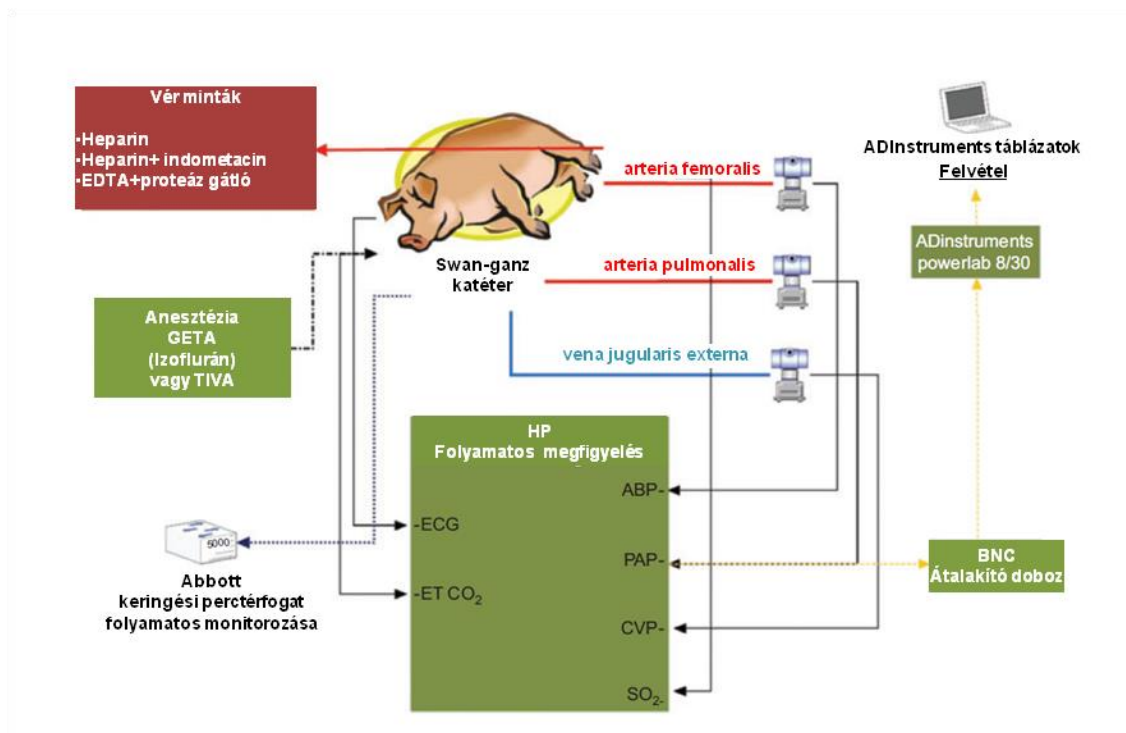
Használata: Preklinikai biztonságossági vizsgálat Beckman-Coulter's Allergenicity Kit használatával, i.v. gyógyszerek és hatóanyagokra adott bazofil leukocita válasz megállapítása, ami immunreaktogenitási indexként valamint egyedi túlérzékenységgént használnak.

Sertés CARPA vizsgálat

Cél: Kiválasztott nanorészecske akut reaktogenitásának előrejelzése túlérzékeny embereknél.

Használata: Preklinikai biztonsági szűrővizsgálat (12. ábra)

Előnyök: A sertés CARPA kardiopulmonális tünetei utánozzák az emberben előforduló legsúlyosabb IV. vagy V. fokú allergiás reakciókat (7. táblázat). Így a modell alkalmas az túlérzékeny ember súlyos HSR mechanizmusának és körülményeinek tanulmányozására. A modell egyedülálló módon képes kiszűrni és előre jelezni az immunreaktív nanorészecskéket, amelyek súlyos reakciókat okozhatnak túlérzékeny embereknél. Hemodinamikai reakciók egyedi váltakozása sertésekben viszonylag kicsi.



12. ábra Sertés CARPA teszt sémája. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

Egyéb CARPA állatmodellek

Liposzómák és egyéb nanorészecskék i.v. beadása számos más fajban is képes CARPA-t okozni (17. táblázat), bár érzékenyséjük és tüneteik különböznek sertésekben látottakhoz képest (140).

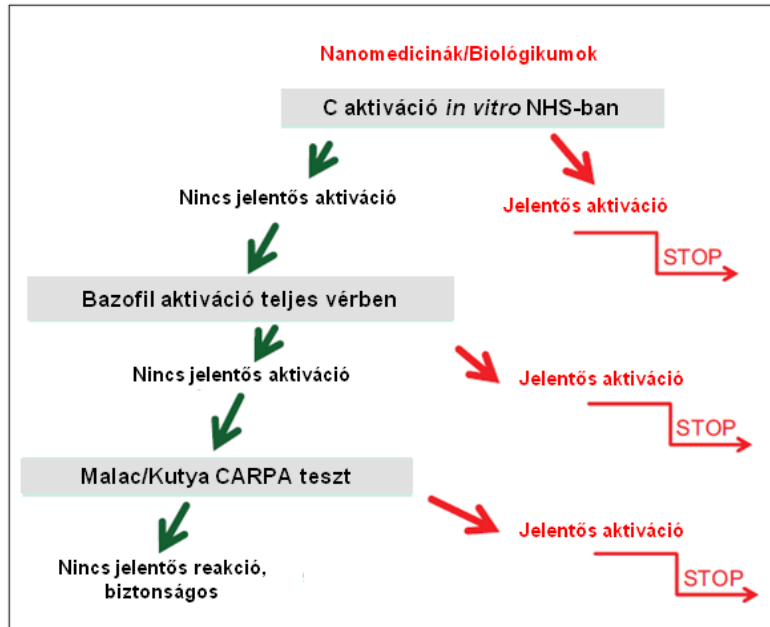
17. táblázat Liposzóma indukálta CARPA különböző fajokban: dózisfüggés és tünetek. Fel és lefelé mutató nyilak mutatják a specifikus paraméterek változását, míg a nyilak mérete a válasz erejével arányos (140, 209-211). (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

PAP: pulmonális artériás nyomás, SAP: szisztémás artériás nyomás, FVS: fehérvérsejt szám, TXB2: Tromboxán B₂

Fajok	Kiváltó dózis (mg PL/kg)	Megnyilvánulás						
		PAP	SAP	Bőr	FVS	Vérlemez	TXB2	Hisztamin
Ember*	0.01-0.2	↑	↑↓	+	↓↑	↓	?	↑
Malac	0.01-0.3	↑	↑↓	+	↓↑	↓	↑	?
Kutya	0.05-0.1	↑	↓	-	↓↑	↓	↑	↑
Kecske	0.1-0.2	?	↓	-	?	?	?	?
Nyúl	?	↑	↓	-	↓	↓	?	?
Patkány	5-25	?	↓	-	↓↑	↓	↑	?
Egér	?	?	?	-	↓↑	↓	?	?

Döntési fa a CARPA tesztek használatáról

A 13. ábraán bemutatott folyamatára a tesztek lehetséges sorrendjének vázlatát mutatja be annak érdekében, hogy megállapítható legyen egy gyógyszerjelölt nanomedicinának vagy biológikumnak van-e minimális kockázata CARPA-ra emberben.



13. ábra Preklinikai biztonsági vizsgálatok során alkalmazott CARPA tesztek lehetséges sorrendjének sémája. (Szebeni, 2012 nyomán módosítva) (97)

3. Célkitűzések

A nanotechnológia korunk egyik ipari forradalma, amely a 10^{-9} - 10^{-6} m tartományban igyekszik az anyag megismerésére, formálására és előállítására. A részecskeméret ezen tartományában az anyagok különleges fizikai tulajdonságokat vesznek fel és más törvények érvényesek rájuk, mint a magasabb dimenziókban. A „nanotechnológia” kifejezést először Taniguchi használta 1974-ben. Az azóta eltelt idő óta robbanásszerű fejlődés tapasztalható, mind az ezzel foglalkozók számában (több száz kutatóintézet és cég), mind az ezzel kapcsolatos cikkek és szabadalmak tekintetében (>100 ezer), valamint a nanotechnológiai termékek kereskedelmi forgalmát illetően (több százmillió euró 2015-ben). Egyre inkább teret nyernek az ezzel kapcsolatos konferenciák, és míg a tudományos életben több mint 77 ezer hivatkozás található a „*nano*” kifejezésre, addig az interneten a „*nanotechnology*”-ra 117 millió a fellelhető találatok száma. Ezt felismerve már az Európai Unió is egy nanotechnológiai kutatásokra vonatkozó új etikai kódexet javasolt, amely nagyobb felelősséget ruház ezen termékek kutatóira és fejlesztőire a biztonság garantálása érdekében.

Egyik leggyorsabban fejlődő területe a nanomedicina, amely a nanotechnológiát alkalmazza az elméleti és gyakorlati orvostudományban a diagnózis, a terápia, a betegségmegelőzés és kontroll érdekében. A nanotechnológia alkalmazása nagymértékben képes javítani a gyógyszerek olyan tulajdonságait, mint az oldhatóság vagy a farmakokinetika, elősegíti a hatékonyabb célzást és a mellékhatások csökkentését, valamint olyan új alkalmazások bevezetésére ad lehetőséget, mint a multifunkcionális gyógyszerek és a theragnosztikumok.

A nanomedicina fejlődése azonban különféle kihívásokkal szembesül. Az egyik legfontosabb klinikai probléma a nanorészecskén alapuló gyógyszerek (nanomedicinák), valamint sok más biológiai, illetve nem biológiai komplex gyógyszerek intravénás alkalmazásakor gyakran fellépő túlérzékenységi reakció (HSR), amelyeket "infúziós" vagy "anafilaktoid" reakcióknak is neveznek. Ez a jelenség számos modern nanomedicina – többek közt liposzómák, micelláris gyógyszer és terápiás ellenanyagok - terápiás használatának egyik fő gátja lehet (137, 212). Ezeknek a HSR-eknek közös jellemzője, hogy IgE nem játszik szerepet, és általában a tünetei valamint az alapjául szolgáló mechanizmusok nem illeszkednek a klasszikus „I-es típusú” túlérzékenységi osztályba, ezért inkább a „pszeudoallergia” kategóriájába

tartoznak. A mechanizmus minél alaposabb megismerése érdekében egy érzékeny sertés modell került bevezetésre, ami kiemeli a komplement (C) aktiváció kulcsszerepét nanomedicinák-indukálta reakciók esetében. Számos klinikai vizsgálattal (213-223) összhangban, mivel a C aktiváció kulcsszerepét játszik ezen reakciók folyamataiban, a pontosabb megnevezés érdekében bevezetésre került a komplement aktiváció-függő pszeudoallergia (complement activation-related pseudoallergy, CARPA) kifejezés (99, 212).

3.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációjának vizsgálata

Polietilénglikol nagymértékben hidratált, 0,5-40 kDa-os $[-CH_2-CH_2-O]$ egységek lineáris polimere. Széles körben alkalmazzák a hatóanyag leadó rendszerek esetében, mivel módosítja az aktív hatóanyag farmakokinetikai tulajdonságait. A PEG láncok kis molekulákhoz, peptidekhez, fehérjékhez, oligonukleotidokhoz vagy nanorészecskékhez történő csatolása hatékonyan csökkenti az enzimátikus lebomlásukat és megnöveli a keringési idejüket a vérben (224). Ilyen eljárás a liposzóma PEGiláció is, amely esetében a PEG „lopakodó” tulajdonságot biztosít, vagyis segít elkerülni a liposzómák makrofágok általi fagocitózist, ami növeli a liposzómák életidejét a szervezetben és dózisfüggetlen farmakokinetikát eredményez (kivéve a nagyon alacsony dózis) (225, 226).

Az ammónium-szulfát (AS) és más kozmotropikus szerek kiválthatják az aggregációt és a fúziót. Az aggregátumok a hidrofób kölcsönhatások révén keletkeznek, amelyek a növekvő sókoncentráció szolvofób hatásának eredményei (227). Ez a jelenség hasonlít a fehérje frakcionáláshoz és tisztításhoz rendszeresen használt kisózási módszerhez (228, 229). Az aggregátum képződés mechanizmusának megértése értékes információkkal szolgálhat a sikeres gyógyszerkészítményekhez, ahol a liposzóma aggregációt megelőzhetjük vagy szabályozhatjuk. Ezért első célkitűzésként az aggregáció és a fúzió mechanizmusát vizsgáltuk PEGilált liposzómák esetében.

3.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban

Az immunrendszer által felismert PEGilált nano-biogyógyszerekkel kapcsolatos kérdések, amelyek túlérzékenységi, gyulladásoz reakcióban és immunogenitásban

nyilvánulnak meg, még eddig megoldatlanok (88, 147, 230-235). A CARPA egyik leggyakrabban vizsgált példája a PEGilált liposzómális Doxorubicin (Doxil®) okozta HSR. Jelen disszertáció négy célkitűzése közül a második, hogy tisztázza a sertés HSR-ben a C szerepét, a Doxil okozta reakciók tekintetében. Különösen a PEG ellenes ellenanyagok reakcióban betöltött szerepét vizsgáltuk, aminek több oka is volt. Egyrészt, mert az ellenanyagoknak kiemelt szerepük lehet a klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációban. Másrészt, mert egérben és patkányban a C aktiváció jelentős mértékben hozzájárul az ismételt beadott PEGilált liposzómák ABC jelenség mechanizmusához (66, 67, 72, 236-238), harmadrészt, mert a piacról visszahívott Pegnivacogin esetében az anafilaktikus reakciók összekapcsolódtak az anti-PEG ellenanyagok magas szintjeivel (231).

3.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktoral

Gombás fertőzések elleni gyógyszerről, az Amphotericin B-t tartalmazó liposzómáról (AmBisome), és a széles körben alkalmazott rákellenes gyógyszerről, a Cremophor EL (CrEL) micellák által szolubilizált Paclitaxelről (Taxol), már korábban leírták, hogy az alternatív útvonalon keresztül képesek aktiválni a C rendszert, és sertésekben kiváltják a CARPA-t, ami a humán anafilaktikus reakciókra jellemző tüneteket produkálja (142, 144). Különböző terápiás ellenanyagok szintén okozhatnak túlérzékenységi reakciókat (147, 212). Így az volt a feltételezés, hogy a C aktiváció AP gátlása befolyásolhatja ezeknek a gyógyszereknek a CARPA aktivitását. Ezért harmadik célkitűzésünk az volt, hogy megvizsgáljuk az AP természetes regulátorának, a FH-nak és egy mesterségesen módosított mini-FH-nak a lehetséges gátló hatását AmBisome, CrEL és egy terápiás ellenanyag (Rituximab) által kiváltott *in vitro* C aktiváció során.

3.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktiválásában

Egy közelmúltban publikált vizsgálat megkérdőjelezte a HSR-ek pseudoallergiás természetét, a C szerepét és a sertés, mint releváns modell használatát (239). A cikk arra a következtetésre jutott, hogy a jelenség a PIM sejtek gyors fagocita válaszával (RPR) magyarázható, amiben a C aktiváció nem játszik szerepet. Az állítás nem korlátozódik

arra, mintha ez a polisztirol nanorészecske (PS-NP) sertésekben indukálta HSR egy speciális tanulmányozott esete lenne, hanem egy új CARPA-val versengő HSR teóriaként számol vele (239).

Az RPR hipotézis kísérleti alapja egy nemzetközi kutatás volt, aminek keretében az állatok különböző formájú (gömb, rúd, lemez) polisztirol nanorészecskéket kaptak intravénásan. A NP-k okozta hemodinamikai változások nem korreláltak *in vitro* sertés vérben ezen partikulumok által okozott C aktivációval. Az eredmények szerint, a gömb alakú PS-NPs-ek legnagyobb pulmonális hipertenzív hatása (mint a HSR mértéke) korrelált ezen részecskék egér vérből való kiürülésével *in vivo*, valamint a tenyésztett makrofágok általi gyors felvételükkel, de C aktivációval *in vitro* teljes vér vizsgálata esetén nem volt ilyen összefüggés (240). A makrofágok fagocitózisát gátló klodronátot tartalmazó liposzómák által okozott pulmonális reaktivitás gátlása szintén bizonyíték volt a makrofágok okozati szerepére (240).

Annak ellenére, hogy az előbb említett adatok kétségkívül mutatják a makrofágok szerepét HSR-ben, mégsem jelenthető ki, hogy sertésekben PS-NP indukálta HSR-ben a C aktiválást nem játszik szerepet. Ennek szellemében negyedik célkitűzésként a PS-NP sertésekben kiváltotta HSR-ek további tanulmányozása állt, hogy még több információ álljon rendelkezésre, vajon a C aktiváció részt vesz a folyamatokban, vagy sem.

4. Módszerek

4.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők által kiváltott aggregációjának vizsgálata

Anyag

Koleszterin, mono PEGilált 1,2-disztearoil-glicero-3-foszfoetanolamin (mPEG-2000-DSPE) és a hidrogénezett szója-foszfatidil-kolin (HSPC) a Lipoid GmbH-től (Ludwigshafen, Németország) származott. Etanol, izopropanol, hisztidint, szukrózt, ammónium szulfátot (AS), nátrium szulfátot, magnézium szulfátot, nátrium citrátot, magnézium kloridot és guanidin kloridot (GdmCl) a Sigma Aldrich Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. Infúziós Salsol (TEVA Hungary Zrt., Debrecen, Magyarország) a SE Egyetemi Gyógyszertárából szereztük be, míg a tisztított vizet Milli-Q Integral 3 Water által állítottunk elő.

Liposzóma készítés

Az extrudálási módszerrel (241) előállított liposzóma szuszpenzió lipid és puffer összetétele az FDA által jóváhagyott és forgalmazott Doxil összetételével volt megegyező. A lipid összetétel koleszterinből, mPEG-2000-DSPE-ből és HSPC-ből állt (mólarány az 18. táblázat szerint). A lipidek etanol-izopropanol elegyben (1:1) voltak oldva, amihez cseppenként adtuk hozzá a 0,9%-os sóoldatban felvett 0,25 M AS-t. A nagy heterogén (MLV) lipid részecskéket 80 nm-es átmérőjű Whatman Nuclepore (Track-Etched Membranes; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) membránszűrőn extrudáltuk LipexTM Extruder-en (Northern Lipids Inc., Burnaby, B.C. Kanada) 50 Bar-on és 70°C négyszer, amivel egyenletes méreteloszlás érhető el. A liposzómákat 10% szukróz/ 10mM-os hisztidin pufferben (pH=7,5) dializáltuk, amivel az AS és a szerves oldószerek távolítottuk el, majd 1:1 arányban hígítottuk pufferrel. A teljes anyag tartalom 15,9 mg/mL (körülbelül 21,4 mM), míg a PL tartalom 12,7 mg/mL volt. A liposzómákat fénytől védve 4°C-on tároltuk, amíg nem használtuk fel. A méreteket Malvern Zetasizer Nano S (Malvern Instruments Ltd, Malvern, Egyesült Királyság) műszerrel határoztuk meg.

18. táblázat Liposzóma kompozíció.

PEG mól%	Mól arány (Koleszterin : mPEG : HSPC)
0	38,4 : 0 : 61,6
2	38,7 : 2 : 59,3
5	38,4 : 5 : 56,6
10	38,4 : 10 : 51,6

PEGilált liposzómák összekeverése különböző sókkal

Turbidimetriás, fényszórás és Zeta-potenciál mérésekhez 20 μL PEGilált liposzómát 980 μL sóoldattal kevertünk össze (50x hígítás). Fáziskontraszt és atomerő mikroszkópiás (AFM) kísérletek során a liposzómákat 200- vagy 500-szorosan hígítottuk a megfelelő koncentrációjú sóoldattal. Az AS-t fiziológiás sóoldattal hígítottuk a megfelelő koncentrációra.

Fúzió és reverzibilis aggregáció vizsgálata

500 μL PEGilált liposzómát 500 μL AS oldattal kevertünk össze, ami a kívánt AS koncentráció (0,8 M-2,0 M) kicsapott mintáját eredményezte. 15 perc inkubálás után 20 μL -t vittünk át 980 μL megfelelő koncentrációjú AS oldatba (0,1 M-ig).

Turbidimetria

A PEGilált liposzómák aggregációját optikai denzitás méréssel követtük. 4 μL jól összekevert mintát használtunk egy mérés során NanoDrop 2000 UV-vis spektrofotométerben (ThermoScientific Ltd., Wilmington, DE, USA), aminek az optikai denzitását 250 nm-en rögzítettünk. Mivel a lipidkoncentráció állandó volt, ezért az optikai denzitás növekedés az aggregáció okozta nagyobb részecskékkel volt arányos. Az összehasonlíthatóság érdekében a különböző mintákban azonos lipidkoncentrációkat alkalmaztunk.

Dinamikus fényszórás mérése

A liposzómák és az aggregátumok méreteloszlását dinamikus fényszórással (DLS) jellemeztük, amit Zetasizer NanoS eszközzel mértünk le. A Brown-mozgást végző szuszpendált részecskék részecskeméretének meghatározása a részecske két térbeli

pozíciójának korrelációja határozza meg, ami egy 633 nm hullámhosszú hélium-neon lézer segítségével mérhetőek. A szórt fény detektálása visszaszórásos módban történik 173°-nál, amely során információt kapunk a diffúziós együtthatóról, amiből a hidrodinamikai átmérő a Stokes-Einstein egyenlet segítségével számolható ki. A fényszóródást 25±1° C-on mértük le. Mérések során a Z-átlagértéket használtuk, amelyek a DLS-technika (242) által előállított elsődleges és legstabilabb paramétere, és a minőségellenőrzési jelentésekhez (ISO 22412:2008) is ezt ajánlják. A Z-átlagértékek a jól diszpergált részecskék hidrodinamikusan átmérőjének jó megközelítését mutatják monomodális méreteloszlás esetében (polidiszperzitási indexe kisebb, mint 0,1), ezért jól alkalmazható a PEGilált vezikulák esetében. Kicsapott minták esetében nem tükrözi a valós értéket, mivel ezek általában méretüket tekintve heterogének és szabálytalan alakúak lehetnek. Ilyen esetben a Z-átlag csak a részecskeméret durva becslésére használható fel, ami lehetőséget ad az aggregált liposzómák követésére, az aggregált dimenzió pontos meghatározása nélkül. Mivel különböző PEGilált liposzóma sárzsokat használtunk a különböző kísérletekben, ezért kisebb eltérések lehettek a kontroll vezikulák átlag méretében.

Zeta-potenciál mérés

PEGilált liposzómákat AS-tal hígítottuk, amiből 750 µL-t óvatosan egy küvettába (PCT Kft., Mosonmagyaróvár, Magyarország) töltöttünk, hogy elkerüljük a buborékképződést. A Zeta-potenciál mérésekhez Zetasizer NanoZS műszert használtunk, amiben a részecske sebesség a kölcsönösen koherens lézer fénypár (4 mW, 633 nm He-Ne lézer) által előidézett Doppler-effektuson alapuló szórt fény technika szerint történt. A szórt fény intenzitás autokorrelációs függvényéből az elektroforetikus mobilitás és Henry-egyenleten keresztül a Zeta-potenciál számolható ki. A méréseket 25±1°C-on végeztük el.

Zeta-potenciál adatok elemzése

A liposzóma felszínére kötődő ionok és az ezzel járó felszíni potenciálváltozás a Langmuir-Freundlich izotermával írható le (243).

$$\zeta = \zeta_0 + \Delta\zeta_{max} \cdot \frac{(K \cdot c)^n}{1 + (K \cdot c)^n}$$

ahol „ ζ ” a mért Zeta-potenciál, „ ζ_0 ” a Zeta-potenciál nulla AS-koncentrációnál, „ $\Delta\zeta_{\max}$ ” a Zeta-potenciál maximális változása, „K” a kötési állandó, „c” a ligandum koncentrációja, „n” az heterogenitás indexe, amely leírja az ionkötés kooperativitását.

Atomerő mikroszkópia (*Atomic force microscopy* - AFM)

Az AFM felvételeket egy Cypher S atomerő mikroszkóppal (Asylum Research, Santa Barbara, CA, USA) készítettük. 100 μL mintát inkubáltunk pára kamrába helyezett bórszilikát üveg fedőlemezen $23\pm 1^\circ\text{C}$ -on, majd eredeti folyadék közegében pásztáztuk, aranybevonatú szilícium-nitrid rugólapkával (Olympus Biolever, A lapka, tipikus rugóállandó: 30 pN/nm), non-kontakt képalkotási módban, 0,5-1 Hz vonalmenti pásztázási sebességgel. A képalkotást $28\pm 1^\circ\text{C}$ -on végeztük. A felvételeket az AFM kezelőprogramjának (IgorPro, WaveMetrics, Inc., Lake Oswego, OR, USA) beépített algoritmusával elemeztük.

Fáziskontraszt mikroszkópia

A fáziskontraszt-mikroszkópos felvételeket egy 40-szeres nagyítású Nikon S Planfluor fáziskontraszt objektívvel felszerelt Nikon Eclipse Ti-U inverz rendszerű mikroszkóppal (Auro-Science Kft., Budapest, Magyarország) készítettük, uEye UI 1220 LE digitális kamera (IDS Imaging Development Systems GmbH, Obersulm, Németország) segítségével.

Infravörös spektroszkópia

Az infravörös spektrumok felvétele teljes reflexiós (ATR - Attenuated Total Reflection) mérési módban történt (Varian 2000 FTIR Scimitar Series spektrométer, Varian Inc., Palo Alto, CA, USA; "GoldenGate" egyreflexiós gyémánt ATR tartozék, Specac Ltd., Egyesült Királyság). Minden mérés szobahőmérsékleten történt, 2 cm^{-1} spektrális felbontással és 128 egyedi mérés átlagolásával. A mintákat vizes szuszpenzióként mértük, 3 μL mintát vittünk fel - mintaelőkészítés nélkül - a gyémánt ATR kristály felületére. A spektrumok feldolgozásához (ATR korrekció, víz háttér kivonás, sávfelbontás) a GRAMS/32 szoftvercsomagot (Galactic Industries Corp., Salem, NH, USA) használtuk. A sávfelbontáshoz a csúcserkékek pozícióit másodfokú derivált segítségével határoztuk meg, az egyedi sávkomponensek illesztése Lorentz

függvényekkel történt (megengedett változó intenzitás és sáv szélesség mellett, minimum χ^2 paraméter eléréséig). Az egyedi komponensek relatív mennyiségét a megfelelő sávkomponensek integrált intenzitásából számoltuk.

Birka vörösvérsejt teszt

12 különböző NHS-t és 5 különböző a Doxillal megegyező összetételű, de Doxorubicint nem tartalmazó liposzómát használtunk a mérések során. A liposzóma készítés és az AS-tal kezelt minták előkészítése már korábban részletezve.

15 μL szérumot kevertünk össze 5 μL liposzómával, ami folyamatos kevertetés mellett 45 percig inkubáltunk 37°C -on. A szérum maximális C tartalmát - amiből a fogyás számolható -, a kezeletlen szérum adja meg. A reakció után a mintákat Dextróz-Gelatin-Veronal pufferrel (Lonza, MD, USA) hígítottuk. 50 μL BVVS-t (Culex Bt, Budapest, Magyarország) 2-2x mostunk PBS-10 mM EDTA-val és Veronallal. Mosás után a BVVS pelletet 300 μL Veronalban vettük fel, amihez 1:1 arányban anti-BVVS (Sigma Aldrich Kft.) ellenanyagot adtunk hozzá. 30 perc 37°C -os inkubálás után 2x mostuk a sejteket. 280 μL aktivált szérumot adtunk hozzá a pellethez, majd folyamatos kevertetés mellett 10 percig inkubáltuk 37°C -on. Fugálás után a felülúszóból 100 μL -t vittünk át egy 96 lyukú plate-re, ahol az abszorbanciát egy FLUOstar Omega 96-well plate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Németország) segítségével határoztuk meg 541 nm-en.

4.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban

Gyógy- és vegyszerek

PEGilált liposzómális doxorubicin (doxorubicin hidroklorid liposzóma injekció, Caelyx®) egy helyi gyógyszerházból szereztük be. Caelyx a Doxil® európai márkaneve, amit a Janssen-Products gyárt (Horsham, PA, USA). 2 mg/mL (4,22 mM) Doxorubicint, 9,58 mg/mL HSPC-t, 3,19 mg/mL koleszterint, 3,19 mg/mL mPEG2000-DSPE-t, ~0,2 mg/mL AS-t, hisztidint (10 mM, pH 6,5) és szukrózt (10%) tartalmaz. Teljes PL tartalom 12,8 mg/mL (13,3 mM). Koleszterint az Avanti Polar Lipids Inc.-től (Alabaster, AL, USA), a mPEG2000-DSPE-t a NOF-től, a HSPC-t és hidrogénezett szója-foszfatidil-glicerolt (HSPG) a Lipoid Inc.-től szereztük be. Minden lipid tisztasága

≥97% volt. Zymosan a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, MO, USA), míg a Doxorubicint a TEVA Pharmaceuticals-tól szereztük be (Petach Tikva, Izrael).

Doxebo készítés

Doxebo készítése és karakterizálása egy korábbi cikkben közöltek szerint végeztük el (244). Röviden, a Doxil lipid komponenseit 10 mL steril pirogén mentes normál fiziológiás sóban hidratáltuk, majd 2-3 perc 70°C-os kevertetés révén kialakultak a MLV-k. Az MLV 2 lépésben 62°C-on egy 10 mL extruder segítségével 0,4 és 0,1 µm polikarbonát szűrőkkel szabtuk méretre 10-10x. A liposzómákat 0,15 M NaCl/10 mM hisztidin pufferben (pH 6,5) szuszpendáltuk. Méret (Z-átlag: 81,17 nm) és PL koncentráció (12,6 mg/mL) meghatározás a cikkben leírtak szerint történt (244).

Sertés kísérletek

A sertés kísérletek részletei korábbi publikációkban megtalálhatóak (142, 143, 245, 246). Röviden, a kevert fajtájú hím Yorkshire/Magyar Lapály sertések (2-3 hónaposak, 18-22 kg) a herceghalmi Állattenyésztési és Táplálkozástudományi Intézetből vannak. Az állatokat Calyptol/Xilazinnal szedáltuk le, majd izofluránnal (2-3% O₂-ban) érzéstelenítettük. Az intubációt endotracheális csövekkel végeztük el a szabad légutak érdekében, és szükség esetén biztosítva volt szabályozott szellőzés. Az állatok spontán lélegeztek a kísérletek során. A sebészeti beavatkozást a povidon-jód (10%) fertőtlenítés után végeztük el. A PAP méréséhez Swan-Ganz katétert (AI-07124, 5 Fr. 110 cm, Arrow Internat Inc., Reading, PA, USA) vezetünk be a pulmonális artériába, a jobb jugularis externa vénán keresztül. További katétereket helyeztünk be a baloldali femorális artériába (SAP mérésére), a baloldali jugularis externa artériába (sóoldat és gyógyszeradagolás érdekében) auris vénából (vérvétel antitest mérés céljából) és a bal femorális vénába (vérvétel CARPA mérések céljából). A pulzusszámot (Heart Rate - HR) az EKG jelből mértünk, ami egy Ag/AgCl monitorozó elektródokon (3M Health Care, No: 2228) keresztül volt rögzítve. A vérnyomás és pulzusszám jeleket ADInstruments LabChart Pro v8 (Sydney, Ausztrália) szoftverrel értékeltük ki.

Minden kísérlet az intézményi és a nemzeti iránymutatások és szabályzások alapján voltak kivitelezve, amelyek etikai és jogi engedélyeit a Semmelweis Egyetem

Állategészségügyi és Etikai Bizottsága valamint a Fővárosi Élelmiszerlánc-biztonsági és Állategészségügyi Igazgatósága hagyott jóvá.

Vizsgálattervezés

A sertések immunizálása PEGilált liposzóma (Doxebo) kis dózisu (0,1 mg PL/kg) injekciósával történt, amit a vérben lévő anti-PEG IgG és IgM mérése követett 6 hétig. A szerokonverzióknak megfelelően (az az időtartam, amely alatt egy specifikus ellenanyag kialakul és kimutatható válik a vérben), a CARPA reakciók vizsgálata során az immunizált állatok egy újabb kezelésen estek át, amely során Doxebot, Doxilt és Zymosant kaptak. A reakció okozta hemodinamikai változások közül a pulmonális hipertenzió volt a legegyszerűsebb és legérzékenyebb kvantitatív marker. Reakció előtti és során vett vérből különböző markereket mértünk le, az anti-PEG ellenanyagokat (IgM és IgG) és az sC5b-9-et. A változásokat összehasonlítottuk és korreláltattuk a naiv, azaz nem immunizált állatokban megfigyelttel. Doxebo kísérletek egy PEGilált fehérjével, a Pegfilgrastimmal (Neulasta, Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA) immunizált állatok eredményeivel is össze voltak hasonlítva. A Pegfilgrastimmal (0,174 mg/kg) immunizált állatok CARPA mérései során, Pegfilgrastiomot, Doxebot és Zymosant adtunk be. Ezekből szintén mértünk anti-PEG ellenanyag szinteket.

Bizonyos állatokat, a 0. napon a Doxeboval történő immunizálást követően vagy 0,1 mg PL/kg Doxillal, vagy Doxil humán ekvivalens dóziséval (HED: 6,4 mg PL/kg) kezeltük.

CARPA reakciók vizsgálata sertésekben

A teszt mintákat (liposzóma szuszpenziók) és a Zymosant bólusban (<10 s) vagy infúziókn keresztül a bal jugularis externa vénán át adtuk be az állatoknak. A kezelés során tipikusan 0,1 mg PL/kg Doxebo injekciót kaptak az állatok, amit hasonló dózisu Doxil, majd ennek 10-szeres dózisa követett, míg végül 0,1 mg/kg Zymosant adtunk be, mint pozitív kontroll. Hemodinamikai változások folyamatosan egy számítógépes multiplex paraméteres hemodinamikai monitoring rendszerrel (1000 Hz mintavételi sebesség) követtük. A SAP jelből származó szívritmus mellett, a SAP és a PAP rögzítéséből származó adatokat online átlagoltuk és rögzítettük. A PAP és SAP görbe

alatti terület (AUC) számítása a PAP és SAP higanymilliméter (mmHg) értékek összegzésével voltak megállapítva az alábbi formula szerint:

$$\sum_{n=1}^x \text{abs}\left(\frac{PAP_n + PAP_{n+1}}{2} - PAP_0\right)$$

ahol „n” a percet, „x” az utolsó percet, míg a PAP_0 , a 0. percben mért PAP értéket jelöli.

Vérminták

Az antitestméréshez szükséges mintákat a fül vénából vettük le az előkezelést megelőzően és különböző meghatározott időpontokban. Az antikoagulációt EDTA-val végeztük a megfelelő K3-EDTA csövek alkalmazásával.

Sertés sC5b-9

A sertés sC5b-9 meghatározást egy korábban közölt cikk alapján végeztük el (247). Röviden, mikrotiter plate-t egérben termelt anti-humán sC5b-9-cel fedtünk be (aE11 klón), majd a 10 mM EDTA-t tartalmazó mintát 1 óráig inkubáltunk. Másodlagos antitest, biotinilált egér anti-humán C6 (Quidel A219) volt. Az előhívás streptavidin torna peroxidáz és ABTS/H₂O₂ szubsztrát alkalmazásával történt.

Anti-PEG ellenanyag ELISA

Polysorp (Nunc, Roskilde, Dánia) plate-t 4°C-on egy éjszakán keresztül 1,25 µg PL/well mPEG2000-DSPE-vel (bikarbonát puffer, pH ~ 9) fedtünk be. 0,05% Tween-20-at tartalmazó PBS-sel mostuk a lemezt 3x, majd 150 µL/well PBS/0,05% Tween-20+2% szarvasmarha szérum albuminnal (BSA) blokkoltuk 37°C-on 2,5 órán keresztül. Blokkolás után ismét mostuk a welleket mosóoldattal. Plazma mintákat PBS/0,05% Tween-20+1% BSA oldattal hígítottuk, majd másfél óráig 37°C-on inkubáltuk lassú keverés közben. Inkubálás után a welleket 5x mostuk 1 percig mosásonként. 100 µL/well peroxidáz konjugált anti-sertés IgM (2000x hígítás, Sigma) vagy IgG (800x hígítás, Sigma) hozzáadása után 1 órát állt szobahőmérsékleten, amit a lemez ötszöri mosása követett. A másodlagos ellenanyagokat 100 µL/well tetrametil-benzidint (TMB) és hidrogén peroxidázt tartalmazó oldattal (Neogen, Lancing, USA) hívtuk elő szobahőmérsékleten sötétben 15 percen keresztül. A reakciót 50 µL/well 2N H₂SO₄ oldattal állítottuk le, míg az abszorbanciát egy FLUOstar Omega 96-well plate reader

műszer segítségével határoztuk meg 450 nm-en. A minták titereit egy sertésből származó standard plazma hígítási sorából állapítottuk meg. A sertést vérvétel előtt 8 nappal a Doxil hordozójával (0,1 mg PL/kg) immunizáltuk.

Statisztikai eljárások

Az adatok normál eloszlásának vizsgálatát Kolmogorov-Smirnov teszttel végeztük el. A változók időfüggését Friedman-teszttel (nem parametrikus) határoztuk meg (post-hoc teszt: Dunn próba, többszörös összehasonlító teszt). A kezelések során sC5b-9 és PAP AUC értékek változása közötti összefüggés megállapításához Pearson analízist használtunk. A 0,05-nél kisebb p-értéket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük. A statisztikai elemzéshez GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) programot használtuk.

4.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktoral

Fehérjék, reagensok és szérumok

Tisztított humán FH-t a Merck Kft.-től (Budapest, Magyarország) szereztük be. A rekombináns mini-FH (ami a FH CCP1-4 és CCP19-20 doméneket tartalmazza), rovarsejtekben volt előállítva (248, 249). CrEL-t és a Zymosan (Zymosan-A) a Sigma-Aldrich Kft.-től, az AmBisome-ot a Gilead Sciences Ltd.-től (Paris, Franciaország), míg a Rituximabot (Rituxan, Roche, Nagy-Britannia) egy helyi gyógyszertárból szereztük be. A vérvétel és a kísérletek a megfelelő kutatási etikai bizottság jóváhagyásával és a Helsinki Nyilatkozatnak megfelelően végeztük el. A beleegyezésüket adó donorok egészséges kaukázusi önkéntes véradók voltak. A perifériás vérmintákat BD Vacutainer® (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) csőben gyűjtöttük, amik 4°C-on álltak egy darabig, majd centrifugálás és szétporciózás után a normál humán szérumokat -80°C-on tároltuk.

Liposzómák

Liposzómák készítése a 4.1 pontban vannak részletezve. Az összetételük a 19. táblázatban van feltüntetve. A koleszterinhez rögzített PEG2000-et tartalmazó liposzóma az utrechti Gyógyszertudományi (Utrecht Egyetem, Hollandia) Intézetből származik.

19. táblázat Különböző liposzómák összetételei.

Liposzóma	Mól arány %-ban (Koleszterin : PEG : HSPC)	Extrúzió	Méret (d.nm)
4901S MLV	39 : 0 : 61	nem	269,5
4901S SUV	39 : 0 : 61	igen	102,4
4902S MLV	39 : 5 : 56	nem	530,1
4902S SUV	39 : 5 : 56	igen	82,8
4903S MLV	39 : 10 : 51	nem	323,4
4903S SUV	39 : 10 : 51	igen	69,3

ELISA mérések

A CrEL 105,4 mg/mL-re, a Zymosan 1,5 mg/mL-re hígítottuk PBS-sel (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4), míg az AmBisome 20 mg/mL-re volt hígítva steril vízzel. A FH-t vagy a rekombináns C inhibitort szintén PBS-ben hígítottuk. 5 µL hígított inhibitor 15 µL NHS-sel volt összekeverve, amihez 5 µL aktivátort adtunk hozzá, majd 37°C-on 45 percig inkubáltuk. A PBS-ben hígított Rituximab (végkoncentráció: 75 µg/mL és 300 µg/mL) és a FH, illetve mini-FH (végkoncentráció: 1,3 µM) 50-50%-ban volt összekeverve Lepirudint tartalmazó csőben levett teljes vérrel (össztérfogat: 300 µL). Keverés után 300 percig inkubáltuk 37°C-on, majd 10 perc 1750 g fugálás után az sC5b-9 koncentrációt (TECOmedical AG, Sissach, Svájc) mértük a gyártó által mellékelt protokoll szerint.

4.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktiválásában

Anyag

A 200, 500 és 750 nm átmérőjű Polystyrene Polybead® Carboxylate Microspheres (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) koncentrációi a gyártó által megadottak voltak (NP száma/mL) (250). A magas tisztaságú HSPC, koleszterin és DSPE-mPEG2000 lipidek a Lipoid-tól, Rose Bengal, dinátrium-só az Alfa Aesar-tól (Lancashire, Egyesült Királyság) voltak beszerezve. Az anti-sertés C9 neoepitóp (klón: aE11) a Thermo Fishertől, a FITS-konjugált anti-humán C3b/iC3b, (klón:7C12), Dr. Ronald Taylor-tól (pennsylvania-i Egyetem) származik. Korábbi tanulmányok szerint a

7C12-es klón keresztreagál a sertés C3b/iC3b-vel. A humán C3a, Bb, C4d és sC5b-9 ELISA a TECOMedicaltól, míg a Zymosan és az EDTA a Sigma Kft-től rendeltük meg.

Liposzóma készítés

A PEGilált nanoliposzóma előállítása - melynek lipid összetétele HSPC:Koleszterin:DSPE-mPEG2000 (3:1:1 tömegarány) - korábban leírtak szerint történt (251, 252). A lipideket abszolút etanolban oldottuk fel 62-65°C-on, majd magastisztaságú víz hozzáadásával (hidratálásával) MLV-t állítottunk elő. A MLV-ből SUV kialakítása polikarbonát membránokon (pórusátmérő 400-100 nm) (Osmonics, Trevose, Pennsylvania, USA) keresztül többlépcsős extrúziós módszerrel történt Lipex extruder segítségével.

PS nanorészecskék fizikai-kémiai analízise

PS-NP-k méretét és méreteloszlását DLS technológiával határoztuk meg (253). A nagy és alacsony vezetőképességű Zeta-potenciál (Zp) (150 és 1,5 mM nátrium-nitrát felhasználásával) Malvern Zetasizer Nano ZS-sel voltak lemérve, amihez nátrium-nitrát elektrolitot használtunk. Ez a nátrium-kloridnál sokkal kevésbé ártalmas elektróda, és szinte azonos ozmotikus nyomással és vezetőképességgel rendelkezik (Kanaan és Barenholz nem publikált eredményei).

PS nanorészecskék morfológiáját Cryo-TEM (transzmissziós elektronmikroszkóp) segítségével vizsgáltuk meg (254). Nanoliposzómák szolgáltak referenciaként, amiknek karakterizálás hasonló módon történt.

A felszíni hidrofobicitást a nanorészecskék Rose Bengal (RB) xantén festés adszorpciójának mérésével állapítottuk meg (255), referencia itt is a nanoliposzóma volt. 0,04 mg/mL RB festéket 2 órán keresztül inkubáltunk PS-NP növekvő koncentrációjával, amit az NP-k ultracentrifugával (155000 g) történő elválasztása követett, majd a felülúszóból a szabad festéket 550 nm-en határoztuk meg.

A PS-NP-k és a liposzómák felszínének kiszámítása során, monodiszperz rendszert feltételeztünk, aminek átmérője egyenlő a DLS-vel mért hidrodinamikus átmérővel. A teljes felszíni területet a gyártó által megadott részecske szám szerint számítottuk ki (250) a különböző PS-NP-k esetében, vagy Nanosight Tracking Analysis (Malvern, Nanosight instrument NS300) segítségével mértük le.

PS nanorészecskén történő C3b lerakódás és terminális komplex (C5b-9) képződés FACS analízise *in vitro* sertés szérumban

500 és 750 nm-es PS részecskéket tartalmazó keveréket, sertés szérummal (térfogat arány: 1:39) inkubáltunk 37°C-on, folyamatos kevertetés mellett. A gyöngyök koncentrációit úgy állítottuk be, hogy egyenlő felületük legyen (összesen 0,3 cm²/mL). 5 különböző (0, 1, 3, 5 és 20 perc) időpontban vettünk mintát, ami után a C aktiváció EDTA-t (végkoncentráció: 20 mM) tartalmazó jéghideg Dulbecco PBS-sel (Ca²⁺/Mg²⁺ nélkül) (D-PBS) állítottuk le. 20 percig inkubált, 20 mM EDTA-val kiegészített szérumhoz hozzáadott PS nanorészecskék voltak a negatív kontrollok. Ezt követően a részecskéket 2-szer mostuk „festő pufferrel” (PBS/3% FBS/0,05% nátrium-azid), majd anti-iC3b-Fluorescein-izotiocianát (FITC) antitesttel (klón: 7C12) vagy anti-C9 neoepitóp (anti-C9neo) antitesttel (klón: aE11) festettük 30 percig 4°C-on. Mosás után az anti-C9neo-val jelzett részecskék indirekt módon további PE-jelzett anti-egér antitesttel (BioLegend, San Diego, CA, USA) kezeltünk „festő pufferben” 30 percig 4°C-on. A 0 perces minták egy részét aE11 mentes PE jelölt szekunder ellenanyaggal is festettük a fluoreszcencia háttér feltérképezéséhez. Az egyes mosási lépések között és után centrifugálással (5000 g 6 percig, 4°C) szeparáltuk a partikulumokat. A C aktiváció és mintaelőkészítés után partikulumokat áramlási citometriával (FACScan, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA) mértük és az adatokat szoftver (Kaluza, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) segítségével elemeztük. A részecskéket az FL2-ben mutatott autofluoreszcenciájuk (FL2-H), jelzélességük (kicsi FL2-W), valamint az oldalszórás (SSC) alapján azonosítottuk. Az FL-1 (anti-iC3b-FITC festés) és az FL-2 (közvetett anti-C9neo és aE11 mentes PE jelölt szekunder ellenanyag) számtani középértékéből következtettünk azok felszíni kötődésére.

PS-NP okozta komplement aktiváció detektálása sertés szérumban Western blot analízise által

200, 500, vagy 750 nm PS nanorészecskéket (végkoncentráció: 145 cm²/mL) sertés szérummal (Oriental Yeast Co.,Ltd., Tokió, Japán) inkubáltunk 30 percig (1:9 térfogat arány) 37°C-on. Ezután az elegyet 0,1%-os SDS (nátrium dodecil-szulfát)-pufferrel hígítottuk, majd 5-20% SDS-PAGE gradiens gélen redukáló körülmények között

elektroforetikusan szétválasztottuk. Blottolást követően a nitrocellulóz membránt (Hybond-ECL, GE Healthcare, Chalfont, Egyesült Királyság) 0,05% Tween20 és 3%-os nem zsíros száraz tejport tartalmazó PBS-sel (továbbiakban „Mosó oldat”) blokkoltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. Háromszori mosás (Mosó oldat) után a membránokat 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk anti-sertés C3 antitesttel (nyúl poliklonális antitest, LifeSpan Biosciences, Inc., Seattle, Washington, USA) (1:1000). Ismételt mosások (3x) után a membránokat torma-peroxidáz (HRP)-konjugált anti-nyúl IgG-vel (ThermoFisher Scientific) (1:10000) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán át. Újabb mosások után (3x), a membránokat ECL Plus Chemiluminescence Reagent (GE Healthcare) alkalmazásával kemilumineszcencia detektálásával hívtuk elő és a kapott képeket LAS-4000 EPUV mini és Multi Gauge v.3.2 (FujiFilm, Tokió, Japán) segítségével elemeztük ki.

Humán szérumok ELISA mérései

Egészséges donoroktól származó normál humán szérumokat 200, 500 és 750 nm PS-NP-vel (térfogat arány: 1:4) inkubáltunk folyamatos kevertetés közben 45 percig 37°C-on. Az összfelület minden mintában 72,5 cm²/mL volt. A reakciót 10mM EDTA-val kiegészített ELISA kitből származó minta hígítóval állítottuk le. A C3a, Bb, C4d és sC5b-9 szintek ugyanabból a mintából voltak meghatározva, a megfelelő ELISA kit révén (követve gyártó által előírt utasításokat). Az optikai denzitást, amiből a koncentráció határozható meg, FLUOstar Omega plate reader segítségével olvastuk le.

Sertés kísérletek:

A sertés kísérletek a 4.2 pontban vannak részletezve.

Sertések kezelése PS nanorészecskékkel

A PS-NP-t és a Zymosan bólusként (<5 s) adtuk be az állatoknak a jugularis vénába, amit 5 mL sóoldattal való bemosás követett. A különböző NP-k koncentrációit úgy állítottuk be, hogy az NP-k teljes felülete kiegyenlített legyen cm²/mL-ben (korábban leírva).

Statisztikai analízis

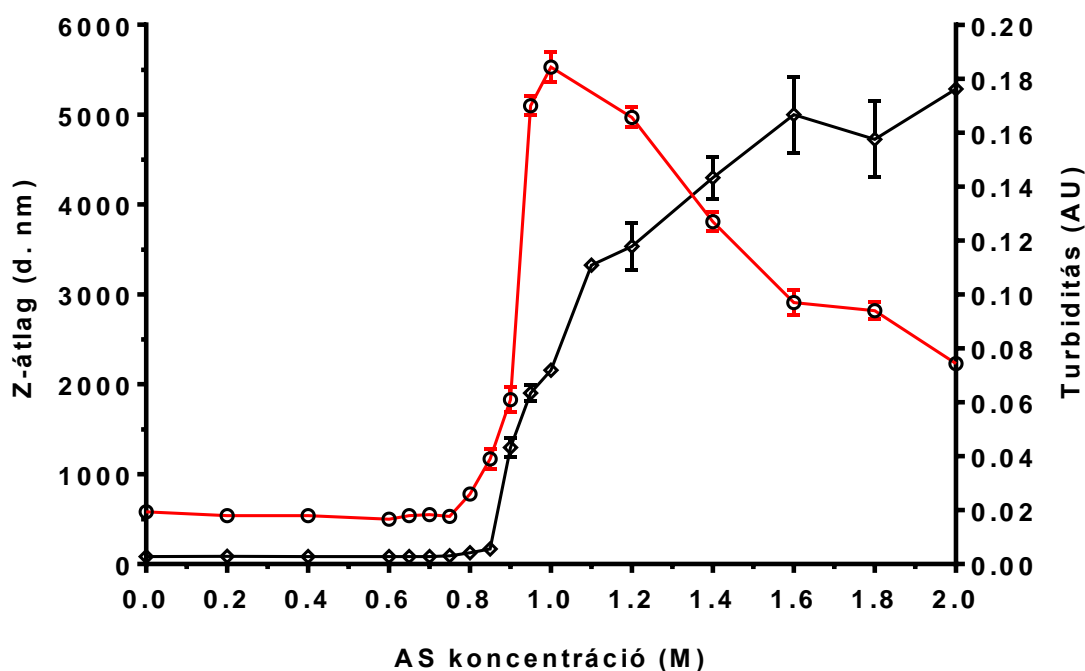
A statisztikai elemzés során, páros T-próbát, 2 mintás T-próbát, egy szempontos ANOVA-t (post-hoc teszt: Tukey-teszt), lineáris regressziót és korrelációs analízist használtunk. Ezeket az elemzéseket a GraphPad Prism szoftver segítségével készítettük el. Részletek az adott kísérletben vannak leírva.

5. Eredmények

5.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata

PEGilált liposzómák AS okozta kicsapódása

PEGilált liposzómákhoz hozzáadott különböző koncentrációjú AS (>0,8 M), erősen megnövelte a liposzóma szuszpenzió opálosságát. Az opálosság növekedését - amit a vezikulák precipitációja magyarázhat - turbidimetriával követtük 0-2 M AS koncentrációjú tartományban. Turbiditás vs. AS koncentráció görbe szerint (14. ábra), nem volt kicsapódás 0,75 M AS koncentráció alatt. 0,75 M fölött a turbiditás hirtelen emelkedett, majd 1M fölött nagyjából 1 nagyságrenddel nagyobb lett az érték, mint AS hiányában.

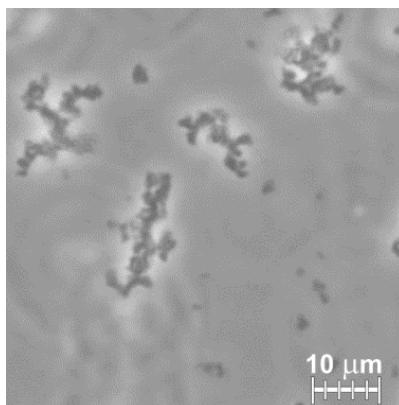


14. ábra Liposzóma szuszpenziók turbiditás (piros vonal) és átlagos részecske átmérője (fekete vonal) ammónium-szulfát (AS) koncentráció függvényében. 3 különböző mérés átlag±SD értékei. A lipidkoncentráció a mérés során állandó volt (50x hígítás, 0,318 mg/mL).

A turbiditás hirtelen növekedése összefüggésben volt a vezikulák aggregációja miatti méretnövekedéssel. Az AS koncentráció hozzáadása során kialakuló részecskék méretét dinamikus fényszórással (DLS) is lemértük (14. ábra). 0,8 M AS alatt a részecskék átlag mérete 83,2 nm és 91,5 nm között változott. Az AS koncentráció 1 M-ig történő emelése során, a méret hirtelen ~2000 nm-re, míg 1 M felett a méret tovább

nőtt, viszont lassabb emelkedést mutatott. 2 M AS koncentrációnál a részecskék átlagos mérete 5000 nm körül volt. Meg kell jegyezni, hogy a részecskeméret Z-átlaggal volt jellemezve, ami gömb alakú geometriai és monomodális méreteloszlást feltételez. Aggregáció esetében a részecskék alakjai valószínűleg eltértek a gömb alaktól, amit a 0,75 M AS fölött mért polidiszperzitási index növekedése ($>0,14$, ami heterogén mintát feltételez) is mutatott. Ez azt jelenti, hogy a részecske átlagos átmérőjét mutató a Z-átlag paraméter, csak egy nagyságrenden belüli megközelítésének felelhetett meg.

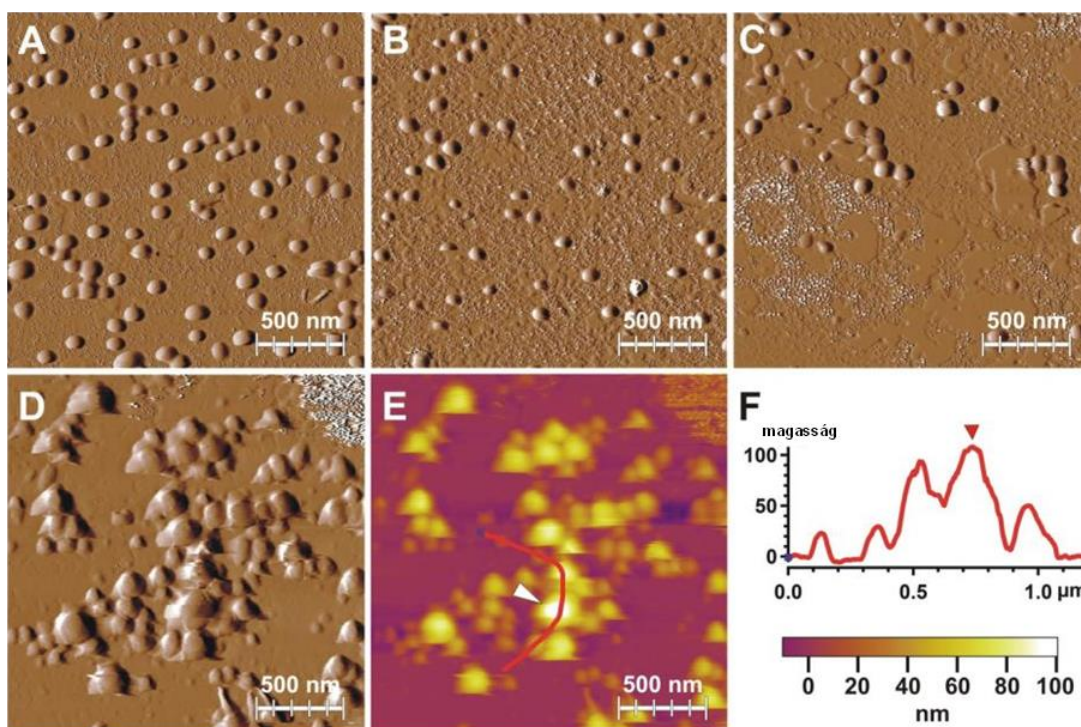
A precipitációs folyamatok mikroszkopikus részleteinek, illetve a vezikula aggregáció lejátszódásának vizsgálatához morfológiai méréseket is végeztünk. A precipitált minták fáziskontraszt mikroszkóp képei olyan szabálytalan alakú kisebb klasztereket tartalmazó elágazó objektumokat mutattak (15. ábra), amik hasonlóak a liposzóma aggregátumok elektronmikroszkópos képeihez (256).



15. ábra Liposzóma aggregátum fáziskontraszt mikroszkópos képe 1 M AS-ban. Nagy elágazó objektumok és kisebb aggregátumok jelennek meg (200x hígítás, 0,0795 mg/mL lipidkoncentráció).

Az aggregátumok ultrastruktúrájának és kialakulásának követésére a liposzómákat különböző AS koncentrációban vizsgáltuk AFM-mel (16. ábra). 0 és 0,7 M AS-nál egyedi liposzómák, míg 0,8 M AS-nál kis lineáris liposzóma asszociátumok voltak láthatóak, ami az aggregáció kezdetére utalhat. 0,9 M AS-nál világosan kivehető nagy aggregátumok voltak megfigyelhetőek. 0,8 M AS-ban a vezikulák mellett sima felületű 5-7 nm-es topográfiai magasságú háttér is megfigyelhető volt. Kettősrétegnek tűnik, bár némileg vékonyabb, mint egy mindkét oldalon PEG polimerrel borított lipid kettősréteg (~12 nm) (257, 258). A kettősréteg „foltok” valószínűleg azért tűntek fel, mert a vezikulák az ozmolitás növekedés következtében nagyobb hajlamot mutattak arra, hogy kipukkadjanak (259, 260). A foltképződés egy általános jelenség a liposzóma minták

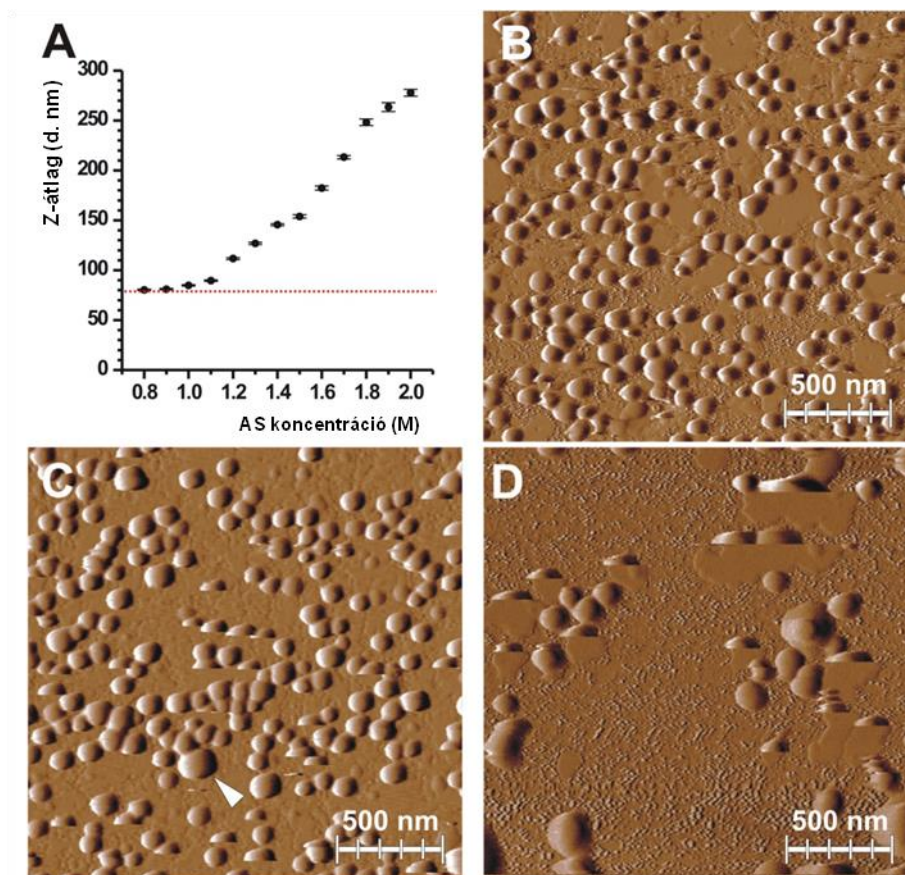
esetében. A különböző méretű foltok szinte az összes irodalomban publikált liposzómás AFM-képen megtalálhatóak (261, 262). Érdekes módon, a foltképződés megjelenése az AS koncentrációtól függött, amint azt a 16. ábra képei bizonyítják. Míg a foltképződés alacsonyabb AS koncentráción szórványos volt, addig 0,8 M felett kifejezetté vált (16C. ábra), 0,9 M-nál pedig a felszín nagy része összefüggő lipid kettősréteggel volt befedve (asszociátumok és vezikulák hátere a 16D. ábrán). 0,9 M AS-ban megfigyelt liposzóma asszociátumok (16D-F. ábrák) változatos nagyságrendűek voltak pár száz nm-től néhány μm -ig, ami nagyságrendileg korrelált a DLS adatokkal (14. ábra). Érdeemes megjegyezni, hogy a szabálytalan vezikula formák akár a képalkotás során létrejövő műtermék is lehetett és nem feltétlen a liposzómális alakváltozásé. Az AS koncentráció 0,8 M feletti növelése, nehezítette a képalkotást, ami valószínűleg a megjelent nagy és laza méretű aggregátumok tökéletlen felület kötődésének volt köszönhető. Számos próbálkozás történt annak érdekében, hogy a magasabb AS koncentrációban található nagyobb aggregátumokról képet alkossunk, de ezek a kísérletek sikertelenek voltak.



16. ábra (A) 0 M, (B) 0,7 M, (C) 0,8 M, (D) 0,9 M AS koncentrációnál a liposzómák AFM amplitúdó kontraszt képei (500x hígítás, 0,0318 mg/mL lipidkoncentráció). Az (E) ábra a (D) ábra magasság képét szinkódoltan ábrázolja, míg a (F) ábra az (E) ábrán látható piros vonal magasság profilját ábrázolja. Az (E) és az (F) fehér és piros háromszögek a liposzóma klaszter legmagasabb pontjánál helyezkednek el. A jobb alsó sarokban lévő színsáv az (E) ábra magasságát kódolja.

Aggregáció kiválthatja a vezikula fúziót

Liposzómák precipitálása nem csak aggregációt, hanem nagyobb méretű fuzionált vezikulákat is eredményezhet. Az esetlegesen bekövetkező fúzió és a fúziós koncentráció küszöbértékének megállapításához, szükség volt az AS precipitáló hatásának megszüntetésére, így az AS különböző koncentrációjában (0,8–2 M AS) kicsapott liposzóma mintákat 15 perccel később átvittük megfelelő koncentrációjú AS oldatba (0,1 M).

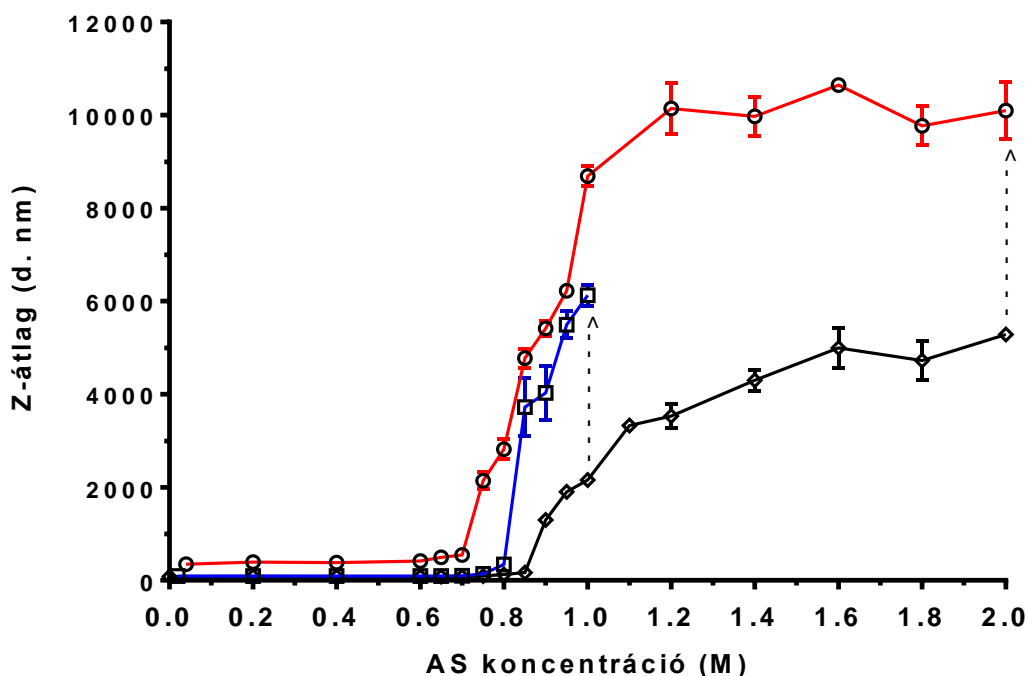


17. ábra (A) Különböző (X tengelyen feltüntetett) precipitáló AS koncentrációból visszahígított liposzómák mérete (Z-átlag \pm SD). Piros szaggatott vonal a kontroll liposzóma méretét mutatja. (B) Fiziológias só oldatban lévő liposzóma amplitúdó kontraszt AFM képe. (C) és (D), 1 és 2 M AS-ban aggregált, majd 0,1 M AS-ra visszahígított minta amplitúdó kontraszt AFM képe. A fehér háromszög egy nagyméretű vezikulát jelez a (C) ábrán. (D) ábrán néhány nagyméretű vezikula „felszakadt” a képalkotás során, ami kettősréteg foltokat eredményezett a felületen. Lipidkoncentráció a mintákban azonos volt (200x hígítás, 0,0795 mg/mL).

A DLS adatok átlagméretben nem mutattak számottevő különbséget 0,8 és 0,9 M precipitációs koncentrációban. 1 és 1,1 M-ban egy enyhe emelkedés volt megfigyelhető, míg 1,2 M-tól egy szignifikánsabb és monoton emelkedés volt látható (17. ábra). A minták AFM képei a fuzionált liposzómák megjelenését mutatták. A méret és a

fuzionált vezikulák viszonylagos mennyisége is emelkedett az AS koncentráció függvényében. A 1 M-nál az átlagosnál nagyobb liposzómák szórványosan jelentek meg (17. ábra), míg 2 M-nál már a nagyobb szabálytalan alakú vezikulák voltak a dominánsak (17. ábra).

A 18. ábra az 1 és 2M AS-ban precipitált minták fokozatosan visszahígított DLS eredményei láthatóak. 1 M AS koncentrációból visszahígított precipitált minta esetében 0,65 M-nál az átlagméret $93,9 \pm 1,9$ nm volt, ami a továbbiakban nem csökkent jelentősen (0,1 M AS: $92,0 \pm 2,6$ nm). Ez az érték egy kicsit nagyobb, mint a kontroll liposzóma ($83,2 \pm 2,2$ nm), ami azt sugallja, hogy az aggregáció többnyire reverzibilis volt és csak néhány vezikula fuzionált. 2 M-os minták esetében a 0,1 M-ra visszahígított minta átlagmérete ($346,0 \pm 48,7$ nm) sokkal nagyobb volt, mivel a vezikulák jelentős része fuzionálhatott (17. ábra).



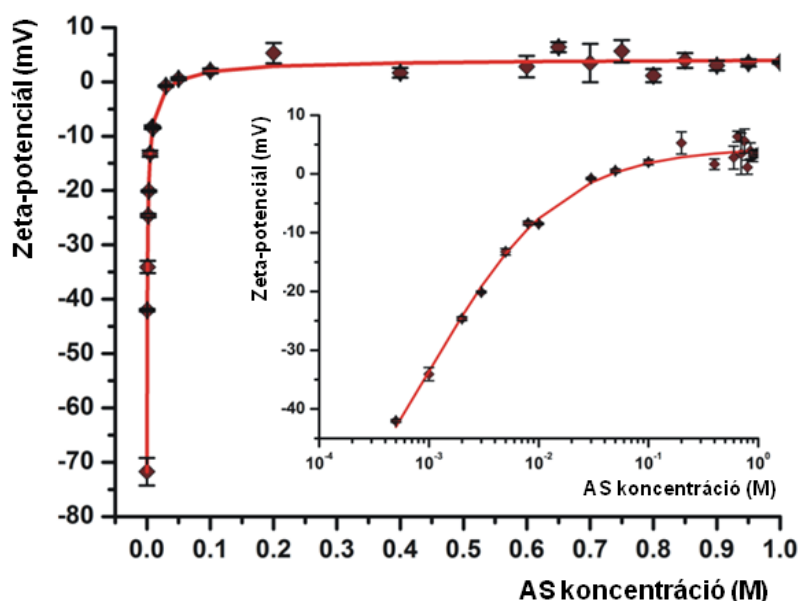
18. ábra Liposzóma szuszpenziók átlagos részecskemérete az 0-2 M AS koncentráció függvényében (fekete vonal). A négyzet (kék vonal) és kör (piros vonal) azokat a részecskeméreteket mutatja, ami 1, illetve 2 M AS-ban aggregálódott minták fokozatos hígítása során kapunk (50x hígítás, 0,318 mg/mL lipidkoncentráció).

Precipitáció nem a felületi töltés megváltozásának következménye

A kolloidális vezikulák fizikai stabilitása nagymértékben függ a felületi töltéssűrűségtől, ami az oldat és a vezikuláris felszínhez kötődő ionok vándorlása közötti elektromos potenciál különbséggel (vagy Zeta-potenciállal) közelíthető. Széles

körben elfogadott, hogy a 30 mV alatti Zeta-potenciál a kolloid diszperziókat aggregációra hajlamosítja teszi (263). Mivel a felületi töltés tulajdonságok és így a liposzómális vezikulák fizikai stabilitása ionok révén nagymértékben befolyásolható, a liposzómák Zeta-potenciáljának AS által történő módosítása kulcstényező lehet az aggregáció kialakulásához.

A kontroll minta Zeta-potenciál értéke $-71,7 \pm 2,5$ mV volt, ami egy erős negatív felszíni potenciált jelentett és egy rendkívül nagy kolloid stabilitásnak felelt meg (263). AS hozzáadása a Zeta-potenciál nagymértékű növekedéséhez vezetett, már viszonylag kis koncentrációban is (19. ábra). Az AS felületi töltés változtató hatásának maximumát 0,1 M koncentrációban érte el, amely majdnem egy nagyságrenddel kisebb, mint az aggregációs küszöbérték koncentráció (14. ábra).

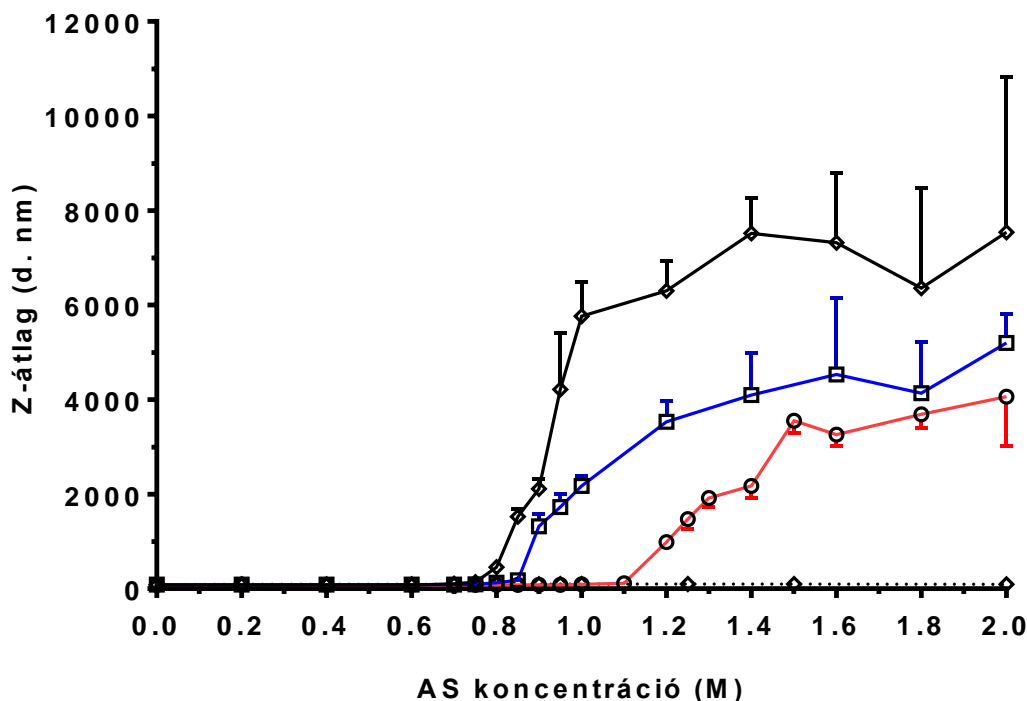


19. ábra PEGilált liposzómák Zeta-potenciálja AS koncentráció függvényében. A vörös vonal az adatokra illesztett Langmuir-Freundlich izoterma. Zeta-potenciál 3 különböző mérés átlag \pm SD értékei. Kontroll liposzóma (0 M AS koncentráció) Zeta-potenciálja $-71,7 \pm 2,53$ mV. A beágyazott ábra logaritmikusan (X tengely) ábrázolja az eredményeket (50x hígítás, 0,318 mg/mL lipidkoncentráció).

Precipitáció a PEG-gel kapcsolatos

A PEG láncok liposzóma aggregációjában játszott szerepének tisztázásához, különböző PEG mennyiséget tartalmazó liposzómákat kevertünk össze AS-tal. A DLS adatok azt mutatták, hogy a konvencionális (azaz PEG-et nem tartalmazó) liposzómák esetében nem volt méret növekedés 2 M AS-ban sem (20. ábra). A PEG tartalom

növelése (2-10%) a precipitációs görbét balra tolta el, ami azt jelenti, hogy az aggregáció előidézéséhez elegendő volt már az AS alacsonyabb koncentrációja is. Ez ismét alátámasztja, hogy a precipitáció a PEG-gel kapcsolatos jelenség. Figyelembe véve, hogy a felületi töltés módosítása nem befolyásolja a liposzóma aggregációt, feltételezhető, hogy a felszíni polimer láncok valamilyen szerkezeti átmenete kell, hogy szerepet játsszon az aggregációban.



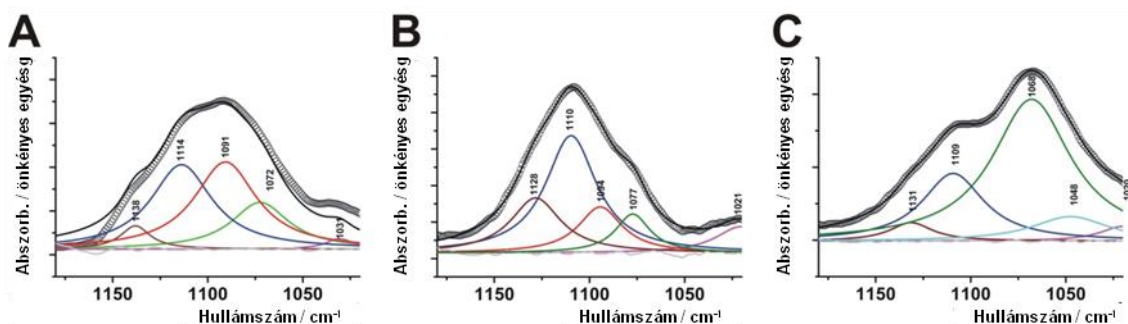
20. ábra PEG tartalom hatása az AS koncentrációfüggő liposzóma aggregációra. Hígítás: 50x (0,318 mg/mL lipidkoncentráció). Szaggatott vonal: 0% mPEG; piros vonal: 2% mPEG; kék vonal: 5% mPEG; fekete vonal: 10% mPEG.

AS dehidratálja a PEG láncokat

Mivel a precipitáció a PEG jelenlétéhez kapcsolódik, kézenfekvő, hogy az AS - amely egy kozmotróp szer (264, 265) -, dehidratálja a PEG polimereket, és így a PEG-gel fedett vezikulák aggregációját eredményezi hidrofób kölcsönhatások révén. A PEG réteg hidratációjának becslése az infravörös spektrumok alapján történt. Varga és mts-i egy módszert dolgoztak ki a lopakodó („stealth”) liposzómák PEG rétegének jellemzésére a PEG lánc C-O-C csoportjainak *trans-gauche* aránya alapján (266). A PEG lánc 1100 cm^{-1} körüli C-O-C rezgéséhez tartozó összetettsáv 5 sávkomponensre bontható fel. A 1093 cm^{-1} körüli sávkomponens a PEG C-O-C csoportjainak *trans*

konformációjával függ össze, míg a 1113 cm^{-1} körüli a *gauche* konformációhoz tartozik (267). A 1139 és 1029 cm^{-1} sávokat a $\delta(-\text{CH}_2-)$ deformációhoz és a $\nu(\text{C-C})$ nyújtórezgéshez lehet kapcsolni. A viszonylag intenzív 1068 cm^{-1} körüli sávkomponens a $\nu(\text{C-OH})$ csoportokhoz rendelhető. A PEG rész inter- és intramolekuláris H-kötésének változásával a C-O-C csoport *trans*, illetve *gauche* konformációja is megváltozik, így az infravörös spektrumokból meghatározott *trans-gauche* konformáció arány alkalmas marker lehet a PEG réteg szerkezetének és közvetett módon akár a hidratációs állapotának jellemzésére (266).

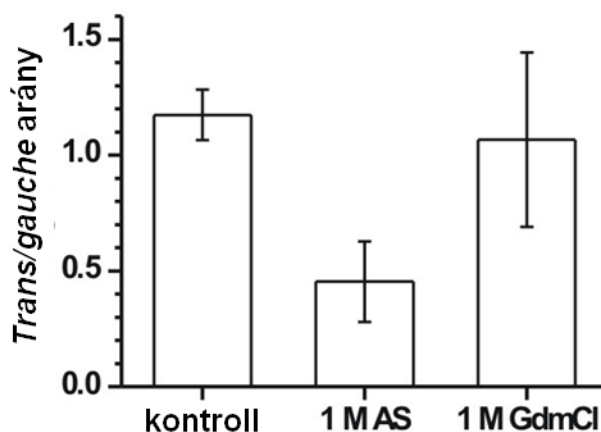
Az 1-2 tömegszázalékos koncentrációjú PEG liposzómák ATR-FTIR spektrumát az erős vízabszorpciós sávok uralják, így a spektrális értékelés első lépéseként a víz háttér kivonására (AS-oldat) volt szükség. Mivel a $\nu(\text{C-O-C})$ rezgő sávok átfednek a PL komponensek foszfát nyújtórezgéseivel (νPO_2^-), a tiszta HSPC (mint a PEGilált liposzóma fő összetevője) referencia spektrumát szintén kivontuk a PEGilált liposzóma spektrumából. A spektrális kivonás utáni 1100 cm^{-1} körüli sáv tipikus összetevői a 21. ábraán láthatóak.



21. ábra 1100 cm^{-1} körüli sávok összetevőire való felbomlása spektrális kivonás után: (A) PEGilált liposzómák vízben, (B) PEGilált liposzómák 1 M AS oldatban, (C) PEGilált liposzómák 2 M AS oldatban. Az üres körök a mért adatpontokat, a folytonos vonalak az illesztett spektrumot, az egyedi sávkomponenseket és a maradványokat mutatják.

Minél nagyobb a *trans* konformerek relatív intenzitása, annál magasabb a PEG réteg hidratáltsága. AS hozzáadásával (1 M koncentráció) a *gauche* konformációban a $\nu(\text{C-O-C})$ relatív intenzitása növekedett (22. ábra), jelezve, hogy a kozmotróp só csökkenti a PEG polimerláncok hidratáltságát. Magasabb AS koncentráció esetében (2 M) egy 1068 cm^{-1} -es sávösszetevő dominált a spektrumban. Ezt sávösszetevő a $\nu(\text{C-OH})$ csoportokhoz rendelhető. Érdekes, hogy $\nu(\text{C-O-C})$ *trans* komponenshez tartó sávösszetevőt nem tudtunk azonosítani. Hasonló jelenséget tapasztaltunk a tiszta DSPE-

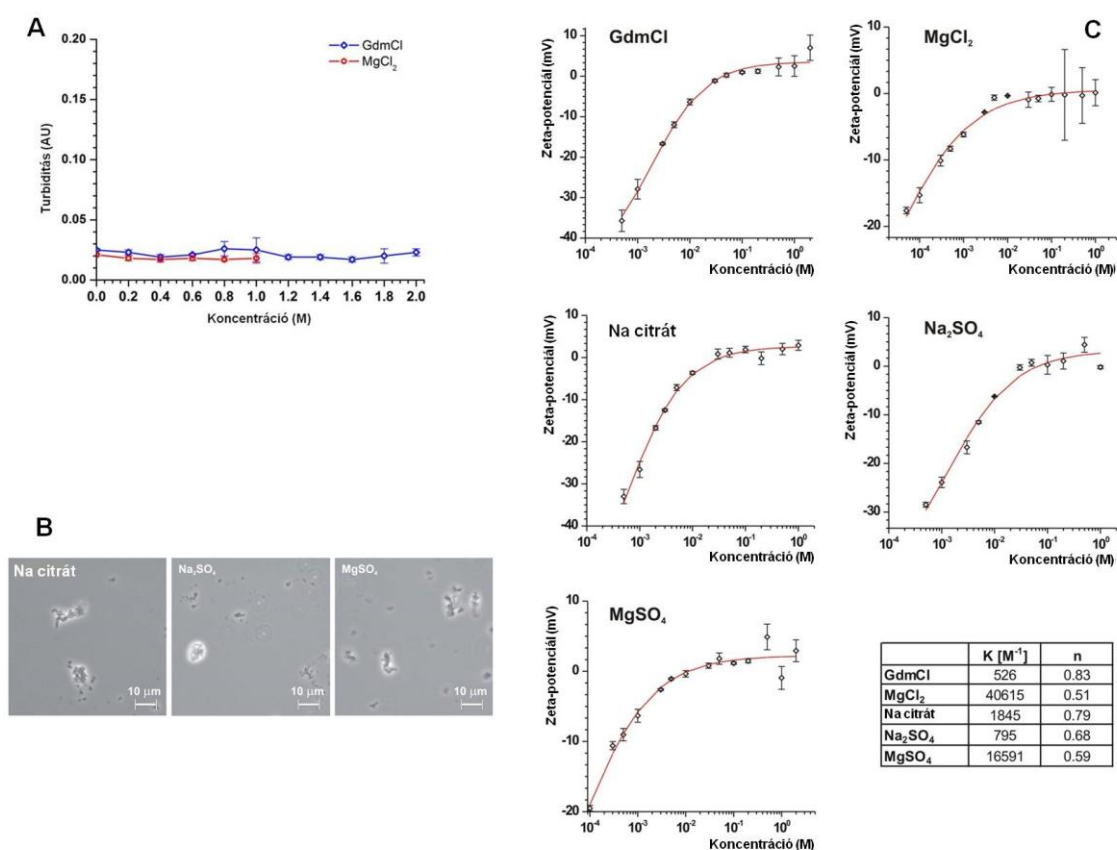
PEG2000 lipid (~10 tömeg%) vízben készült micella esetében is (nem mutatott eredmények).



22. ábra Sztérikusan stabilizált liposzómákat borító PEG láncok $\nu(\text{C-O-C})$ sávjának *trans/gauche* aránya vízben, 1 M AS-ban és 1 M guanidin-kloridban. Az eredmények 3 különböző független mérés átlag \pm SD értékei. A guanidin-klorid nagy szórását a háttér kivonásának bizonytalansága okozhatja.

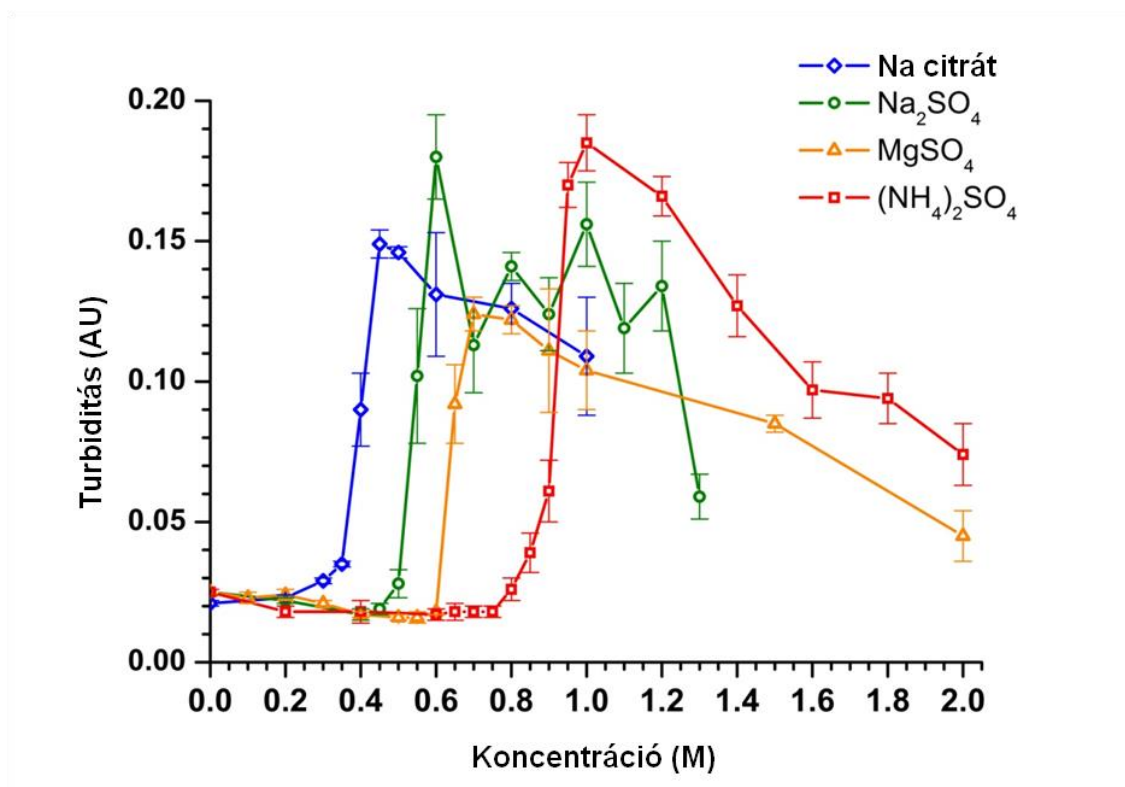
Más kozmotróp sók is kiválthatják a PEGilált liposzómák precipitációját

A liposzómák PEG-gel kapcsolatos precipitációja nem AS specifikus, hanem általános kozmotróp jelenség, ami különböző sók „lopakodó” liposzómákra való hatásával igazoltunk. Minden vizsgált kozmotróp só (nátrium-citrát, nátrium-szulfát, magnézium-szulfát) a vezikulák precipitációjához vezetett, míg a kaotróp sók (magnézium-klorid és guanidin-klorid) nem aggregálták a liposzómákat (23. ábra). A kozmotróp sók hatása koncentrációfüggő és az ionok a koncentrációs küszöbérték szerint sorrendbe állíthatóak: nátrium-citrát<nátrium-szulfát<magnézium-szulfát<ammónium-szulfát (24. ábra). Ez a sorrend jó egyezést mutat a korábban megfigyelt PEG-só-víz rendszerekben lévő ionok kétfázis képző képességével (268).



23. ábra (A) Liposzóma szuszpenziók turbiditása kaotróp sók koncentrációjának függvényében, guanidinium-klorid (GdmCl) és magnézium-klorid (MgCl₂) (50x hígítás, 0,318 mg/mL). (B) Liposzóma aggregátumok fáziskontraszt mikroszkóp képei nátrium-citrát, nátrium-szulfát (Na₂SO₄), magnézium-szulfát (MgSO₄) 1M koncentrációjában (200x hígítás, 0,0795 mg/mL). (C) PEGilált liposzómák Zeta-potenciál értéke különböző só koncentrációk függvényében. Piros vonal az adatokra illesztett Langmuir-Freundlich izotermát mutatja. Az illesztésekből kapott adszorpciós konstansokat (K) és a heterogenitási indexeket (n) a táblázat foglalja össze (50x hígítás, 0,318 mg/mL).

A kozmotróp sók felületi töltés módosító hatása sokkal alacsonyabb koncentrációban elérte a maximumot, mint ami az aggregációhoz szükséges (23. ábra), hasonlóan az AS esetében megfigyelteknél (19. ábra). Az ionok abszorpciós állandói nem voltak összefüggésben a precipitáló képességükkel. Nemcsak a kozmotróp, hanem a kaotróp sók is - amelyek nem aggregálták a PEGilált liposzómát – eltolták a liposzómák Zeta-potenciál erősen negatív értékét a neutrális tartományba (23. ábra).

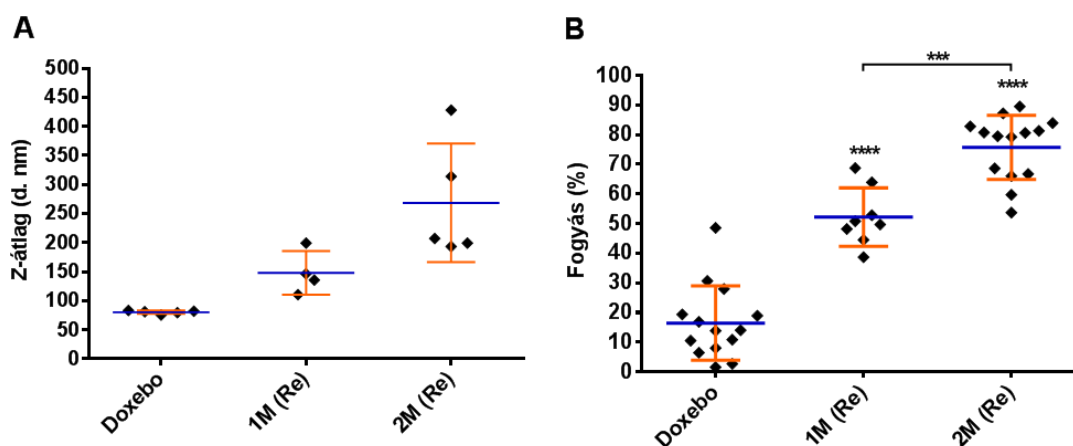


24. ábra Liposzóma szuszpenziók turbiditása a sókoncentráció függvényében. Az eredmények 3 különböző független mérés átlag \pm SD értékei. PEG koncentráció 5 mól% és a lipidkoncentráció 0,318 mg/mL (50x hígítás).

Rekonstituált liposzómák okozta komplement aktiváció

Az 1 és 2 M AS koncentrációban aggregált, majd fiziológiás sóoldatban felvett liposzómák indukálta C aktivációját BVVS teszttel állapítottuk. Ugyanazon liposzómából származó kontroll liposzómák - melyek nem voltak kezelve AS-tal - mérete $80,5\pm 3$ nm volt, míg az kezelt liposzómák átlagos részecskemérete $148,1\pm 37,4$ (1 M AS-ban), illetve $268,5\pm 102,2$ nm (2 M AS-ban) volt (25. ábra).

A 25. ábra a pufferrel kezelt NHS hemolíziséhez képest mutatja a 3 különböző liposzóma C fogyasztását százalékban, amiből a C aktivációra lehet következtetni. A kontroll és rekonstituált (kezelt) liposzómák okozta C aktiváció között szignifikáns különbség volt. A két különböző méretű és eltérő fuzionált vezikula mennyiséget tartalmazó liposzómák szintén szignifikáns különbséget mutattak.



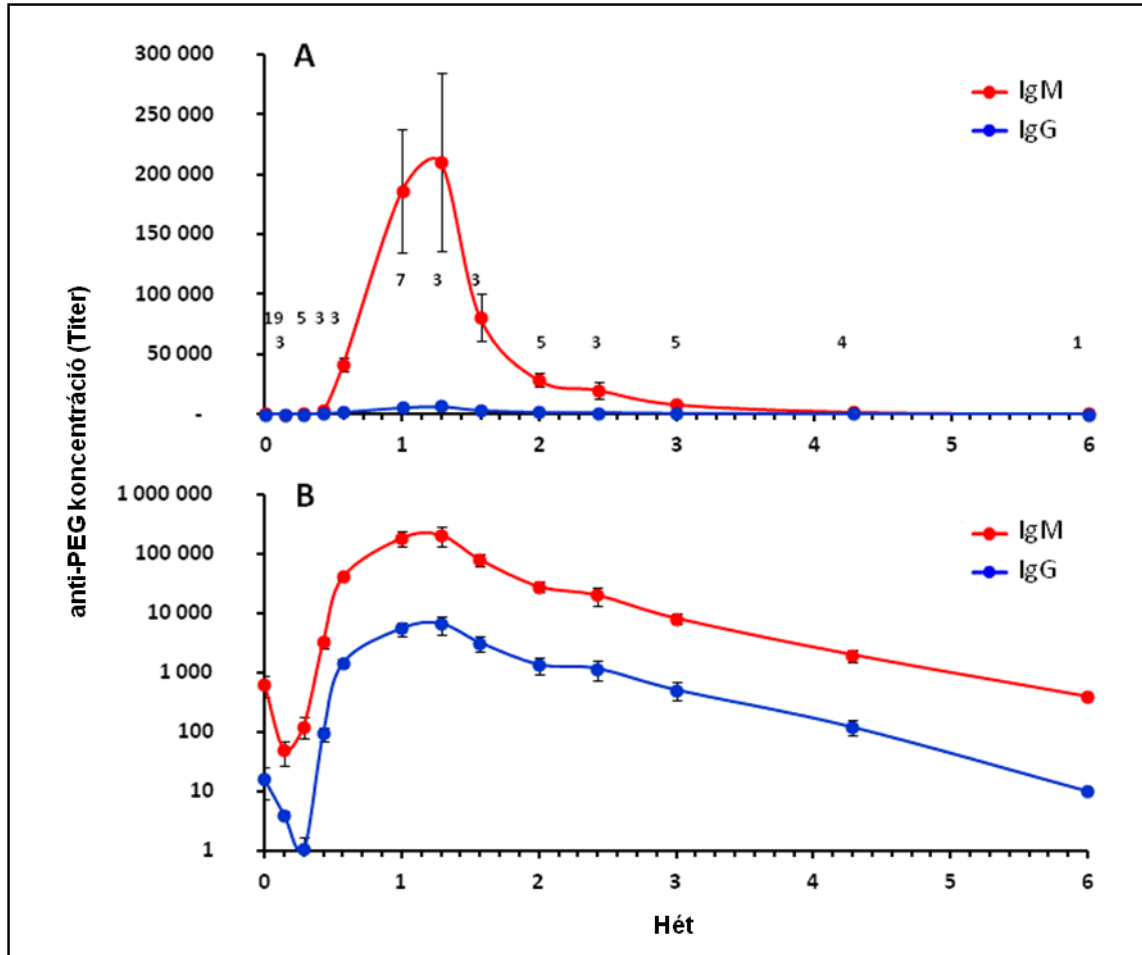
25. ábra Kontroll és 1 M, illetve 2 M AS-ban precipitált rekonstituált (Re) liposzómák mérete és komplement aktivációja. (A) BVVS tesztben használt 5 különböző liposzóma minta átlagos részecskeátmérője (Z-átlag). (B) Kezeletlen és kezelt (Re) liposzómák okozta komplement aktiváció BVVS tesztben. Adatok legalább 12 különböző NHS átlag \pm SD eredményeit mutatják. ***P<0,001, ****P<0,0001 (ANOVA; Tukey-teszt) Lipidkoncentráció 3,975 mg/mL (4x hígítás).

5.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban

A Doxebo T-sejt-független, 2. típusú immunogenitása

Sertések immunizálása Doxebo (0,1 mg PL/kg) i.v. dóziséval az anti-PEG IgM masszív, míg az anti-PEG IgG párhuzamos, de kisebb emelkedéséhez vezetett (26. ábra). Az A és B panel lineárisan és logaritmikusan mutatja a titereket, az alsó az Y tengely alsó régióit szemlélteti jobban. Az ellenanyag növekedés a kezelés utáni 3. napon kezdődött és a 7-9. napon érte el a csúcspontot, majd 4-6 hét után tért vissza kiindulási szinthez.

További fontos megfigyelés, hogy az anti-PEG IgM szintek 0 percnél nem voltak nullák, ami feltételezi a már meglévő (természetes) anti-PEG ellenanyagok jelenlétét (269, 270). A természetes anti-PEG IgM titerei a különböző állatokban jelentős változásokat mutattak (medián: 140, Q1: 82, Q3: 764, n=19), valamint az IgM 50-100-szor magasabb volt, mint az IgG (26. ábra). Még egy lényeges megfigyelés, hogy a Doxebo kezelés után a természetes ellenanyagok titerei az első két napon lecsökkentek a kiinduláshoz képest (26. ábra).

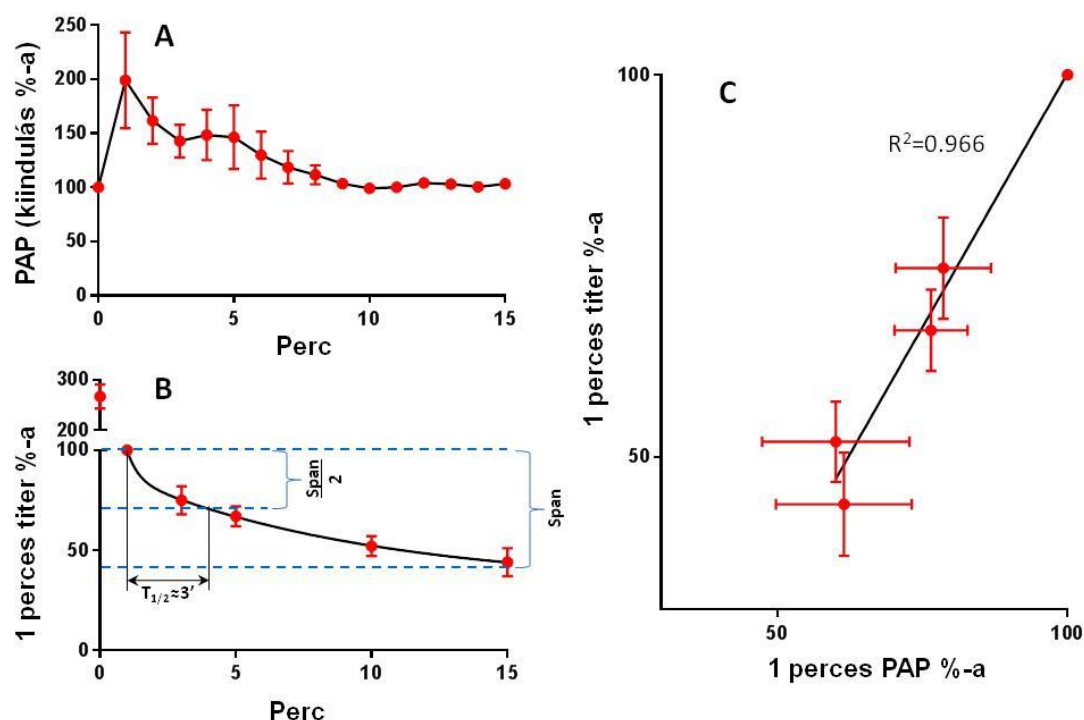


26. ábra Doxebo immunogenitása anti-PEG ellenanyag titer függvényében lineárisan (A) és logaritmikus (B) ábrázolásban. A hibásávok SEM-ben vannak feltüntetve, amelyek az A panel mindegyes időpontjaiban feltüntetett sertés (n) számából származnak. A kiindulási érték (n=19), az immunizált (n=12) és a nem immunizált (n=7) sertések számából adódik össze. Az ettől eltérő számokat a különböző időpontokban esetlegesen előforduló elhullások okozzák.

Anti-PEG IgM szerepe a Doxil indukálta túlérzékenységi reakciókban

Korábbi eredmények alapján sertésekben a Doxil okozta pulmonális hipertenzió - ami a gyógyszer i.v. beadása után percekben belül megtörténik -, a legérzékenyebb és legkvantitatívabb módszer a HSR mérésére (143). Annak érdekében, hogy ez a reakció korreláltható legyen az anti-PEG ellenanyag szintekkel, a liposzóma beadást követő percekben a PAP kezdeti változását figyeltük az anti-PEG IgM titerek függvényében nem szenzitizált állatokban. Korábbi eredményekkel összhangban (143), a Doxil injekciója a PAP enyhe (2-szeres) emelkedését eredményezte 2 percen belül, majd az értékek 10 percen belül visszaálltak a kiindulási szintre (27. ábra).

Az anti-PEG IgM titer esését kétfázisú exponenciális csökkenéssel lehetett jellemezni, ami egy gyorsabb és egy lassabb folyamatból tevődött össze. A csökkenésnek 2 oka lehet, az egyik hogy a liposzómákhoz kötődő antitestek kilépése a keringésből (clearance) *in vivo* felgyorsul, a másik pedig hogy a liposzómák kompetálnak az antitestek kötődésével a PEG antigénhez az ELISA mérés során, tehát a mátrixhatás. A két folyamat kinetikája különböző, és nem nehéz belátni, hogy a mátrixhatás az első percben dominál és a clearance-hez képest gyorsan szaturálódik, azaz eltűnik. Ennek megfelelően a gyorsabb fázis feltételezhetően a mátrixhatást tükrözi, míg a lassabb fázis a clearance-t, tehát a valódi titerváltozásokat. Ezen elméletnek megfelelően a kezelés előtti alapszinteket mutató 0. perces mintákat kihagytuk a Doxil/Doxebo kezelés utáni anti-PEG IgM rövid időtartalmú értékeléséből, és az 1 perces mintákat használtuk referencia pontként a változás követésére. Amint azt a 27. ábra mutatja, ebben az esetben az anti-PEG IgM szint egyfázisú exponenciális lecsengést mutatott ($R^2=0,989$), aminek a felezési ideje ~3 perc. Ez megfelel az liposzómák IgM-kötését követő C aktiválás és opszonizáció által kiváltott gyors RES felvétel kinetikájának (240). Az IgM kötődés kritikus, kauzális szerepének bizonyítékeként a PAP és IgM változása a perc skálán szignifikáns lineáris korrelációt mutatott ($R^2=0,966$, 27. ábra).

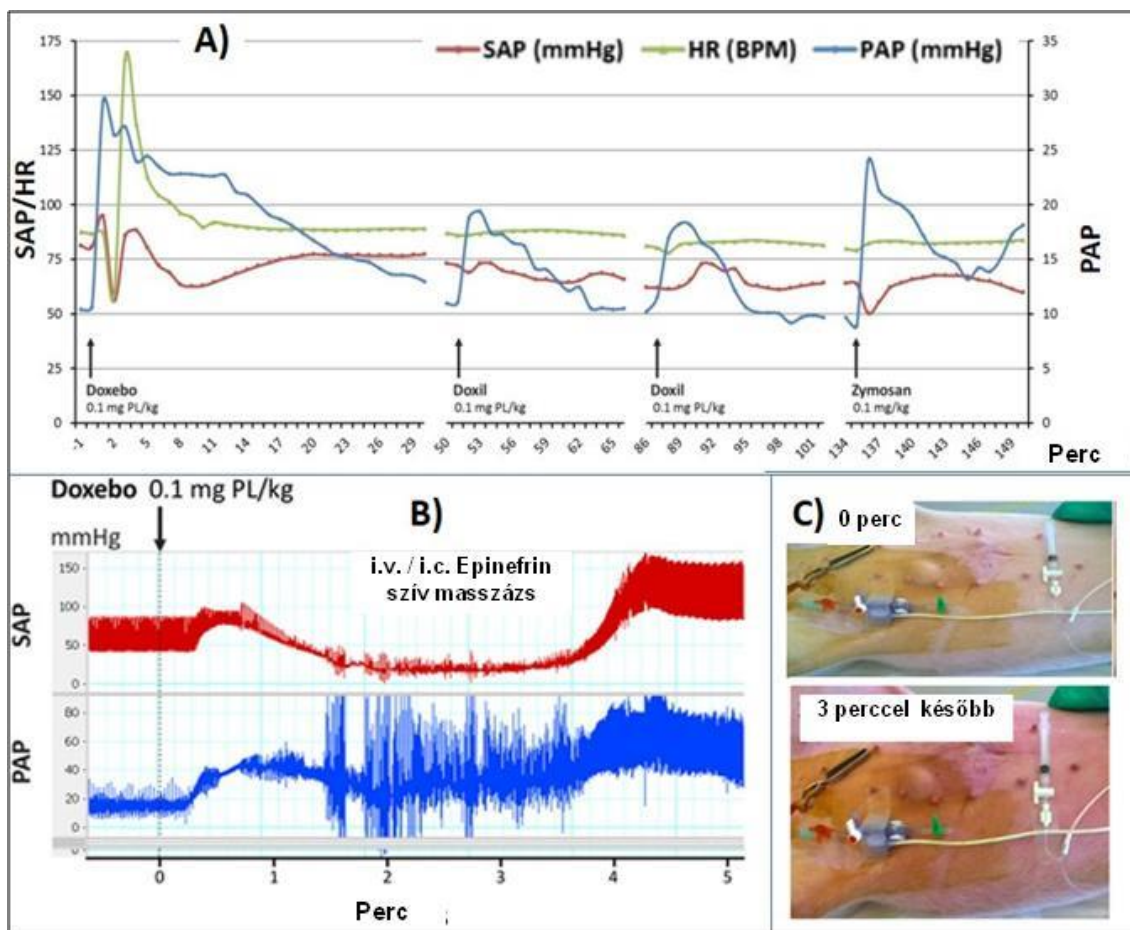


27. ábra Hemodinamikai változások és a plazma anti-PEG IgM szintek PEGilált liposzómákkal kezelt sertésekben. (A) Bólusban beadott 0,1 mg foszfolipid (PL)/kg Doxil injekció okozta pulmonális hipertenziók naív sertésekben. (B) Plazma anti-PEG IgM 1. perc %-a függvényében. A pontokra exponenciális görbe volt legjobban illeszthető, $R^2=0,989$. Span: Y0 és a plató közti különbség. (C) Doxil kiváltotta PAP (számolva az A panel értékeiből) és az anti-PEG IgM (B panel) változások közötti korreláció az 1. perc függvényében. Az adatok átlag \pm SEM eredményeit mutatják (n=5).

PEGilált liposzómák fokozott reaktogenitása Doxeboval immunizált sertésekben

Ebben a bekezdésben az anti-PEG IgM titerek és a Doxil/Doxebo indukálta HSR közötti összefüggést vizsgáltuk. A 28. ábraán a Doxebo és a Doxil sorozatos bólus injekciók által okozott hemodinamikai változások vannak feltüntetve a 4 héttel korábban Doxeboval immunizált sertésekben. A PAP válasz abszolút értékben és időtartamban is nagymértékben emelkedett a kontroll állatokhoz képest (27. ábra) és összhangban volt a szignifikáns SAP és pulzusszám változásokkal valamint a tachyphylaxis eltűnésével (azaz, az ismételt beadás szintén reakciót okoz). Mindazonáltal ez a reakció 5 sertés közül egy esetében relatíve „enyhe” volt a 4 másik immunizált sertés reakciójához képest, ahol megjelent a „szív anafilaxis” (271) (28. ábra), vagyis 2-3 percen belüli keringési összeomlás, amihez kardiopulmonális újjáélesztés kellett epinefrinnel és/vagy elektrokonverzióval a túlélés érdekében. A 28.

ábra a bőrkiütéseket mutatja ezekben az állatokban, amely a liposzóma beadás után 2-10 perc között tetőzött.

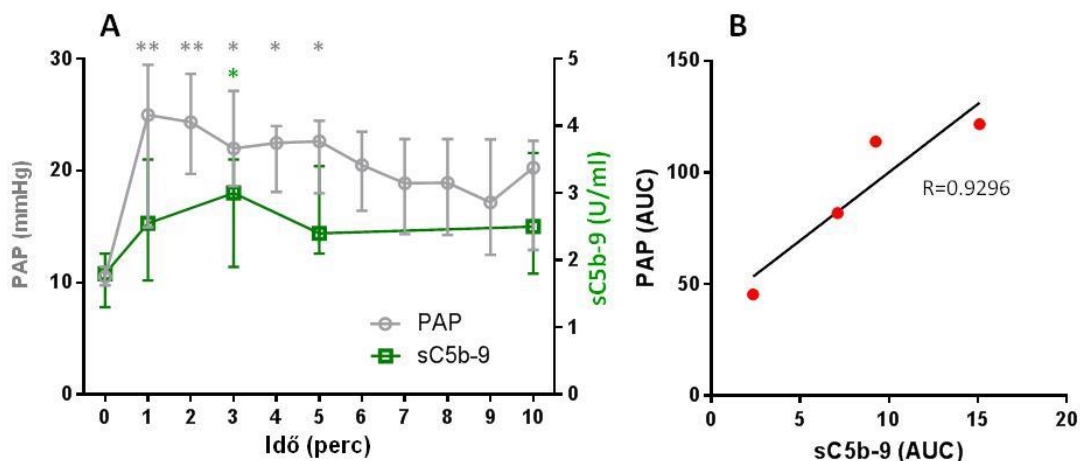


28. ábra PEGilált liposzómák reaktogenitása Doxeboval immunizált sertésekben. (A) Hemodinamikai változások az egyik állatban az 5 közül, amelyik súlyos, de nem halálos választ adott liposzóma ismételt injekcióira immunizáció után 4 héttel. (B) Súlyos anafilaktikus reakció egy másik immunizált sertésben, amely a további négy sertés immunizálás utáni 2-6 hetes intervallumban vizsgált reakcióit illusztrálja. A valós idejű hemodinamikai nyomok, a nagy kilengésű zajok egybeesnek az szívmasszázsos újraélesztéssel. (C) Bőr hasi régiója Doxebo beadás előtt és a Doxebo injekció után 3 perccel később, ahol összefolyó bőr kipirulás és kiütés látható.

Figyelembe véve az immunizált sertésekben az anti-PEG IgM és a túlérzékenységi reakció közötti dózis-hatás kapcsolatot – újraélesztéstől függetlenül –, az immunizált sertések HSR-e minőségileg súlyosak voltak (28. ábra) az 1. és 6. hét közötti anti-PEG IgM titertől függetlenül (26. ábra). Ezek alapján az anti-PEG IgM és a HSR közötti dózis-hatás kapcsolat egy viszonylag alacsony anti-PEG IgM szintnél platózott, aminek a pontos értéke még nem meghatározott.

Bizonyíték a komplement aktiváció szerepére immunizált sertések PEGilált liposzóma indukálta anafilaxisában

29. ábraán látható, hogy a Doxebo-indukálta PAP emelkedést sC5b-9 emelkedés kísérte, ami statisztikailag szignifikáns volt a kezelést követő 3. percben. Meg kell említeni, hogy bár a 29. ábra a Doxebo kezeléseket mutatja, ugyanezek a jelenségek a Doxil beadása után is tapasztalhatóak (adatok nem szerepelnek).



29. ábra PEGilált liposzómák indukálta komplement aktiváció (sC5b-9) és pulmonális hipertenzió (PAP) 4 vagy 6 héttel korábban Doxeboval immunizált sertésekben. (A) PAP (szürke) és a vele párhuzamos, azonos időpontbeli sC5b-9 (zöld) változások időbeli lefolyása i.v. Doxebot követően. Medián \pm IQR (n=4). Az értékek szignifikánsan különböztek a saját 0 perces értéküktől a PAP esetében 1-5 percig és az sC5b-9 esetében a 3. percnél (Friedman-teszt, Dunn próba, többszörös összehasonlító teszt). (B) Korreláció a PAP és az sC5b-9 görbe alatti területeinek (AUC) értékei között (Pearson korrelációs teszt, P=0,0704, R=0,9296).

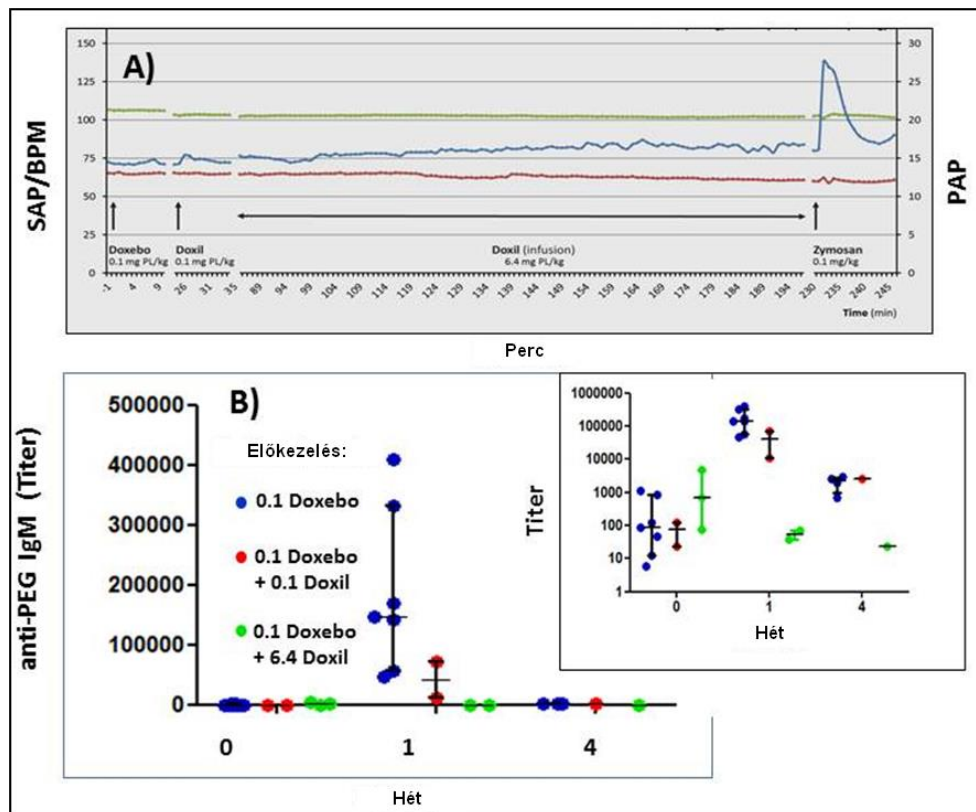
A PAP és az sC5b-9 közötti korrelációt az egymással szemben ábrázolt (csúcs) görbe alatti területek (AUC) függvényében is elemeztük (29. ábra). A korrelációs koefficiens magas (R=0,9296), ami a PAP és C aktiváció közötti erős összefüggésre utalt, míg a Pearson-korreláció teszt szerint (P=0,0704) a két változó közötti kapcsolat nem lehetett véletlenszerű mintavétel következménye. További fontos megfigyelés az immunizált malacokban, hogy az első Doxebo injekciót követő második hasonló dózisu vagy hasonló dózisu Doxilt lényegében azonos PAP és sC5b-9 változások követték (adatok nincsenek bemutatva).

PEGilált liposzómák anafilaktikus reaktivitásának gátlása Doxil előkezeléssel

Az előkezelés valójában Doxeboval való együtt kezelés volt, mivel a Doxebo immunizálás után azonnal a Doxil HED dózisének (6,4 mg PL/kg) sertés ekvivalens

mennyiségét adtuk be. Ez az előkezelés 4 héttel később megelőzte a liposzómára adott anafilaktikus választ és a Doxil teljes HED-je is biztonságosan beadható volt az állatba (30. ábra). Ezek mellett az erős C aktivátor Zymosanra jellemző reakció megmaradt.

Az anti-PEG IgM termelés specifikus szuppressziója mögötti hatást a 30. ábra mutatja. 30. ábraán az anti-PEG IgM szintek láthatóak 1 és 4 héttel a sertések Doxebo immunizálása után. A Doxil HED-je szuppressziót okozott (a kiinduláshoz képest kisebb értéket mutatott), míg a 0,1 mg PL/kg Doxil részleges védelmet nyújtott a Doxebo indukálta anti-PEG IgM termeléssel szemben (30. ábra).



30. ábra Doxil előkezelés gátló hatása a hemodinamikai változásokra és az anti-PEG IgM képződésre Doxeboval immunizált sertésekben. (A) PEGilált liposzómák által okozott hemodinamikai változások 4 héttel korábban Doxeboval és a Doxil HED-del együtt immunizált sertésekben. A görbék az átlag PAP (kék), az átlag SAP (piros) és pulzusszám (BPM, zöld) valós idejű változásait mutatják liposzóma beadást követően, melyek nyíllal vannak jelezve. (B) Anti-PEG IgM szintek kezelés előtt 1 és 4 héttel az immunizálást követően csak 0,1 mg PL/kg Doxeboval (kék), 0,1 mg PL/kg Doxebo és 0,1 mg PL/kg Doxillal (piros), illetve 0,1 mg PL/kg Doxebo és 6,4 mg PL/kg Doxillal (azaz HED, zöld) egyidejűleg kezelve. Kis ábra: ugyanazon adatok, mint a (B) panelen, csak logaritmikusan skálán.

A Doxil HED CARPA-val szembeni védő hatásának mennyiségi meghatározása során, a Doxebo+Doxil HED előkezelés után a PAP és SAP görbe alatti terület (AUC) a

csak Doxeboval immunizált állatokhoz képest átlagosan 30-szoros csökkenést mutatott, míg a naiv állatokhoz képest átlagosan 4-szer alacsonyabb volt (20. táblázat).

20. táblázat Bólusban beadott PEGilált liposzóma hemodinamikai hatásának összehasonlítása naiv, Doxebo és Doxebo + Doxil HED-del immunizált sertésekben.

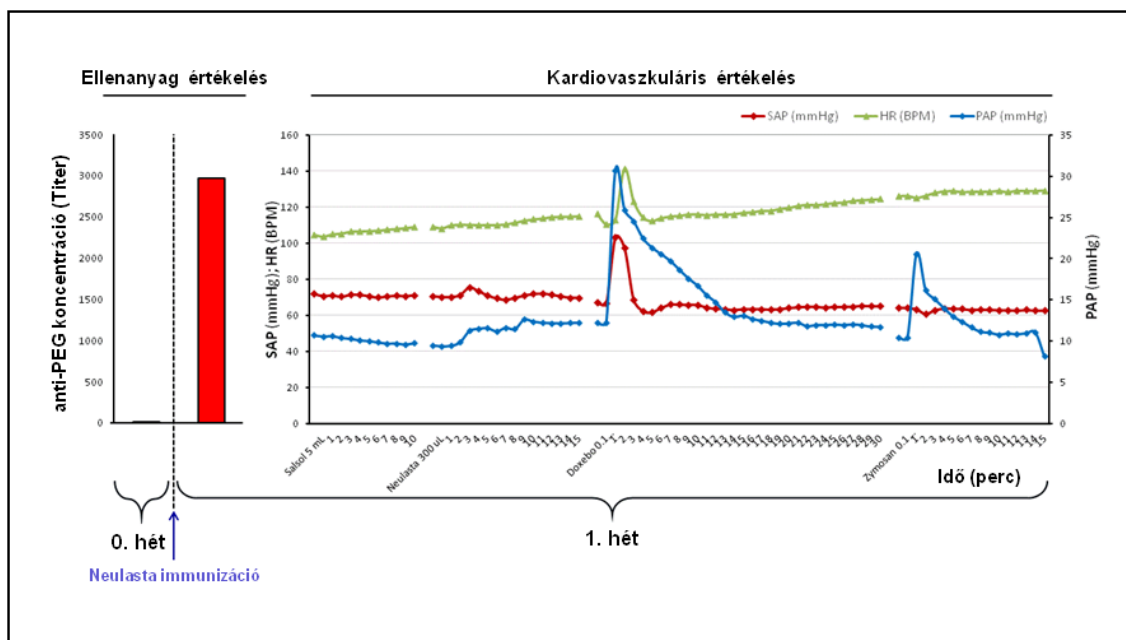
AUC: area under the curve, görbe alatti terület, HED: humán ekvivalens terápiás dózis. *Reakciót kiváltó liposzóma dózis: mg PL/kg; **Kalkuláció a módszerekben említve; §0,1 mg PL/kg; ¶6,4 mg PL/kg; „>” pontos érték nagyobb, mint a megadott érték, mivel a folyamatos sokk megzavarta a mérést.

Dózis*	Vérnyomás (AUC**)	Előkezelés								
		Nincs (naiv)			Doxebo§		Doxebo§+Doxil HED¶			
		Átlag	S.E.M.	n	Átlag	n	Átlag	S.E.M.	n	
0,1	PAP	36	15	6	>442	5	7	2	3	
	SAP	76	39		>492		11	6		
1,0	PAP	26	12		>202		1	16		
	SAP	25	5		>253			55		

Pegfilgrastim immunogenitása, ami keresztreakcióhoz vezet Doxillal

Felmerül a kérdés, hogy Doxebon kívül más PEGilált nanorészecske szintén maga után vonzza az anti-PEG IgM emelkedését? A kérdés megvizsgálásához egy rekombináns humán G-CSF fehérje és 20 kD PEG kovalens konjugátumot (272), a Pegfilgrastimot - vagy más néven Neulasta - használtuk, amely egy neutropénia elleni gyógyszer. Mint sok más PEGilált fehérje és nanorészecske esetében (269), erről is köztudott, hogy súlyos allergiás reakciókat, többek közt anafilaxist is okozhat (273, 274). Ezek közül némelyek egy héttel a kezelés után alakultak ki, ami az immunogenitásról tanúskodik.

3 sertést Doxebohoz hasonlóan Pegfilgrastimmal (0,174 mg/kg, amely így azonos molarányú PEG láncot tartalmazott) immunizáltuk, majd 1 héttel később a Pegfilgrastim és Doxebo reaktogenitását vizsgáltuk és anti-PEG IgM szintet mértünk. Egy héttel az immunizálás után a Pegfilgrastim anti-PEG IgM szignifikáns emelkedést eredményezett (31. ábra), miközben nem indukált a HSR-t, ellenben a Doxeboval szembeni hemodinamikai reakciók viszonylag erősek a naiv állatokban látottakhoz képest.



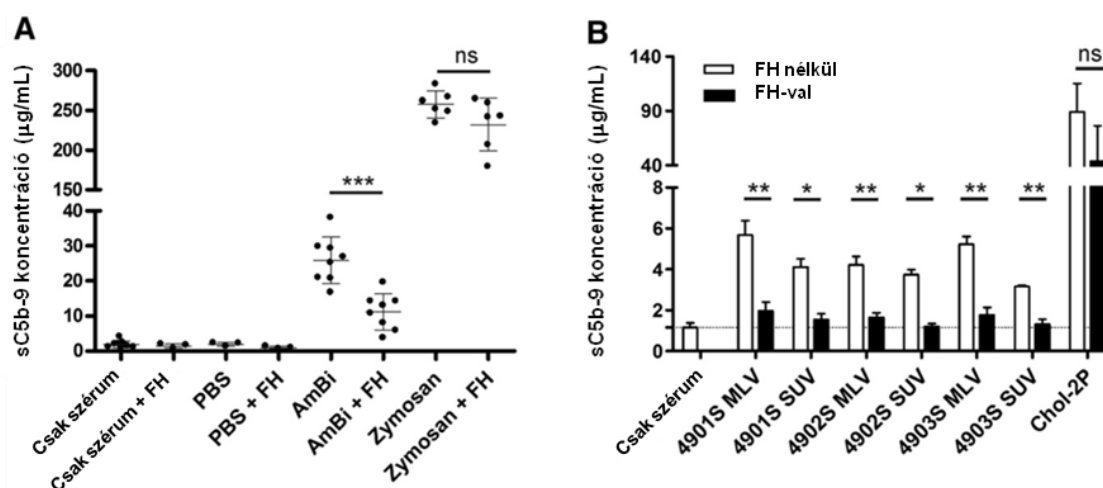
31. ábra Pegfilgrastim (Neulasta) hatása az anti-PEG antitest szintre és reaktogenitás Pegfilgrastimra és Doxebora egy héttel később. Hasonló kísérlet, mint a Doxebo immunizáció és az azt követő anti-PEG IgM titer és hemodinamikai reaktogenitás esetében, kivéve, hogy 0,174 mg Pegfilgrastim/kg (ekvivalens 0,1 mg PL/kg Doxeboval PEG mólok tekintetében) i.v. infúzióval volt immunizálva az állat, majd egy héttel később Pegfilgrastim mellett Doxebot és Zymosant is kapott.

5.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktorról

A FH és a mini-FH gátolta az AmBisome és CrEL indukálta komplement aktivációt

A FH liposzóma indukált C aktiváció gátló hatékonyságának megállapítása során NHS-t aktiváltunk AmBisome-mal exogén FH jelenlétében és FH nélkül. A hozzáadott FH koncentrációja 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($\sim 1,3 \mu\text{M}$) volt, ami a szérumban elve meglévő FH miatt, megközelítőleg duplája a fiziológias FH koncentrációnak. A C aktiváció mértékét sC5b-9 mérésével detektáltuk, mivel ez egy meglehetősen stabil végtermék, így megbízhatóan mérhető és a C5a-val párhuzamosan keletkezik, ami szerepet játszik a CARPAgén hatásban. Negatív kontrollként szérumot vagy puffert használtunk, amivel a kiindulási szintet állapítottuk meg. AmBisome hozzáadása szignifikánsan megemelte az sC5b-9 szintet, míg exogén FH hozzáadása szignifikánsan csökkentette az AmBisome C aktiváló hatását (32. ábra). Pozitív kontrollként egy élesztő sejtfal származékot, a Zymosant is használtunk, amely egy közismert C aktivátor. A vizsgált körülmények

között a FH jelenlétében csak kicsi, de nem szignifikáns mértékben gátolta a Zymosan által kiváltott C aktivációt (32. ábra).

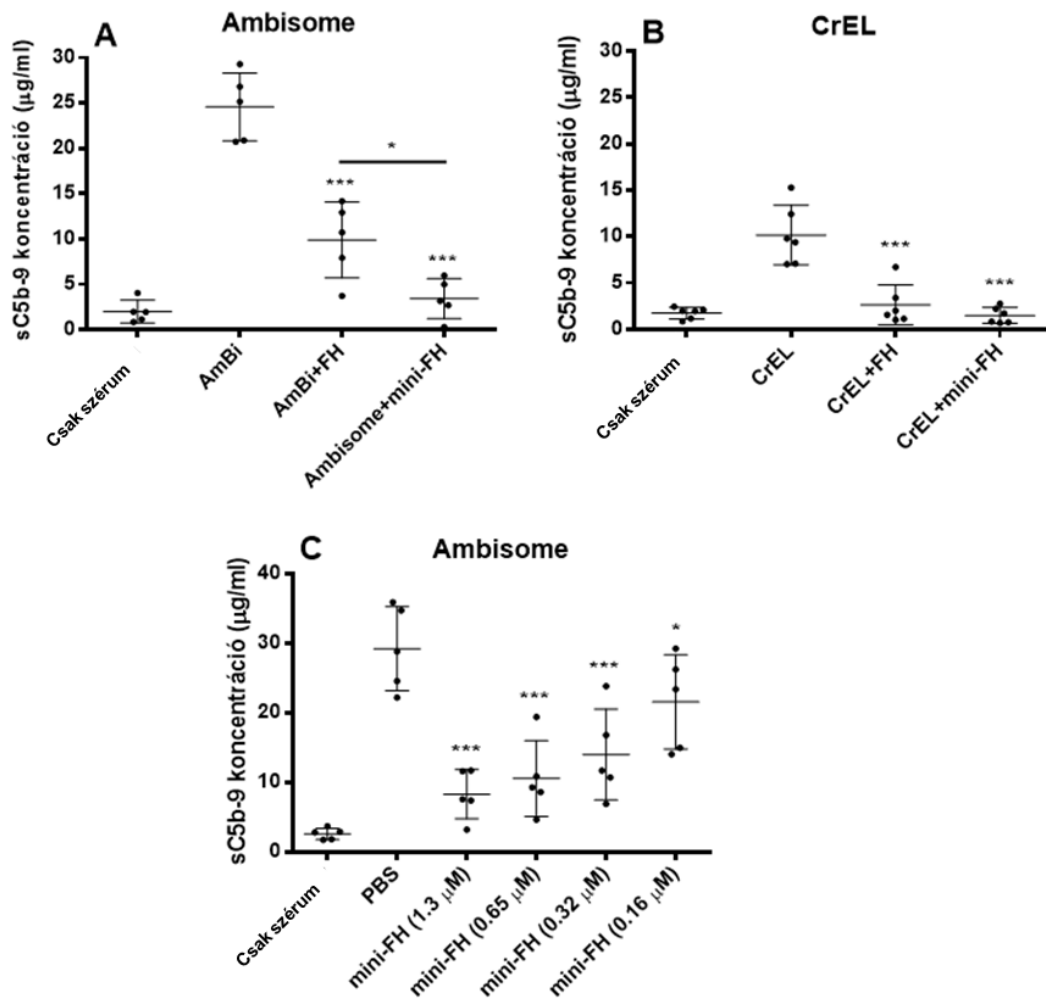


32. ábra (A) H-faktor (FH) gátolta AmBisome által indukált komplement aktivációt. A komplement aktivációt normál humán szérumban mértük a képződött sC5b-9 meghatározása révén. Pozitív kontrollként Zymosant használtunk 0,3 mg/mL végkoncentrációban). Az AmBisome (AmBi) megközelítőleg 8-szoros sC5b-9 emelkedést okozott. 200 µg/mL (1,3 µM) exogén FH hozzáadása a liposzóma indukált komplement aktiváció kb. 50%-os gátlását okozta. A FH kismértékben, de nem szignifikánsan gátolta a Zymosan indukált komplement aktivációt is. (B) Különböző összetételű liposzómák (18. táblázat), különböző mértékű komplement aktivációt okoztak NHS-ban. A mérések során a hozzáadott FH végkoncentrációja 1,3 µM. Chol-2P: koleszterinhez rögzített mPEG2000-t tartalmazó liposzóma (275). Az adatok legalább 3 mérés átlagát±SEM eredményeit mutatják. ns: nem szignifikáns, *P<0,05, **P<0,01 és ***P<0,001 (Student-féle t-próba).

Liposzóma indukált C aktiváció FH általi gátlását háromféle, különböző mPEG tartalmú MLV és SUV liposzóma (18. táblázat) esetében is megvizsgáltuk. Habár az egyes eltérő liposzómák különböző mértékű sC5b-9 emelkedést okoztak, 1,3 µM koncentrációjú FH mindegyik esetben a háttér szintre csökkentette az sC5b-9 értékét. Ennek oka, hogy a liposzómák kisebb mértékben aktiválták a komplementet, mint az AmBisome (32. ábra).

A mini-FH, a FH N-terminális C regulátor doménjeiből (CCPs 1-4) és a C-terminális C3b- és polianion kötő doménekéből (CCPs 19-20) szintetikusán előállított C inhibitor (3. ábra) (30). A mini-FH az AmBisome indukálta C aktivációt szintén gátolta, azonban hatása a FH-nál sokkal erőteljesebb volt (33. ábra). Ehhez hasonlóan a CrEL micellák okozta C aktivációt is gátolta a FH és a mini-FH (33. ábra). Az inhibitor gátló hatása dózisfüggő volt és a gátlás mértéke azt mutatta, hogy a mini-FH (0,65 µM) kb.

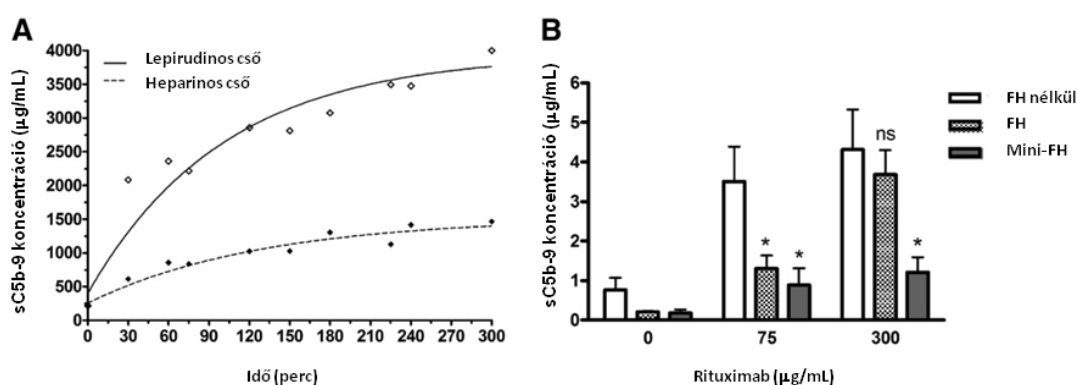
fele akkora mennyisége képes volt ugyanolyan gátlást okozni, mint a FH (1,3 μM) (33. ábra).



33. ábra Mini-H-faktor (mini-FH) erőteljesebben gátolta a gyógyszer okozta komplement aktivációt, mint a teljes hosszúságú, natív FH. A komplement aktiváció öt (A), illetve hat (B) NHS-ban mértük meg sC5b-9 ELISA kittel. Az AmBisome (AmBi) és a Cremophor EL (CrEL) is szignifikáns sC5b-9 emelkedést okozott. 1,3 μM exogén FH hozzáadása szignifikánsan csökkentette az aktivációt. A FH rekombináns, módosított formája, a mini-FH, amely a fő komplement inhibitor doméneket (CCP 1-4) és a felszín felismerő doméneket (CCP 19-20) tartalmazta, erőteljesebben gátolta az sC5b-9 képződést, mint a FH. A mini-FH koncentrációja szintén 1,3 μM volt. „Csak szérum”: nincs AmBi/CrEL hozzáadva. Adatok az átlag \pm SEM eredményeit mutatják. * $P < 0,05$ és *** $P < 0,001$ (ANOVA). (C) NHS-hoz AmBi és PBS vagy növekvő koncentrációjú mini-FH (0,16-1,3 μM) volt hozzáadva. „Csak szérum”: nincs AmBi hozzáadva. Adatok az átlag \pm SEM eredményeit mutatják. * $P < 0,05$ és *** $P < 0,001$ (ANOVA).

A FH és a mini-FH gátolta az *in vitro* Rituximab indukálta komplement aktivációt

Betegek jelentős hányadában a terápiás ellenanyagok mellékhatásokat okoznak, annak ellenére, hogy a premedikáció már létezik (147, 212). Rituximab egy széles körben alkalmazott CD20 ellenes monoklonális ellenanyag, amely C aktivációt okoz alvadásgáttolt teljes vérben. A C aktiváció mértéke különbözött a véralvadás gátlásához alkalmazott Lepirudin, illetve Heparin esetében (34. ábra). FH gátolta a Rituximab indukált C aktivációt Lepirudinnal alvadásgáttolt teljes vérben, de csak a kisebb koncentrációjú (75 $\mu\text{g/mL}$) Rituximab esetében. Ezzel szemben a mini-FH a nagyobb, 300 $\mu\text{g/mL}$ koncentrációjú Rituximab okozta C aktivációt is gátolta (34. ábra).



34. ábra H-faktor (FH) és mini-FH gátolta a Rituximab indukálta komplement aktivációt. (A) Rituximab indukált komplement aktiváció teljes vérben. A mérések három különböző donor eredményeit mutatják. 300 $\mu\text{g/mL}$ Rituximabot Lepirudinos csőben levett teljes vérhez adtuk hozzá; a véralvadásgáttó szer nem zavarta a komplement aktivációt. Az sC5b-9 mennyiségének emelkedése a Heparinos csőben levett mintákban is megfigyelhető volt. Lepirudinos csőben levett mintákban szignifikánsan magasabb sC5b-9 koncentrációk mérhetők a Heparinos csőben levett mintákhoz képest ($P=0,0002$, Student-féle t-próba). (B) A feltüntetett koncentrációjú Rituximab Lepirudinos teljes vérben sC5b-9 emelkedést okozott, amit 1,3 μM koncentrációjú FH és mini-FH gátolt. Az adatok a három donor esetében mért értékek átlagát \pm SEM mutatják. ns: nem szignifikáns, * $P<0,05$ (ANOVA).

5.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásban

PS-NP-k és a liposzómák fizikai-kémiai jellemzőik

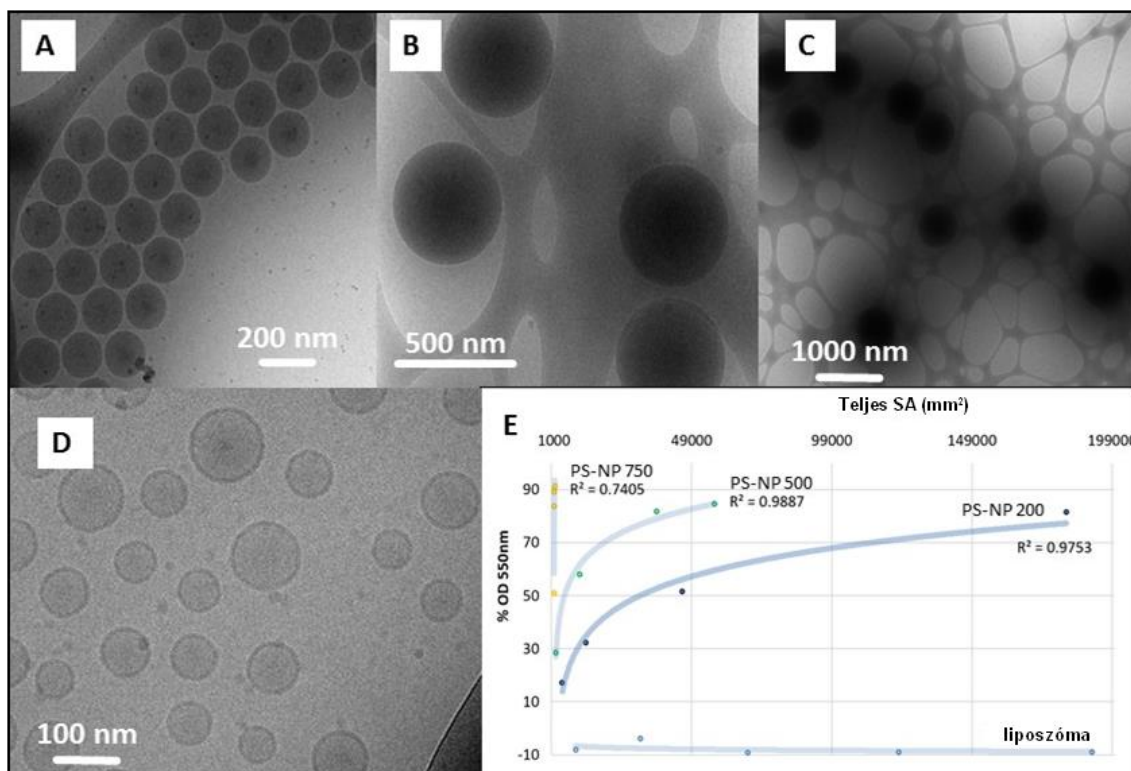
A 21. táblázatban látható, hogy a PS-NP diszperziók és a liposzómák egységes és viszonylag keskeny méreteloszlásúak voltak. A PS-NP-k erős negatív töltéssel rendelkeztek, az alacsony és a magas ionerősség esetében is (276). A liposzómák nagy ionerősség mellett gyakorlatilag semlegesek voltak, ami az alacsony ionerősségnél mért $-17,9\pm 1,4$ mV-hoz képest töltetlen állapotnak tekinthető.

21. táblázat PS-NP és kontroll liposzómák fizikai-kémiai paramétereit.

Polybead® (karboxilált mikrogyöngyök). SPAN: eloszlás szélessége. *Zp (Zeta-potenciál): mérése alacsony (1,5 mM NaNO₃) és magas konduktivitáson (150 mM NaNO₃). **PS-NP-k/mL száma a gyártó által megadott. A liposzóma mérése a „Módszerek” részben vannak leírva.

	Z-átlag (d.nm)	SPAN	Zp* (mV) alacsony konduktivitáson	Zp* (mV) magas konduktivitáson	részecske/mL**
Polybead® 0,75µm	791±23,5	0,74±0,08	-56,1±0,81	-16,5±0,81	1,08E+11
Polybead® 0,5 µm	545,1±6,3	0,70±0,03	-56,3±1,5	-32,8±3,15	3,64E+11
Polybead® 0,2 µm	194,3±3,3	0,69±0,04	-43,5±0,81	-28,6±2,84	5,68E+12
PEGilált liposzóma	132,3±1,3	0,83±0,02	-17,9±1,4	-3,6±0,67	9,04E+12

A PS nanorészecskékről készült Cryo-TEM képek sűrű fekete gömböket mutattak, melyek átmérői hasonlóak voltak a 200, 500 és 750 nm-es PS-NP-k gyártó által megadott értékeivel (250) (35. ábra). A kontrollként használt PEGilált liposzómák fekete gyűrű alakúak voltak (35. ábra). A foszfolipidmembránok és a vízfázis közötti Rose Bengal-eloszlás mérését gyógyszerészeti vizsgálatokban alkalmazzák, annak érdekében, hogy meghatározzák, a nanorészecskék gyógyszer szállító molekulájának felszíni hidrofóbicitását (255). A teszt azon az elven működik, hogy a festék adszorpció szintje per felszín (SA – surface area) közvetlenül arányos a felszíni hidrofóbicitással. Minél nagyobb a hidrofóbicitás, annál nagyobb az adszorpció. Az 35. ábraán látható, hogy a 200 és 500 nm-es PS-NP esetében a görbe logaritmikus, míg a 750 nm-es gyöngyöknél, a festék több mint 90%-a nagyon alacsony koncentrációban adszorbeálódott. A PEGilált liposzómák egyáltalán nem adszorbeálták a festéket. Az OD₅₅₀/SA egység arányos volt a NP mérettel, a platózás pedig a kötés telítettségét sugallja.

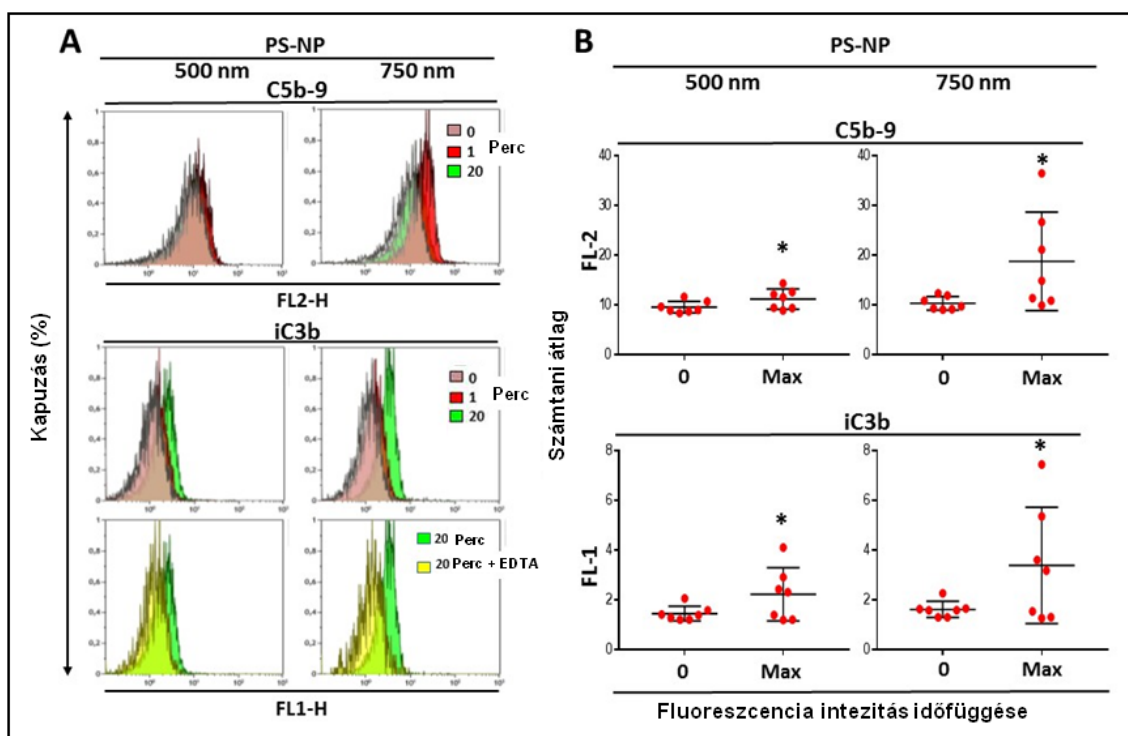


35. ábra Polybead® PS-NP-k Cryo-TEM direkt képe. Az (A), (B), (C), és (D) panel a 200, 500, 750 nm-es gyöngyöket és a liposzómákat mutatja egyenként. (E): Rose Bengal adszorpciójával értékelt PS-NP felszíni hidrofóbicitás. Az ábrán megadott PS-NP-k OD változásának számolása: $\% \text{OD}_{550} = \frac{\text{OD}_{\text{részecske}} - \text{OD}_{\text{kontroll}}}{\text{OD}_{\text{részecske}}}$. R^2 a logaritmikus illesztésre utal. SA: felszín

PS nanorészecskék komplement aktiválása a sertés szérumban: C5b-9 és iC3b lerakódás FACS bizonyítékai

A 36. ábraán látható FACS hisztogramok a C5b-9 (terminális komplex) és az iC3b kötődését mutatják 500 és 750 nm-es PS nanorészecskékhez, amit a kapuzott PS-NP-k megnövekedett fluoreszcenciája mutat 1 és 20 perc után. Az 500 nm-es PS-NP-hez való C5b-9 kötődés kivételével, 7-ből 4 sertés szérumban mindenhol növekedés volt megfigyelhető. A 36. ábra azt mutatja, hogy a maximális változások a kiindulási értékhez képest szignifikánsak voltak ($P < 0,05$), azonban nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy nem minden szérumban volt megfigyelhető a pozitivitás, ami arra utal, hogy C aktiváció és a lerakódás egyedi változatosságot mutatott. A vizsgált sertés szérumokról általánosságban elmondható, hogy az iC3b csúcs később jelent meg, mint a C5b-9 neoepitóp, ami megegyezik a C aktivációs melléktermékek képződésének kinetikájával. Az utóbbi bizonyítja a C5b és így a C5a képződést, míg a C3 bomlása révén keletkező iC3b megjelenése az opszonizációra nyújt bizonyítékot. A 750 nm-es

PS-NP-k esetében ezek a C aktivációs markerek határozottabban jelentek meg, és ez a különbség a többi kísérletekben is visszaköszönt (lásd alább). Érdeemes megjegyezni, hogy a 200 nm-es gyöngyöket nem teszteltük, mivel a FACS készülék – amivel a mérések készültek – számára nem voltak láthatóak.

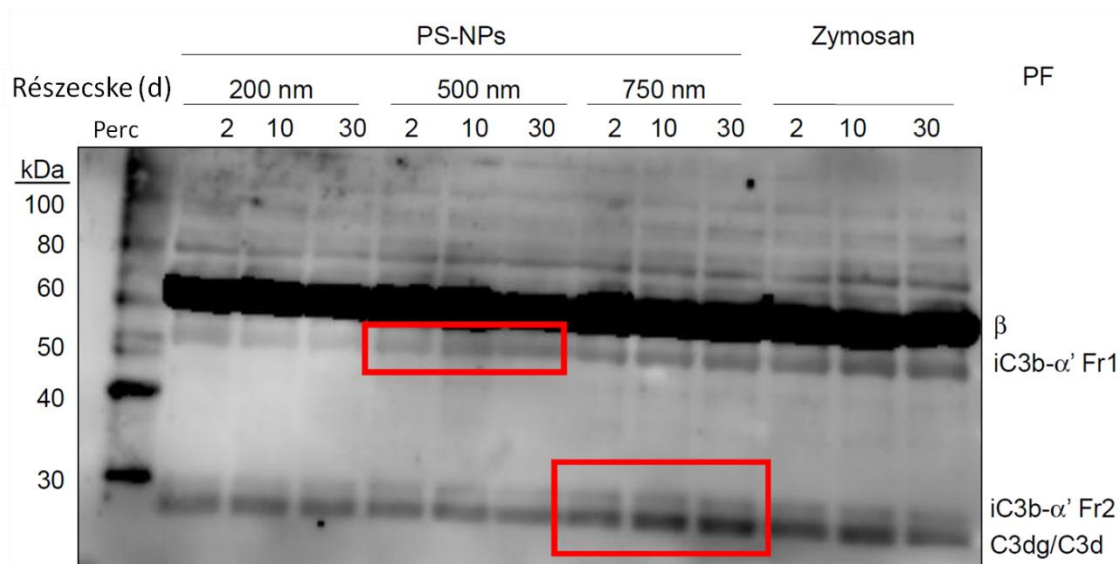


36. ábra PS nanorészecskéken lerakódó terminális komplex (C5b-9) és iC3b képződés FACS analízise inkubáció különböző időpontjaiban (perc) egy kiválasztott (A) és a 7 (B) sertés szérumban. (A) A histogramok a gyöngyök (500 és 750 nm) fluoreszcencia intenzitását mutatják 0, 1 és 20 percnél. A festés anti-C9neo (aE11) (detektálás: FL2) és anti-iC3b (7C12)-FITC-cel (detektálás: FL1) történt. „20 perc+EDTA” minta esetében az inkubáció során 20 mM EDTA is jelen volt. (B) A gyöngyök fluoreszcencia értékeinek (maximum és 0 időpontban) átlaga és szórása inkubálása után 7 sertés szérumban. Az inkubálást megelőzően az 500 és 750 nm-es PS-NP-k egyenlő felszíni mennyiségben voltak összekeverve (lásd a „Módszerek” c. fejezetben); azonosításuk FL2 és SSC jelek révén történt a FACS analízis során. Nulla időpontban csak az alap fluoreszcencia jel volt megfigyelhető hasonlóan az EDTA-val együtt aktivált mintákhoz és azokhoz, amelyek csak másodlagos antitesttel voltak megfestve. * minden esetben a statisztikailag szignifikáns különbségeket mutatja 0 és a „Max” értékek között (páros T-teszt).

Western blot bizonyítékok a PS nanorészecskék opsonizálására sertés szérumba

A PS nanorészecskékkel történő inkubálás utáni C3 immunokémiai analízise 60-70 kDa alatti sávok gyors időfüggő képződését mutatta az 500 és 750 nm NP-k esetében. Humán adatok alapján (277, 278) teoretikusan a nagyobbik csík az iC3b- α '1 fragmentje (37. ábra felső piros keret), míg a kisebbik az iC3b- α '2 fragmentje, a C3dg vagy a C3d

lehet (37. ábra alsó piros keret). Ezek a hasított termékek két perc után időfüggő felhalmozódást mutattak. A 37. ábra a 41. ábraával összhangban az $\alpha'2/C3dg/C3d$ képződés leginkább a 750 nm-es NP-k hatására alakult ki. Érdekes módon a 750 nm-es PS-NP hatása hasonló volt, mint ami a Zymosannál látható, míg a 200 nm-es PS-NP-k esetében nem volt látható C3 átalakulás.

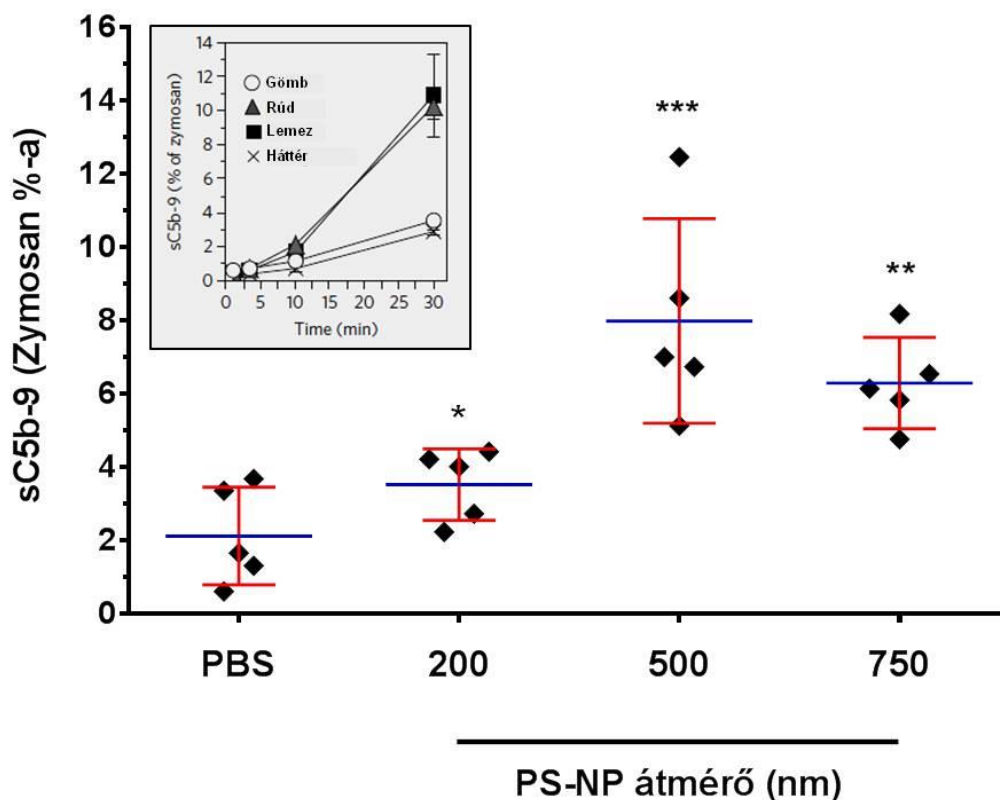


37. ábra C3 proteolitikus termékek sertés szérum PS nanorészecskével történő inkubálása után. Baloldalon a molekulatömeg markerek, jobb oldalon a teoretikusan beazonosított proteolitikus fragmentek láthatóak. A C3 fragmenteket SDS-PAGE-val választottuk szét, majd Western Blot után nyúlban termelt poliklonális anti-sertés C3 ellenanyaggal (immunizálás C3 peptiddel (aa23-300)) festettük. A piros keretezett részben a sertés C3 hasítási termékei láthatóak, amelyek 2 perc után időfüggő felhalmozódást mutattak. A felső (500 nm) és az alsó (750 nm) bekeretezett részek a humán iC3b- α' fragment 1 ($\alpha'1$) és 2 ($\alpha'2$)/C3dg/ C3d-nek felelhet meg. A 0. perces minta, amely csak kisebb spontán proteolízist mutatott, egy külön membránon volt tesztelve. A fragmentek relatív elektroforetikus mobilitásuk révén teoretikusan voltak beazonosítva humán szérumból/plazmából származó adatok alapján (277, 278). További részletek az „Módszerek” részben vannak leírva.

PS nanorészecskék okozta komplement aktiváció normál humán szérumban: dózis, időfüggés és aktivációs útvonalak

Az 500 és 750 nm-es PS nanorészecskék szignifikáns sC5b-9 emelkedést mutattak a PBS kontroll mintához képest (38. ábra), míg a 200 nm-es részecskéknek csak egy kicsi, jelentéktelen hatásuk volt, ami inkább csak tendenciát mutatott. Ezek az eredmények összhangban vannak, más ebben a témában publikált adatokkal (240, 279) és éles ellentétben állnak az ugyanilyen feltételek melletti PS-NP-k aktiváció hiányával

sertés szérumban (38. ábraán a kis mellékelt ábra), ahol 500 nm-es PS nanorészecskéket vizsgáltak (240).

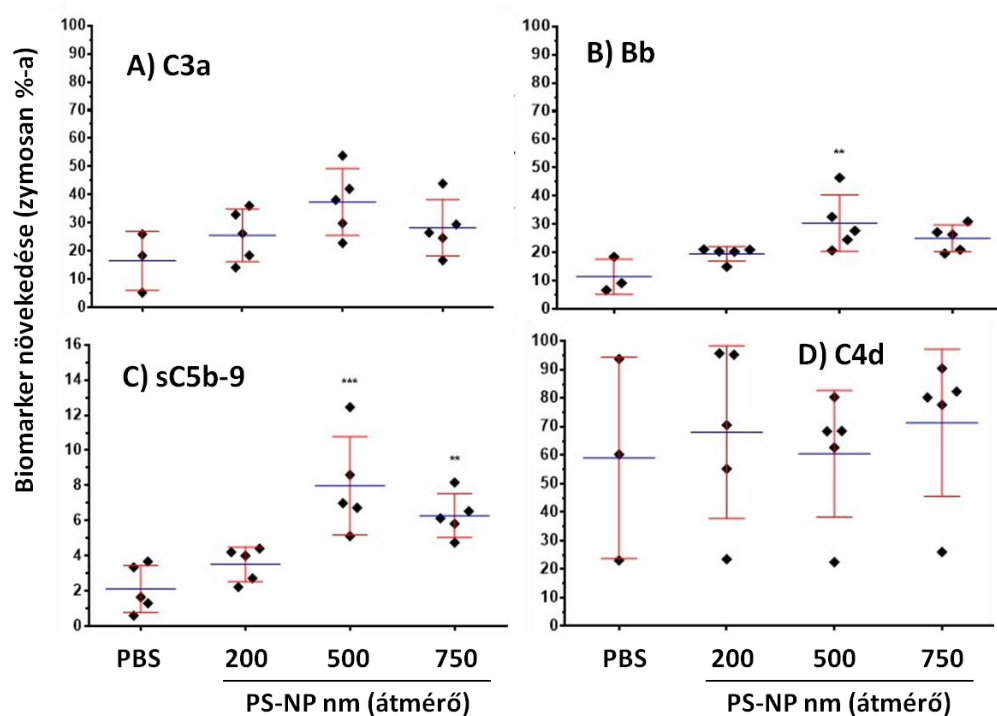


38. ábra Különböző PS-NP-k okozta komplement aktiváció humán szérumban Zymosan (0,3 mg/mL) százaléklában kifejezve. A részecskeszám úgy volt beállítva, hogy felület egyenlő legyen (72,5 cm²/mL szérumban), a nanorészecskék 45 percig voltak inkubálva 37°C-on normál humán szérumban, ami után az sC5b-9 koncentráció ELISA kitél volt mérve. Az értékek (n=5) átlag±SD-ben vannak ábrázolva. P értékek egyutas ANOVA-val voltak meghatározva (Tukey-teszt). ***: P<0,001 (0,5 vs. PBS); **: P<0,01 (0,75 vs. PBS) és *: P<0,05 (0,5 vs. 0,2). A mellékábra Wibroe és mts-i (240) által közölt cikk 2A. ábrája, ami a különböző PS-NP-k időfüggő komplement aktivációját mutatja sertés teljes vérben, a Zymosan által kiváltott sC5b-9 képződés százaléklában kifejezve. A PS-NP-k különböző formájúak (gömb, rúd és lemez). Felületük ~145 cm²/mL vér mennyiségben voltak meghatározva. Az értékek (n=3) átlag±SD-ben vannak ábrázolva. 10 és a 30 perces értékek szignifikánsan különböztek az alapértéktől, kivéve a gömbformákat (jelölés: nyitott kör). A kísérlet további részletei Wibroe, PP. és mts-i által közölt cikkben találhatóak meg (240).

Az 39. ábra a 200, 500 és 750 nm-es PS nanorészecskék hatásait mutatja (teljes felszín egyenlő) különböző humán szérumban (n=3 és 5) 45 perc inkubációs idő után. A-D panelek, 4 különböző C termék (C3a, Bb, sC5b-9 és C4d) szintjeit mutatják egyenként. A 38. ábraához hasonlóan az 500 és 750 nm-es részecskék C3a és Bb

esetében is sC5b-9-hez hasonló emelkedést mutattak. C4d tekintetében nem volt látható változás.

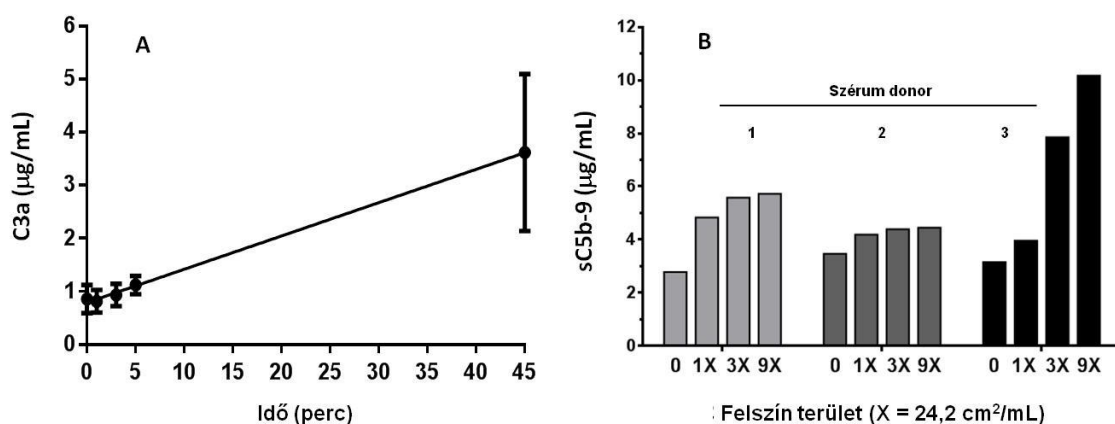
A 39. ábraán a C aktiválás, mint a Zymosan százalékában megadott kifejezés még egy következtést tesz lehetővé, a PS-NP-k okozta C aktiváció viszonylag gyenge volt a Zymosan hatásához képest (legalábbis a vizsgált körülmények között). A C3a és Bb esetében a Zymosan erősségéhez képest maximum 10-40% volt a végpont, míg az sC5b-9-nél ez kevesebb, mint 10% volt. C4d esetében az emelkedések nem különböztek szignifikánsan a Zymosan okozta dózisoktól, ami összhangban van azzal ténnyel, hogy a Zymosan elsősorban alternatív útvonal aktivátor.



39. ábra Különböző C aktivációs markerek válaszai a PS-NP indukálta C aktiválódásra NHS-ben: NP méretétől való függés. Az A-D panelek a C3a, Bb, sC5b-9 és C4d emelkedéseit mutatják be egyenként 3 különböző méretű PS-NP-vel (72,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ szérumban) történő inkubálás után (45 perc, 37°C). Az értékek (n=5) $\bar{x} \pm \text{SD}$ -ben vannak ábrázolva, kivéve a PBS-t (n=3). P értékek egyutas ANOVA-val voltak meghatározva (Tukey-teszt). ***: $P < 0,001$; **: $P < 0,01$.

Normál humán szérumban a PS-NP okozta C aktiváció minél alaposabb megismerése érdekében, az 500 nm-es NP kiváltotta C3a változásokat vizsgáltuk az inkubációs idő függvényében. Habár az alacsony értékek megnehezítették a C aktiváció kezdeti kinetikájának nyomon követését, az adatokra illesztett lineáris regressziós egyenes azt sugallja (40. ábra), hogy a C aktiválás szinte azonnal - percekben belül -

megkezdődött. A B ábra az sC5b-9 képződést mutatja az 500 nm-es NP 3 különböző dózisának ($24,2 \text{ cm}^2/\text{mL}$ és többszöröseinek) függvényében. Háromból két szérumban már legkisebb dózis is maximális hatás váltott ki, míg a harmadik szérumban – valószínűleg az egyedi különbségekből adódó C3-konvertáz és terminális komplex (C5b-9) képződés miatt – ezt a telítettséget nem érte el.

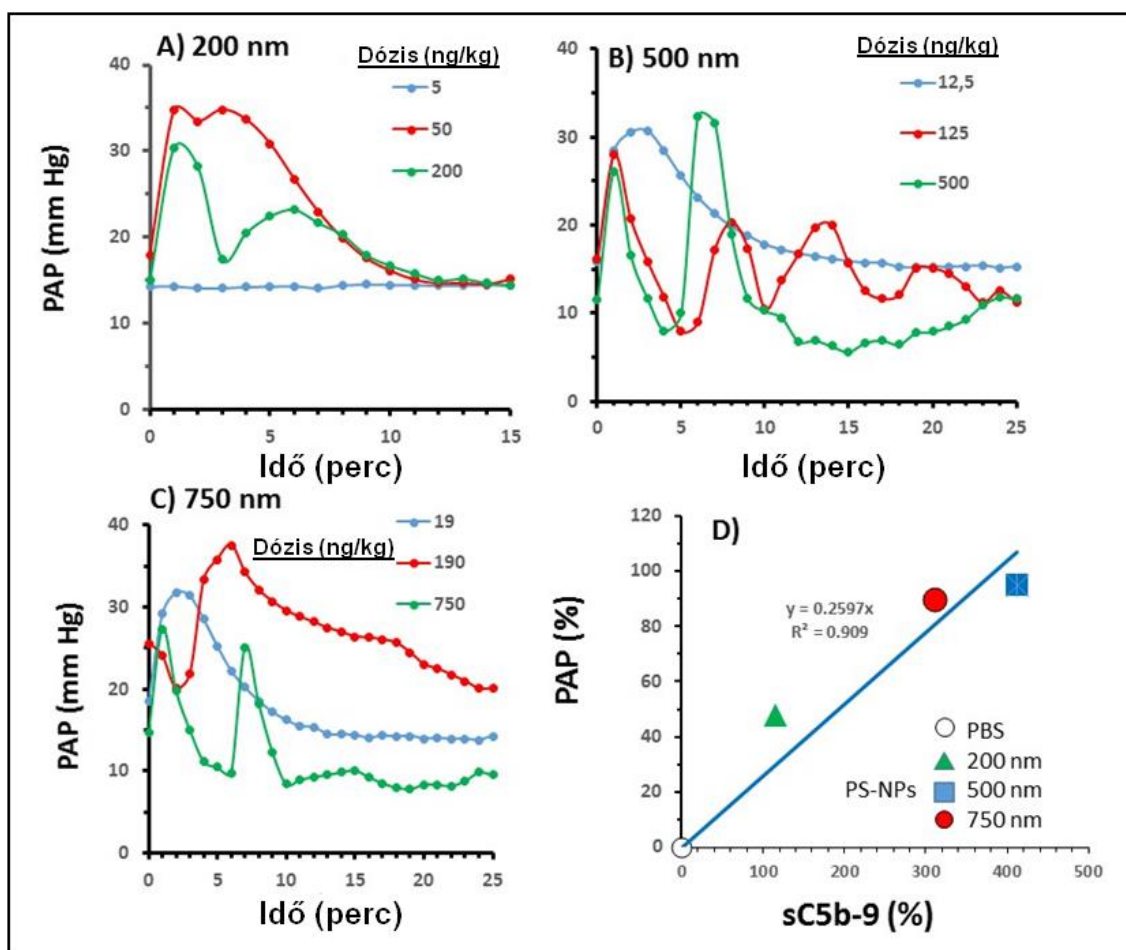


40. ábra 500 nm-es PS-NP okozta komplement aktiváció idő (A) és dózis (B) függése 3 különböző normál humán szérumban. (A) PS-NP felszíne $218,1 \text{ cm}^2/\text{mL}$ szérumban volt; C3a koncentráció időpontoként 3 szérumban átlag±SD eredményeit mutatják. A lineáris regressziós egyenes: $R^2=0,7852$, $P<0,0001$. (B) $24,2 \text{ cm}^2/\text{mL}$ szérumban PS-NP és többszöröseinek ($72,7$ és $218,1 \text{ cm}^2/\text{mL}$ szérumban) 3 különböző humán szérumban 45 perc 37°C -on történő inkubálás utáni sC5b-9 szintjei.

Humán komplement aktiváció és sertések pulmonális vazoaktivitása közötti összefüggés

Az eddigi sertés és humán *in vitro* eredmények mind az mutatták, hogy a vérben megjelenő PS-NP-k azonnal aktiválják a komplementet. Ezek összhangban voltak a sertés pulmonális reakció időbeli lefolyásával, ami percekben belül megtörtént, azonban egy specifikus és teljesen hatásos C inhibitor hiányában, nincs megfelelő bizonyíték az okozati összefüggésre. Ennek hiányában kézenfekvő megoldás, a különböző PS nanorészecskéket kapott sertések *in vivo* pulmonális reakciói és az *in vitro* C aktiváció közötti korreláció vizsgálata. Mivel a FACS és a Western blot-ot tesztek nem olyan mértékben kvantitatívak, mint az ELISA tesztek, és mivel a rendelkezésre álló C melléktermékek sertés ELISA-i korábban ellentmondó adatokat mutattak (240), a 38. ábraán bemutatott humán adatokat használtuk fel a korrelációhoz. A sertésekben különböző dózisú (dózisonként egyenlő felületű) 200, 500 és 750 nm-es PS-NP-k

beadása után, a PAP változásokat követtük. Ezeket a változásokat a kiindulási értékhez viszonyított %-os változásként vagy az egyes kísérletekben meghatározott görbe alatti területként határoztuk meg, amiket aztán az alapvonalai értékhez viszonyított %-os változásként kifejezett humán sC5b-9 értékekkel korreláltattuk.



41. ábra PAP változásai sertésekben ($n=5$), 3 különböző (színekelt), de dózisonként egyenlő felületű 200 (A), 500 (B) és 750 nm-es (C) PS-NP-k beadása után. A felület ekvivalens dózis minden részecske esetében ng PS-NP/kg sertés testsúlyban vannak feltüntetve. (D) Komplement aktiváció (humán szérumban) és a különböző PS-NP-k pulmonális hipertenzív hatása közötti összefüggés. Mindkét változó %-ban kifejezve, számolása: $(\Delta_{\max} / \text{alapvonal} \times 100) - 100$, ahol a „ Δ_{\max} ” jelenti a maximális sC5b-9 és PAP választ a reakció csúcánál. A szimbólumok a különböző nanorészecskéket mutatják. A korreláció szignifikanciája $P=0,033$ (Pearson $r=0,9667$).

A PS-NP okozta pulmonális hipertenzió dinamikus tartományának megállapításához, először a PAP növekedés NP dóziszfüggését vizsgáltuk 200, 500 és 750 nm-es PS nanorészecskék (alkalmazott összefelszín azonos volt) 3 különböző dózisának beadása révén (41. ábra). A 200 nm-es nanorészecske legkisebb dózisa nem

okozott PAP változást, míg az azonos felszínű 500 és 750 nm-es PS-NP-k masszív pulmonális hipertenzióhoz vezettek. Ezek a megfigyelések egybeesnek az *in vitro* megfigyelésekkel, az ugyanezen nanorészecskék okozta a C aktivációval, az opszonizációval és az iC3b proteolízisével (36. ábra, 37. ábra és 38. ábra). A 41. ábra azt is mutatják, hogy bár mindhárom nanorészecske 10 és 40-szer nagyobb dózisa jelentős pulmonális nyomásváltozást okozott, mégis úgy tűnik, hogy PS-NP-k pulmonális hipertenzív hatásának dinamikus ablaka, egy NP méretfüggő alacsony küszöbértékű dózistartományban volt: <50 ng/kg (200 nm), <12,5 ng/kg (500 nm) és <19 ng/kg (750 nm).

22. táblázat A különböző NP-k egyenlő felszíni dózisa okozta maximális PAP növekedés sertésekben és humán szérumban ugyanezen nanorészecskék egyenlő felszíni dózisa okozta sC5b-9 emelkedés közötti átfedés.

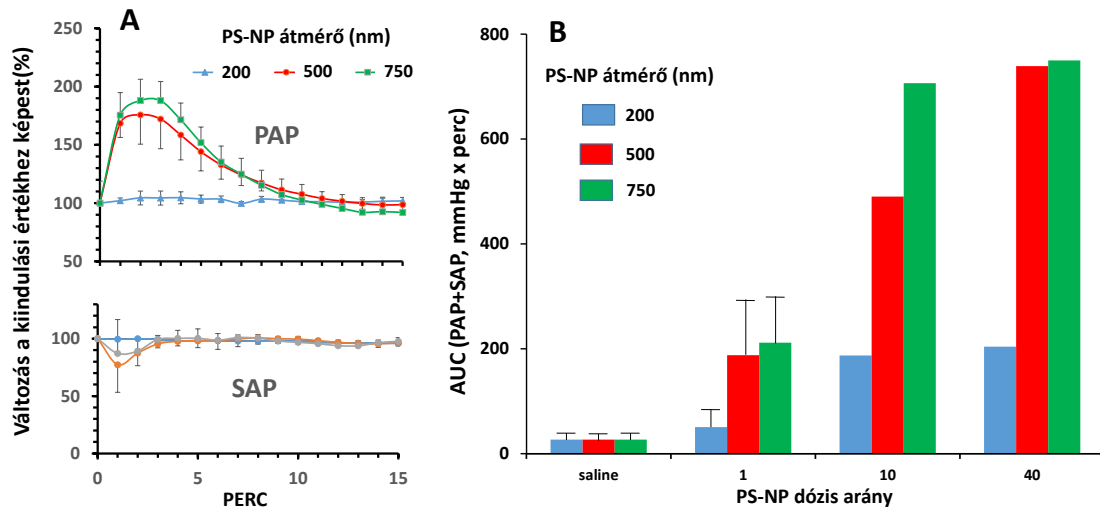
Az értékek a %-os változásnak felelnek meg (átlag±SEM, n=5), ami a következőképpen voltak kiszámítva: ($\Delta_{\max} / \text{alapvonal} \times 100$)-100, ahol a „ Δ_{\max} ” jelenti a maximális sC5b-9 és PAP választ a reakció csúcsánál az alapszinthez képest. A dózisek 50, 12,5 és 19 ng/kg voltak a 200, 500 és 750 nm-es PS-NP-k esetében. Az sC5b-9 mérések paraméterei a 38. ábraán.

PS-NP	PAP (max %)			sC5b-9 (max %)		
	Átlag	SEM	n	Átlag	SEM	n
alapérték	0		5	0		5
200	48	24	5	116	48	5
500	95	16	5	412	157	5
750	90	7	5	310	108	5

A különböző méretű PS-NP-k humán szérumban okozta C aktiváció és pulmonális reaktivitás közötti párhuzamosság már a 22. táblázatban szereplő nyers adatokból is látható. A különböző NP-k egyenlő felszíni dózisének beadása utáni maximális PAP emelkedés (41. ábra) hasonló a humán szérumban ugyanezen nanorészecskék egyenlő felszíni dózisa (72,5 cm²/mL szérumban) okozta sC5b-9 emelkedésével (38. ábra). A párosított sC5b-9 és PAP átlag értékek korrelációja (41. ábra) és regressziós analízise szignifikáns összefüggést mutatott (P=0,03), ami figyelemre méltó, mivel az *in vitro* és az *in vivo* adatok teljesen különböző rendszerekből és feltételekből származnak.

A 42. ábra a sertések PS-NP indukálta pulmonális reakcióinak részecskeméret függőségét mutatja, ahol méretfüggés jelentős reprodukálhatóságot mutatott (42. ábra felső része), míg a pulmonális hipertenzióhoz kapcsolódó szisztémás változások viszonylag kisebbek vagy elhanyagolhatóak voltak (42. ábra alsó része).

A 42. ábraán látható, hogy a minimális dózis 10-szeres növelése a pulmonális reakció különböző mértékű növekedéséhez vezetett, ami összefüggésben volt a különböző nanorészecskék méretével (200<500<750 nm). Ezzel szemben a minimális dózis 40-szerese növelése maximális hatást váltott ki a nagy (500 és 750 nm) PS-NP-k esetében.



42. ábra (A) Pulmonális (PAP) és szisztémás (SAP) artériás nyomás változásai sertésekben, PS-NP-k minimális dózisainak beadása után, %-ban kifejezett változás a kiindulási értékhez képest, átlag \pm SD (n=3). A dózisok 5, 12,5 és 19 ng/kg voltak a 200, 500 és 750 nm-es PS-NP-k esetében. (B) PS-NP-k pulmonális vaszkuláris hatásai és a részecske átmérő, illetve a dózis arány közötti kapcsolat. Az 1-szeres dózis hatása esetében átlag \pm SD (n=3) van feltüntetve.

6. Megbeszélés

6.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata

PEGilált liposzómákhoz hozzáadott különböző koncentrációjú AS turbiditás és DLS görbéjéből arra lehet következtetni, hogy a csapadékképződés 0,7-0,8 M AS koncentráció után kezdődött és további AS koncentráció emelése fokozatosan nagyobb aggregátumokat eredményezett (14. ábra). A turbidimetriás görbe csökkenése 1M AS koncentráció fölött, a rendszer növekvő heterogenitásával magyarázható, azaz lipid-gazdag csapadék és lipid-szegény vizes fázis kialakulásával. Az aggregáció szabálytalan, mikroméretű aggregátumok kialakulásához vezetett (14., 15., 16., 20. és 24. ábrák). A PEGilált liposzómák nemcsak aggregálódhatnak, hanem AS hozzáadására fuzionálhatnak is (17. ábra). A fúzió méreteke koncentrációfüggő és a koncentráció küszöbértéke 1M volt az alkalmazott inkubációs idő esetén. Ez azt is jelenti, hogy a vezikulák AS kiváltotta aggregációja a precipitáló AS koncentrációtól és az inkubációs időtől függően visszafordítható. Az aggregált vezikulák felbontásához alacsonyabb AS koncentrációra kellett hígítani a liposzómát, mint amelyen a precipitálás elkezdődött (18. ábra).

A Zeta-potenciál eredmények azt mutatták, hogy a felületi töltés változtató hatás hamar elér egy bizonyos küszöbértéket (0,1 M AS), amit az eredeti negatív vezikula felszínéhez kapcsolódó NH^{4+} ionok magyarázhatnak (280). Egy lehetséges alternatív magyarázat, hogy a töltés módosult PEG láncok szerkezeti módosulásai vezethettek a megfigyelt töltés növekedéséhez. Küszöbérték felett a Zeta-potenciál számottevően már nem változik, ami arra enged következtetni, hogy az AS közvetített Zeta-potenciál növekedés nem játszik szerepet a liposzóma aggregáció mechanizmusban (19. ábra).

A különböző PEG tartalmú liposzómák AS kiváltotta aggregációjának eredményei szerint, a liposzómák felszínén lévő PEG láncok hiányában nem játszódtott le precipitáció, míg a PEG tartalom növelése (2-10 M%) növelte a precipitációra való hajlandóságot (20. ábra), ami egyértelmű bizonyíték arra, hogy a „lopakodó” liposzómák AS kiváltotta aggregációja a PEG láncokhoz kötődik.

Az FTIR eredmények megerősítik azt az elképzelést, hogy a „lopakodó” vezikulák aggregációjának mechanizmusa mögött a PEG polimerláncok AS kozmotróp hatásának köszönhető hidratáltság csökkenése lehetett (21. ábra). Ezt támasztja alá az a

megfigyelés is, hogy pl. egy kaotróp só, a GdmCl nem befolyásolta szignifikánsan a v(C-O-C) *trans-gauche* arányt, azaz a polimer hidratációját (22. ábra).

Egyéb kozmotróp sók (úgy mint a Na₃-citrát, Na₂SO₄, MgSO₄), szintén precipitálták a PEGilált liposzómákat (24. ábra), míg a kaotróp sók (mint például a GdmCl és MgCl₂) nem (23. ábra). Mivel a kozmotróp és a kaotróp sók is eltolták az erősen negatív Zeta-potenciál értéket neutrális irányba, ezért feltételezhető, hogy az aggregációs jelenség nincs kapcsolatban a vezikulák ion adszorpció irányította felületi töltés változásával, hanem az ionok kozmotróp hatásának tulajdonítható.

BVVS mérések eredményei azt mutatták, hogy az 1 M AS-ban aggregált liposzómák, melyek később 0,1 M AS-ban voltak hígítva, kisebb méretet adtak és kevésbé aktiválták a C rendszert, szemben a 2 M AS-ban aggregált liposzómákkal (25. ábra). Ennek oka, hogy az alacsonyabb AS koncentrációban precipitált liposzómák esetében csak néhány nagyobb vezikula volt található (17. ábra), míg a 2M AS-ban precipitált mintákban, már sokkal több, nagyobb és szabálytalan alakú vezikula volt található, ami kiváló felületet nyújt a C aktiválódáshoz (17. ábra).

6.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban

A Doxil okozta HSR vizsgálata során az eredmények IgM közvetített klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációra utalnak, ami magyarázza az anafilaxiás sokk kifejlődését, illetve tachyphylaxist. A Doxeboval immunizált állatokban a PEG ellenes ellenanyag (IgG és IgM) szintek időbeli változása, valamint az időbeli lefolyás az IgM IgG-hez képesti jelentős különbségével (~20-szor magasabb a titer a csúcspontban) T-sejt független 2-es típusú immunogenitásra (TI-2) utal, mert a két ellenanyag titere teljesen egyforma ütemben változott (67, 72, 236, 238). A Doxeboval történt immunizálás utáni első napon a már meglévő (természetes) anti-PEG ellenanyag titerek csökkenése a kiindulási szinthez képest, liposzóma indukálta clearance-re utalhat (26. ábra).

Nem szenzitizált állatokban a Doxil beadását követő percek vizsgálat során, a PAP emelkedett, majd visszatért az alapvonalra, míg az anti-PEG IgM titerek hirtelen kezdeti esés után lassan csökkentek, amit egy kétfázisú exponenciális csökkenéssel lehetett jellemezni. Mivel az exponenciális csökkenés olyan koncentráció változást ír le, ahol a fogyás arányos a megmaradt mennyiséggel – vagyis az anti-PEG IgM eltávolítás

valószínűsége állandó –, a liposzómák nem lehetnek az antitest fogyasztás sebességmeghatározó tényezői. Ez azt jelenti, hogy az *in vivo* kezelés után a Doxil/Doxebonak óriási feleslegben kellett lennie az antitestekkel való találkozásakor.

Figyelembe véve, azt a jól ismert tény, hogy az antigén felületén megkötődő IgM előidézi a klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációt, a PAP kezdeti emelkedésének (27. ábra) és az anti-PEG IgM fogyasztásának (27. ábra) azonos időbeli lefutását, arra enged következtetni, hogy a Doxil okozta HSR esetében a jelen lévő (természetes) anti-PEG IgM azonnal kötődik a vezikulákhoz. Ezt támasztja alá az 1 perces PAP és anti-PEG IgM szint változások közötti lineáris korreláció ($R^2=0,966$) (27. ábra). C aktiváció következtében egyrészt anafilatoxinok szabadulnak fel, másrészt a liposzómák felszínét opszoninok borítják be, ami a fagocita felvétel elengedhetetlen feltétele. A C közvetített opszonizációt szintén megfigyelték egerekben a PEGilált liposzómák IgM közvetített felgyorsult clearance (ABC jelenség) esetében, ami azt sugallja, hogy a C aktiváció és a kardiopulmonális reakció egybevágh az IgM kötött Doxil mennyiségének gyors fagocita clearance jelenségével. Végezetül, az ellenanyagokkal szembeni liposzóma felesleg, amely percekben belül az anti-PEG IgM jelentős eltávolítását eredményezi (alapszintre), magyarázza a tachyphylaxist, azaz a Doxebo védő hatását malacban Doxil reakciókkal szemben.

Immunizált állatokban a Doxebo/Doxil beadása súlyos anafilaxiás reakciót okozott (28. ábra), ami a megemelkedett anti-PEG IgM szintnek tulajdonítható. Az sC5b-9 emelkedése (29. ábra) közvetlen bizonyítékot szolgáltat a C aktivációra, és a PAP emelkedésével való egybeesése összhangban van a pulmonális reakcióban anafilatoxin termeléssel és/vagy a C közvetített opszonizációval (vagy legalábbis szoros kapcsolatban áll). A első Doxebot követő második hasonló dózisu Doxebot/Doxilt lényegében azonos PAP és sC5b-9 változások követték, ami a Doxebo indukálta tachyphylaxis hiányát mutatta. Naiv állatoknál a második reakciót az első csökkenti vagy megszünteti.

A sertések előkezelése a HED Doxillal gátolta a liposzómák immunogenitását és a pulmonális reaktivitását. Mivel az anti-PEG IgM titerek az előkezelés hatására nem változtak, és Zymosannal ellentétben nem voltak kardiopulmonális változások liposzóma beadása után, úgy tűnik, hogy a jelenség a PEGilált liposzóma által kiváltott IgM termelésének szuppressziójával lehet kapcsolatban (30. ábra). A nem immunizált, a

Doxeboval és Doxebo+HED-del immunizált állatokban PEGilált liposzóma hemodinamikai hatásának összehasonlítása alapján úgy tűnik, hogy a Doxil előkezelés szignifikánsan elnyomta nemcsak az állatok érzékenységét, hanem a liposzóma által kiváltott kardiopulmonális distressz iránti érzékenységüket is (20. táblázat).

Pegfilgrastimmal immunizált sertések esetében is emelkedett az anti-PEG IgM titer, miközben újbóli beadása nem indukált HSR-t (31. ábra). Ez arra enged következtetni, hogy az immunogenitás és a hemodinamikus reaktogenitás vagy anafilaxis nem feltétlenül jár kéz a kézben. Az utóbbiak eltérő szerkezeti követelményekkel rendelkezhetnek, mint az előbbiek. Különösen a Pegfilgrastim esetében, amely bár indukálhatja a B-sejtek anti-PEG IgM termelését, mégis túl kicsi ahhoz, hogy megfelelő felületet biztosítson a C lerakódáshoz és aktiváláshoz.

6.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktorial

Eredményeink azt mutatták, hogy az exogén FH szérumban (*in vitro*) gátolta az AmBisome, különböző PEG tartalmú liposzómák (32. ábra), CrEL micella (33. ábra) és a Rituximab okozta C aktivációt (34. ábra). Mivel a FH a központi C3 C komponens és az AP amplifikációs hurok szintjén ható fő természetes C inhibitor, ezért ideális gátló molekula lehet a képződő C3a és C5a anafilatoxinok, valamint a C5b-9 csökkentésére vagy akár kialakulásuk megelőzésére, különösképpen azért, mert a bármelyik útvonalon kialakuló C aktiváció ezen a hurkon keresztül erősödhet (27-29).

A mini-FH, amely csak a CCP 1-4 és 19-20 tartalmazza, szintén gátolta az AmBisome és CrEL komplement aktivációját (33. ábra), azonban hatása a FH-nál sokkal erőteljesebb volt. Mini-FH dózisfüggő gátló hatásának vizsgálata során, a mini-FH fele akkora mennyisége képes volt ugyanolyan gátlást okozni, mint a FH. Fokozott aktivitása valószínűleg annak köszönhető, hogy a rövidebb molekulákban a C-terminális glikozaminoglikán/C3d kötőhelyek hozzáférhetősége megnövekszik, amelyek valószínűleg a teljes hosszúságú FH-ban egyébként részben rejtve vannak. Annak ellenére, hogy a mini-FH gyorsan kiürül a keringésből, még mindig hasznos lehet a CARPA gátlásra, mivel ez egy viszonylag gyorsan kialakuló mellékhatás, így a mini-FH rövidtávú gátló hatása, még akkor is megfelelő lehet, ha együtt vagy hozzá kapcsolva adják be.

Az AmBisome által kiváltott erős C aktivációt a FH csak részben gátolta, míg a mini-FH teljesen. A CrEL esetében, ahol az aktiváció mértéke kisebb volt, teljes mértékű gátlást okozott FH és mini-FH is. A lerakódott C3 fragmentek mennyisége és jellege, valamint a felszín fizikai-kémiai tulajdonságai szintén befolyásolhatják a FH lehetséges kölcsönhatását. Ezek legalább részben magyarázzák, hogy ugyanolyan mennyiségű FH, miért eredményezett különböző mértékű gátlást a különböző aktivátorok esetében.

Az exogén FH és a mini-FH képes *in vitro* csökkenteni vagy gátolni a Rituximab okozta C aktivációt szérumban (34. ábra), ami valószínűleg a FH és mini-FH folyadék fázisban történő, C aktivációt gátló hatásának köszönhető.

6.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásban

Fizikai-kémiai jellemzők alapján a polisztirol nanorészecskék (PS-NP) homogén, monodiszperz molekulák, amelyek erős negatív töltéssel rendelkeztek alacsony és magas ionerősség esetében is. A PS-NP-k különbségeket mutattak a PEGilált liposzómákhoz képest, a méret, a felületi töltés és a belső tartalom tekintetében (21. táblázat és 35. ábra). A Rose Bengal adszorpciós vizsgálat eredményei szerint, a részecske geometriának (görbület) fordított hatása volt az adszorpcióra, aminek a lehetséges oka, hogy az alacsonyabb görbület sima felszíni síkja kedvelte a RB kötődését. Tehát a hidrofóbicitás NP méretétől (átmérő) függött növekvő sorrendben: 200<500<750 nm (35. ábra).

A FACS eredmények a C3b/iC3b és C5b-9 nanorészecskéhez történő kötődésével (36. ábra), valamint a Western blot adatok - függetlenül a sávok pontos azonosításától - az opszonin iC3b és a szintén opszonin degradációs termékek (C3d és C3dg) időfüggő képződésével (37. ábra) mind arra engednek következtetni, hogy az 500 és 750 nm-es PS-NP-k okozta HSR megjelenésével egy időben, C aktiváció és opszonizáció is bekövetkezik. Az iC3b további proteolitikus bomlása C3dg-re és/vagy C3d-re, a NP-k felszíni tulajdonságának hatását sugallja.

NHS-ben az azonos összefelszínű (72,5 cm²/mL szérumban) NP-k közül az 500 és 750 nm-es okozott szignifikáns sC5b-9 emelkedést (38. ábra). A megfigyelt különbségek a membrán görbület C aktiváló hatására mutatnak. Figyelembe véve a C3-konvertáz

összeszerelés felületi követelményeit - és ezáltal a terminális útvonal indítását -, nagyon valószínű, hogy a nagyobb részecskék laposabb felülete játszott szerepet a megnövekedett C aktiválásban. Mivel humán szérumban az 500 és 750 nm-es részecskék C3a és Bb és sC5b-9 esetében is hasonló emelkedést mutattak és C4d tekintetében nem volt látható változás, úgy tűnik a PS-NP-k okozta C aktiváció az alternatív útvonalon keresztül történt (39. ábra). A humán szérumban mért időfüggő C3a változások továbbá azt is megerősítik, hogy a C aktiváció percekben belül megindult (40. ábra). A PAP növekedés NP dózisfüggését vizsgálva (41. ábra) arra a következtetésre jutottunk, hogy az 500 és 750 nm-es nanorészecske már <20 ng/kg dózisban is erős pulmonális hipertenziót okozott, ami körülbelül 10-szer alacsonyabb, mint a minimálisan reaktív liposzóma vagy Zymosan dózis (100-102, 142, 281). Így ezek PS-NP-k a pulmonális hipertenzió leghatékonyabb induktorai sertésekben, legalábbis az ebben a modellben eddig vizsgált nanorészecskék közül (100-102, 142, 281). A sertésben NP-k okozta PAP változások és a humán szérumban mért sC5b-9 emelkedések közötti korreláció a C aktiváció relevanciáját sugallja a sertésekben bekövetkező PS-NP okozta pulmonális változások során (41. ábra és 22. táblázat).

A sertések PS-NP indukálta pulmonális reakcióinak részecskeméret függő vizsgálata arra utal (42. ábra), hogy az összefelszínen kívül, a NP-k méretének és így a felszíni geometriának (görbületnek) jelentős hatása volt a C aktivációban, ami valószínűleg a részecske felszínének görbületével fordítottan arányos. Ennek oka, hogy a C3/C5-konvertázok és opszoninok működési hatékonysága nagyobb mértékű a lapos felületen, mint az ívelten.

7. Következtetések

7.1 PEGilált liposzómák hidrofób erők kiváltott aggregációjának vizsgálata

- Az AS és más kozmotróp sóknak precipitáló hatásuk volt PEGilált liposzómák esetében.
- PEGilált liposzómák aggregációja szabályozott, koncentráció függő folyamat. Az aggregáció reverzibilissé tehető a kozmotróp anyag koncentráció csökkentésével.
- AS hozzáadása fúziót is eredményezett, ami szintén egy koncentráció és időfüggő folyamat. Ennek okát a PEG láncok hidrofób szerkezeti változása magyarázhatja, ami sztérikus okokból a vezikulák stabilitását is csökkenti.
- Míg a felületi töltés nem befolyásolta az aggregációt, addig az emelkedett PEG tartalom növelte az aggregációra való hajlamot. Ez egyértelmű bizonyíték, hogy a PEGilált liposzómák AS kiváltotta aggregációja a PEG láncokhoz kapcsolódik.
- Mivel egyéb kozmotróp sók szintén precipitálták a PEGilált liposzómákat, míg a kaotróp sók nem, az aggregáció mechanizmusa mögött a PEG polimerláncok hidratáltságának csökkenése állhat.
- A több fuzionált vezikulát tartalmazó liposzómák jobban aktiválták a C rendszert, ami feltehetően a nagyobb méretnek, így a megnövekedett felületnek köszönhető, amire hatékonyabban rakódhattak le a C fehérjék.

7.2 Anti-PEG IgM antitestek szerepe PEGilált liposzómák okozta anafilaxisban

- A Doxil okozta HSR vizsgálata során az eredmények IgM közvetített klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációra utalnak, ami magyarázza az anafilaxiás sokk kifejlődését, illetve tachyphylaxist.
- Immunizálás utáni első napon bekövetkező természetes anti-PEG ellenanyag titerek csökkenése, a liposzóma indukálta clearance-re utalhat.
- A természetes ellenanyagokkal szemben beadott liposzóma felesleg, az anti-PEG IgM közel teljes eltávolítását eredményezi, ami a tachyphylaxist magyarázhatja.
- IgM közvetített klasszikus útvonalon keresztüli C aktiváció és az anafilaxiás bizonyítékok, immunszenzitizált sertésekből származnak, így az emberekre vonatkozólag csak azoknál a túlérzékeny személyeknél alkalmazható, akiknél

nagymértékben jelen van a vérükben az anti-PEG IgM. Más szóval ezzel az egyszerű eljárással lehetővé válik, hogy példa nélküli modellje legyen az egyik legszörnyűbb klinikai eseménynek, az infúziós terápia során előforduló hirtelen halálnak.

- Naiv sertésekben a Doxil beadása utáni gyors anti-PEG IgM csökkenés összhangban van a C aktivációval. Mindazonáltal nem zárható ki a PIM sejtek liposzóma felvételen keresztüli közvetlen aktivációja, ami a pszeudoallergiás reakciók egy másik útvonala lehet („Double hit” hipotézis).
- A sertésekben megfigyelt PEGilált liposzómák okozta anti-PEG IgM masszív keletkezése, T-sejt független (TI) 2-es típusú immunogenitásra utal. Növekedése a PEGilált nanorészecske révén arra utal, hogy a PEGiláció nem hatékony technológia az immunválasz elkerülésére.
- A sertések előkezelése Doxillal gátolta a liposzómák immunogenitását és a pulmonális reaktivitását, ami megegyezik a Doxil patkányokban, kutyákban és törpe malacokban az ABC jelenség összefüggésében vizsgált PEGilált liposzóma által kiváltott IgM termelésének szuppressziójával. Ez az immunszuppresszió a betegek túlnyomó többségében klinikailag nem jelentkezik, mindazonáltal nem feltétlenül hatástalan, hiszen karboplatin és Doxil kombinációjával kezelt rákos betegekben a karboplatinnal szembeni HSR arányának szignifikáns csökkenése volt megfigyelhető.
- Doxil B-sejt szuppresszív hatása a liposzómában jelenlévő citotoxikus Doxorubicin-nek tulajdonítható, mivel más PEGilált nanogyógyszer ismételt beadását követően súlyos HSR-rel és/vagy ABC-vel járó immunogenitást idéz elő. Ezen adatok alapján valószínű, hogy a Doxil immunszuppresszív hatása olyan anti-gyógyszer IgM-termelő B-sejtekre korlátozódik, amelyek aktivációja a liposzóma fagocitózistól függ. Egészséges emberekben vagy a legtöbb rákos betegen a hatásnak nincs jelentős káros klinikai tünete.
- Doxil káros hatása, illetve a HSR kockázata megelőzhető, vagy legalábbis csökkenthető a betegek Doxibo előkezelése révén. Az anti-PEG IgM okozati szerepe HSR-ben és az ellenanyagok Doxibo révén történő megkötése magyarázatot nyújt az előkezelés hatékonyságát illetően. Az eredmények Doxibo kezelés biztonságát mutatták Doxillal kombinálva és felhívja a figyelmet arra a

lehetőségre, hogy a Doxebo önálló alkalmazása 2-3 nap múlva immunogenitáshoz vezethet.

- Egy PEGilált biológiai gyógyszer (Pegfilgrastim) általi anti-PEG ellenanyagok keletkezése egy „nem biológiai komplex” (PEGilált liposzóma) okozta HSR-hez vezetett, ami példaként szolgál a különböző típusú PEGilált gyógyszerek közötti keresztreakcióra.
- Az a következtetés, hogy a C aktiváció fontos szerepet játszik a gyógyszer indukálta anafilaxisban - és valószínűleg az enyhe HSR-ben is -, előtérbe helyezi a már meglévő, illetve új C tesztek és inhibitorok lehetséges felhasználását ezen a területen. Továbbá felvetik a Doxil terápia új indikációjának lehetőségét vagy más citotoxikus liposzómák használatát az ellenanyag közvetített CARPA megelőzése érdekében.

7.3 Komplement aktiváció *in vitro* gátlása H-faktorial

- Mivel a FH a központi C3 C komponens és az AP amplifikációs hurok szintjén ható fő természetes C inhibitor, ezért ideális gátló molekula lehet a képződő C3a és C5a anafilatoxinok, valamint a C5b-9 csökkentésére vagy akár kialakulásuk megelőzésére, különösképpen azért, mert a bármelyik útvonalon kialakuló C aktiváció ezen a hurkon keresztül erősödhet.
- Exogén FH szérumban (*in vitro*) a liposzómák és CrEL micellák okozta C aktiváció egy potenciális gátló molekulája lehet.
- A FH mesterséges származékai potenciális terápiás C inhibitorok lehetnek, beleértve molekulák mini-FH osztályát is. A mini-FH fokozott aktivitása valószínűleg annak köszönhető, hogy a rövidebb molekulákban a C-terminális glikozaminoglikán/C3d kötőhelyek hozzáférhetősége megnövekszik, amelyek valószínűleg a teljes hosszúságú FH-ban egyébként részben rejtve vannak.
- A különböző típusú C aktivációs tesztek korábbi eredményeivel összehangban, azonos moláris mennyiségek mellett, a mini-FH hatékonyabb volt a liposzóma és Rituximab indukálta C aktiváció megelőzésében, mint a FH. Bár a mini-FH jelenlegi formájában - kis méretének köszönhetően - gyorsan kiürül a keringésből, még mindig hasznos lehet különösen a CARPA gátlásra, amely viszonylag gyorsan kialakuló mellékhatás és így a mini-FH rövidtávú gátló hatása, még akkor is

megfelelő lehet a CARPA megelőzésében vagy csökkentésében, amikor potenciális CARPAgén gyógyszerrel együtt vagy hozzá kapcsolva adják be.

- A lerakódott C3 fragmentek mennyisége és jellege, valamint a felszín fizikai-kémiai tulajdonságai szintén befolyásolhatják a FH lehetséges kölcsönhatását. Ezek legalább részben magyarázzák, hogy ugyanolyan mennyiségű FH miért eredményezett különböző mértékű gátlást.
- Az exogén FH és a mini-FH képes *in vitro* csökkenteni vagy gátolni a Rituximab okozta C aktivációt teljes vérben, ami valószínűleg a FH és mini-FH folyadék fázisban történő C aktivációt gátló hatásának köszönhető.
- Fontos megjegyezni, hogy egy viszonylag könnyű teszttel kiszűrhető a CARPA-ra való hajlam és így, ha valóban szükséges, egy C inhibitor alkalmazható.

7.4 Komplement aktiváció szerepe a polisztirol nanorészecskék pulmonális vazoaktivitásban

- A FACS eredmények a C3b/iC3b és C5b-9 nanorészecskéhez történő kötődésével valamint a Western blot adatok az opszonin iC3b és a szintén opszonin degradációs termékek (C3d és C3dg) időfüggő képződésével mind arra engednek következtetni, hogy az 500 és 750 nm-es PS-NP-k okozta HSR megjelenésével egy időben, C aktiváció és opszonizáció is bekövetkezik.
- A humán szérumban megfigyelt eredmények alapján a PS-NP-k okozta C aktiváció az alternatív útvonalon keresztül történik.
- A NP-k méretének és így a felszíni geometriának (görbületnek) jelentős hatása van a C aktivációban, ami valószínűleg a részecske felszínének görbületével fordítottan arányos, mivel a C fehérjék lerakódásához megfelelő méretű, síkhoz közelítő tér kell. A méretfüggő aggregátum képződés szintén szerepet játszhat a PS-NP-k okozta C aktivációban.
- Nem olyan régen felmerült annak a lehetősége, hogy RPR és CARPA teória egymást kizáró elméletek. Mivel az opszonizáció, egy jól ismert kiváltó ok a fokozott fagocita felvétel során, nagyon valószínű, hogy a RPR is szerepet játszik a folyamat során, a nanorészecskék PIM sejtek robusztus felvételén keresztül. Így az RPR elmélet inkább illeszkedik a CARPA-val, mintsem kizárná azt. Ezek a fogalmak összeegyeztethetőek a „Double hit” hipotézis révén, ahol az allergiát

közvetítő sejtek egyidejű két vagy többszörös aktivációja különböző útvonalakon keresztül is megtörténhet.

- A nanomedicinák indukálta HSR mechanizmusának tisztázására használt karboxilált PS-NP-k nemcsak, hogy nagymértékben hidrofób tulajdonságúak, de hasonlóan a kontroll PEGilált liposzómákhoz, negatívan töltöttek is. Ezek ugyanúgy, mint a negatív töltésű liposzómák kettősrétegében a koleszterin magas mólszázaléka, felgyorsítják a C aktivációt.
- Az 500 és 750 nm-es PS-NP-k a kardiopulmonális distressz leghatékonyabb induktorai. Így az ilyen nanorészecskék - Zymosanhoz hasonlóan - az akut NP indukálta HSR (új) pozitív standardjai lehetnek, amely lehetővé teszi ezen mechanizmusok további vizsgálatát, különösképpen a „Double hit” teóriát.
- A humán szérumban kapott eredmények az *in vitro* C aktivációs vizsgálati módszerek alkalmazhatóságát sugallják a sertések *in vivo* (pulmonális) reakcióinak előrejelzésében, és ezáltal a nanorészecskék potenciális veszélyét, súlyos infúziós reakciók esetében a túlérzékeny egyéneknél.

8. Összefoglalás

A nanomedicinális anyagok i.v. terápia során túlérzékenységi reakciókat (HSR) is okozhatnak. A reakció gyorsan kialakuló tünetei mellett akár halálos is lehet, így a HSR a terápiás anyagok használatának egyik fő gátja lehet. Jellemzői, hogy míg IgE nem, addig a komplement (C) aktiváció részt vesz, ezért bevezetésre került a CARPA kifejezés.

A polietilénlikolt (PEG) széles körben alkalmazzák, mivel növeli a gyógyszer keringési idejét. Emiatt aggregátum képző hajlama is nagyobb lehet, ami potenciális veszélyforrás. Elsőként a liposzómák aggregációs mechanizmusát vizsgáltuk. A PEGilált liposzómák legismertebb példája a HSR-t okozó Doxil. Másodikként a C és a PEG ellenes ellenanyagok szerepét vizsgáltuk a reakcióban. Harmadikként egy szolubilis C szabályzót, a H-faktort vizsgáltuk (FH), feltételezve hogy alkalmazható lehet a nanogyógyszerek okozta CARPA gátlásában. A HSR mechanizmus alaposabb megismerése érdekében egy malac modell került bevezetésre, ami kiemeli a C aktiváció kulcsszerepét a reakciók esetében. Poliszitirén nanorészecskékkel (PS-NP) folytatott kísérletek alapján nemrégiben megkérdőjelezték az okozott HSR-ek pszeudoallergiás természetét, a C szerepét és a malac, mint releváns modell használatát. Így utolsóként a PS-NP kiváltotta HSR-ek további tanulmányozása állt.

Eredményeink bizonyítják, hogy a PEGilált liposzómák aggregációja szabályozott és reverzibilis módon történik a PEG láncok kozmotróp sók hatásának köszönhető hidratáció csökkenése révén. A kialakult fúziók jelentős hatással lehetnek a C aktivációra. A Doxil okozta HSR vizsgálata során az eredmények IgM közvetített klasszikus útvonalon keresztüli C aktivációra utalnak, ami magyarázza az anafilaxiás sokk kifejlődését, illetve tachyphylaxist. Exogén FH és mini-FH hatékony gátlónak bizonyult az *in vitro* liposzómák, CrEL és Rituximab okozta C aktiváció esetében. A PS-NP-k okozta HSR megjelenésével egy időben azonnali C aktiváció és opszonizáció is bekövetkezik. Humán szérumban a PS-NP-k okozta C aktiváció az alternatív útvonalon keresztül történik, amiben a méretnek és a felszíni görbületnek jelentős hatása van.

Így elmondható, hogy a C aktiválás a nanomedicinák pszeudoallergiás mellékhatásában döntő szerepet játszik, melyet a fejlesztés, tesztelés, megelőzés és kezelés során fontos figyelembe venni.

Summary

I.v. therapy with nanomedicines can cause hypersensitivity reactions (HSRs). In addition to the rapidly arising symptoms the reaction can be deadly, so HSR can be one of the main barrier for the application of therapeutic agents. While the role of IgE has not been demonstrated, complement (C) activation is involved in these reactions, so the term CARPA was introduced.

Polyethylene glycol (PEG) is widely used since it increases the circulation time of the drug. Therefore its aggregate formation tendency may be greater, which is a potential danger. First, we examined the mechanism of liposome aggregation. The most famous PEGylated liposome which can cause HSR is Doxil. Second, we examined the role of C and anti-PEG antibody in these reactions. Third, we examined a soluble C regulator, Factor-H (FH) since it seems that can be used for the inhibition of nanomedicine-caused CARPA. To get a better understanding of HSR mechanisms, a pig model was introduced, which emphasizes the key role of C activation in these reactions. Recently, studies using polystyrene nanoparticles (PS-NPs) questioned the pseudoallergic nature of these HSRs, the role of C, and the use of pigs as a relevant model. Thus finally, we examined the PS-NP induced HSR.

Our results show that aggregation of PEGylated liposomes is a regulated, reversible process by dehydration of the PEG chains due to the effect of kosmotropic salt. The formed fusion may affect C activation. In Doxil-induced HSR, the results suggest C activation via IgM mediated classical pathway, which explains anaphylactic shock and tachyphylaxis. Exogen FH and mini-FH were efficient inhibitors in case of liposomes, CrEL and Rituximab-caused C activation *in vitro*. In case of PS-NP induced HSR, C activation and opsonization also occurred at the same time. PS-NP-caused C activation proceeded via the alternative pathway in human sera wherein the size and surface geometry (curvature) of NPs have a significant impact.

Taken together C activation plays a key role in the adverse effects of nanomedicines which requires attention in their development, testing, prevention and treatment.

9. Irodalomjegyzék

1. Szebeni J, Jiskoot W. Handbook of Nanobiomedical Research: Fundamentals, Applications and Recent Developments. Torchilin V. World Scientific, Singapore, 2014: 45-73.
2. Prohászka Z. Az immunológia alapjai. Falus A, Buzás E, Rajnavölgyi É. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007: 58-70.
3. Kemper C, Atkinson JP. (2007) T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol*, 7: 9-18.
4. Attali G, Gancz D, Fishelson Z. (2004) Increased sensitivity of early apoptotic cells to complement-mediated lysis. *Eur J Immunol*, 34: 3236-3245.
5. Jensen ML, Honore C, Hummelshoj T, Hansen BE, Madsen HO, Garred P. (2007) Ficolin-2 recognizes DNA and participates in the clearance of dying host cells. *Mol Immunol*, 44: 856-865.
6. Kuraya M, Ming Z, Liu X, Matsushita M, Fujita T. (2005) Specific binding of L-ficolin and H-ficolin to apoptotic cells leads to complement activation. *Immunobiology*, 209: 689-697.
7. Trouw LA, Bengtsson AA, Gelderman KA, Dahlback B, Sturfelt G, Blom AM. (2007) C4b-binding protein and factor H compensate for the loss of membrane-bound complement inhibitors to protect apoptotic cells against excessive complement attack. *J Biol Chem*, 282: 28540-28548.
8. Szebeni J. The Complement System: Novel Roles in Health and Disease. Szebeni J. Springer, Boston, 2004: 399-440.
9. Walport MJ. (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med*, 344: 1058-1066.
10. Basta M. (2008) Ambivalent effect of immunoglobulins on the complement system: activation versus inhibition. *Mol Immunology*, 45: 4073-4079.
11. Fosse E, Mollnes TE, Aasen AO, Trumpy JH, Stokke T. (1987) Complement activation following multiple injuries. *Acta Chir Scand*, 153: 325-330.
12. Fosse E, Pillgram-Larsen J, Svennevig JL, Nordby C, Skulberg A, Mollnes TE, Abdelnoor M. (1998) Complement activation in injured patients occurs immediately and is dependent on the severity of the trauma. *Injury*, 29: 509-514.

13. Krohn CD, Reikeras O, Mollnes TE, Aasen AO. (1998) Complement activation and release of interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha in drained and systemic blood after major orthopaedic surgery. *Eur J Surg*, 164: 103-108.
14. Lim HW. (1990) The complement system. Activation, modulation, and clinical relevance. *Dermatol Clin*, 8: 609-618.
15. Mollnes T. *The Complement System: Novel Roles in Health and Disease*. Szebeni J. Springer, Boston, 2004: 483–516.
16. Videm V, Mollnes TE. (1994) Human complement activation by polygeline and dextran 70. *Scand J Immunol*, 39: 314-320.
17. Spitzer D, Mitchell LM, Atkinson JP, Hourcade DK. (2007) Properdin can initiate complement activation by binding specific target surfaces and providing a platform for de novo convertase assembly. *J Immunol*, 179: 2600-2608.
18. Stover CM, Thiel S, Thelen M, Lynch NJ, Vorup-Jensen T, Jensenius JC, Schwaeble WJ. (1999) Two constituents of the initiation complex of the mannan-binding lectin activation pathway of complement are encoded by a single structural gene. *J Immunol*, 162: 3481-3490.
19. Takahashi M, Endo, Y., Fujita, T. and Matsushita, M. (1999) A truncated form of mannose-binding lectin-associated serine protease MASP-2 expressed by alternative polyadenylation is a component of the lectin complement pathway. *Int Immunol*, 11: 853-863.
20. Degn SE, Jensen L, Hansen AG, Duman D, Tekin M, Jensenius JC, Thiel S. (2012) Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol*, 189: 3957-3969.
21. Skjoedt MO, Hummelshoj T, Palarasah Y, Honore C, Koch C, Skjodt K, Garred P. (2010) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem*, 285: 8234-8243.
22. Hansen S, Selman L, Palaniyar N, Ziegler K, Brandt J, Kliem A, Jonasson M, Skjoedt MO, Nielsen O, Hartshorn K, Jorgensen TJ, Skjodt K, Holmskov U.

- (2010) Collectin 11 (CL-11, CL-K1) is a MASP-1/3-associated plasma collectin with microbial-binding activity. *J Immunol*, 185: 6096-6104.
23. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. (2002) Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol*, 23: 61-64.
 24. Chen CB, Wallis R. (2004) Two mechanisms for mannose-binding protein modulation of the activity of its associated serine proteases. *J Biol Chem*, 279: 26058-26065.
 25. Lachmann PJ, Halbwachs L. (1975) The influence of C3b inactivator (KAF) concentration on the ability of serum to support complement activation. *Clin Exp Immunol*, 21: 109-114.
 26. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester in native C3. *J Exp Med*, 154: 856-867.
 27. Ferreira VP, Pangburn MK, Cortes C. (2010) Complement control protein factor H: The good, the bad, and the inadequate. *Mol Immunol*, 47: 2187-2197.
 28. Kopp A, Hebecker M, Svobodova E, Jozsi M. (2012) Factor h: a complement regulator in health and disease, and a mediator of cellular interactions. *Biomolecules*, 2: 46-75.
 29. de Cordoba SR, Esparza-Gordillo J, de Jorge EG, Lopez-Trascasa M, Sanchez-Corral P. (2004) The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol Immunol*, 41: 355-367.
 30. Hebecker M, Alba-Dominguez M, Roumenina LT, Reuter S, Hyvarinen S, Dragon-Durey MA, Jokiranta TS, Sanchez-Corral P, Jozsi M. (2013) An Engineered Construct Combining Complement Regulatory and Surface-Recognition Domains Represents a Minimal-Size Functional Factor H. *J Immunol*, 191: 912-921.
 31. Mészáros T, Csicsesi AI, Uzonyi B, Hebecker M, Fulop TG, Erdei A, Szebeni J, Jozsi M. (2016) Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab in vitro. *Nanomedicine*, 12: 1023-1031.

32. Ara Y, Saito T, Takagi T, Hagiwara E, Miyagi Y, Sugiyama M, Kawamoto S, Ishii N, Yoshida T, Hanashi D, Koshino T, Okada H, Okuda K. (2001) Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology*, 103: 98-105.
33. Erdei A, Kohler V, Schafer H, Burger R. (1992) Macrophage-bound C3 fragments as adhesion molecules modulate presentation of exogenous antigens. *Immunobiology*, 185: 314-326.
34. Roberts T, Snow EC. (1999) Cutting edge: recruitment of the CD19/CD21 coreceptor to B cell antigen receptor is required for antigen-mediated expression of Bcl-2 by resting and cycling hen egg lysozyme transgenic B cells. *J Immunol*, 162: 4377-4380.
35. Roberts ML, Luxembourg AT, Cooper NR. (1996) Epstein-Barr virus binding to CD21, the virus receptor, activates resting B cells via an intracellular pathway that is linked to B cell infection. *J Gen Virol*, 77 (Pt 12): 3077-3085.
36. Clemenza L, Dieli F, Cicardi M, Salerno A. (2003) Research on complement: old issues revisited and a novel sphere of influence. *Trends Immunol*, 24: 292-296.
37. Carroll MC, Prodeus AP. (1998) Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 10: 36-40.
38. Carroll MC. (1998) The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol*, 16: 545-568.
39. Carroll MC. (1998) CD21/CD35 in B cell activation. *Semin Immunol*, 10: 279-286.
40. Carroll M. (1999) Role of complement receptors CD21/CD35 in B lymphocyte activation and survival. *Curr Top Microbiol Immunol*, 246: 63-68; discussion 69.
41. Erdei A, Molnár E, Csomor E, Bajtay Z, Prechl J. *The Complement System: Novel Roles in Health and Disease*. Szebeni J. Springer, Boston, 2004: 77-96.
42. Ahearn JM, Fischer MB, Croix D, Goerg S, Ma M, Xia J, Zhou X, Howard RG, Rothstein TL, Carroll MC. (1996) Disruption of the Cr2 locus results in a

- reduction in B-1a cells and in an impaired B cell response to T-dependent antigen. *Immunity*, 4: 251-262.
43. Molina H, Holers VM, Li B, Fung Y, Mariathasan S, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Karr RW, Chaplin DD. (1996) Markedly impaired humoral immune response in mice deficient in complement receptors 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93: 3357-3361.
 44. Ramos OF, Algarra I, Sarmay G, Yefenof E, Gergely J, Klein E. (1989) Lymphocytes stimulated by allogeneic B cell lines cleave the third component of complement and fix C3 fragments. Their nonspecific lytic capacity is elevated against complement receptor type 2-carrying targets. *J Immunol*, 142: 217-223.
 45. Holers VM. (2005) Complement receptors and the shaping of the natural antibody repertoire. *Springer Semin Immunopathol*, 26: 405-423.
 46. Yoshida Y, Kang KF, Berger M, Chen GF, Gilliam AC, Moser A, Wu L, Hammerberg C, Cooper KD. (1998) Monocyte induction of IL-10 and down-regulation of IL-12 by iC3b deposited in ultraviolet-exposed human skin. *J Immunol*, 161: 5873-5879.
 47. Bacle F, Haefnercavaillon N, Laude M, Couturier C, Kazatchkine MD. (1990) Induction of Il-1 Release through Stimulation of the C3b/C4b Complement Receptor Type One (Cr-1, Cd35) on Human-Monocytes. *J Immunol*, 144: 147-152.
 48. Yentis SM, Gooding RP, Riches PG. (1994) The Effects of Igg and Immune-Complexes on the Endotoxin-Induced Cytokine Response. *Cytokine*, 6: 247-254.
 49. Marth T, Kelsall BL. (1997) Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med*, 185: 1987-1995.
 50. Bangham AD. (1993) Liposomes: the Babraham connection. *Chem Phys Lipids*, 64: 275-285.
 51. Deamer DW. (2010) From "banghasomes" to liposomes: a memoir of Alec Bangham, 1921-2010. *FASEB J*, 24: 1308-1310.
 52. Belchetz PE, Crawley JC, Braidman IP, Gregoriadis G. (1977) Treatment of Gaucher's disease with liposome-entrapped glucocerebrosidase. *Lancet*, 2: 116-117.

53. Marcato PD, Duran N. (2008) New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *J Nanosci Nanotechnol*, 8: 2216-2229.
54. Venkatraman SS, Ma LL, Natarajan JV, Chattopadhyay S. (2010) Polymer- and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2: 801-814.
55. Wagner V, Dullaart A, Bock AK, Zweck A. (2006) The emerging nanomedicine landscape. *Nat Biotechnol*, 24: 1211-1217.
56. FDA. (2009) Guidance for Industry Assay Development for Immunogenicity Testing of Therapeutic Proteins. *Federal Register* 74: 63758.
57. Jiskoot W, van Schie RM, Carstens MG, Schellekens H. (2009) Immunological risk of injectable drug delivery systems. *Pharm Res*, 26: 1303-1314.
58. Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B. (1976) Molecular determinants of immunogenicity: the immunon model of immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73: 3671-3675.
59. Vos Q, Lees A, Wu ZQ, Snapper CM, Mond JJ. (2000) B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunol Rev*, 176: 154-170.
60. Alving CR. (1984) Natural antibodies against phospholipids and liposomes in humans. *Biochem Soc Trans*, 12: 342-344.
61. Alving CR. (2006) Antibodies to lipids and liposomes: immunology and safety. *J Liposome Res*, 16: 157-166.
62. Alving CR, Richards RL, Guirguis AA. (1977) Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J Immunol*, 118: 342-347.
63. Alving CR, Wassef NM. (1999) Naturally occurring antibodies to cholesterol: a new theory of LDL cholesterol metabolism. *Immunol Today*, 20: 362-366.
64. Shiraishi K, Hamano M, Ma H, Kawano K, Maitani Y, Aoshi T, Ishii KJ, Yokoyama M. (2013) Hydrophobic blocks of PEG-conjugates play a significant role in the accelerated blood clearance (ABC) phenomenon. *J Control Release*, 165: 183-190.
65. Ishida T, Harada M, Wang XY, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. (2005) Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding

- liposome injection: effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes. *J Control Release*, 105: 305-317.
66. Ishida T, Ichihara M, Wang X, Kiwada H. (2006) Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes. *J Control Release*, 115: 243-250.
 67. Ishida T, Ichihara M, Wang X, Yamamoto K, Kimura J, Majima E, Kiwada H. (2006) Injection of PEGylated liposomes in rats elicits PEG-specific IgM, which is responsible for rapid elimination of a second dose of PEGylated liposomes. *J Control Release*, 112: 15-25.
 68. Ishida T, Ichikawa T, Ichihara M, Sadzuka Y, Kiwada H. (2004) Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice. *J Control Release*, 95: 403-412.
 69. Ishida T, Kiwada H. (2008) Accelerated blood clearance (ABC) phenomenon upon repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm*, 354: 56-62.
 70. Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. (2003) Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. *J Control Release*, 88: 35-42.
 71. Ishida T, Masuda K, Ichikawa T, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. (2003) Accelerated clearance of a second injection of PEGylated liposomes in mice. *Int J Pharm*, 255: 167-174.
 72. Ishihara T, Takeda M, Sakamoto H, Kimoto A, Kobayashi C, Takasaki N, Yuki K, Tanaka K, Takenaga M, Igarashi R, Maeda T, Yamakawa N, Okamoto Y, Otsuka M, Ishida T, Kiwada H, Mizushima Y, Mizushima T. (2009) Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharm Res*, 26: 2270-2279.
 73. Koide H, Asai T, Hatanaka K, Akai S, Ishii T, Kenjo E, Ishida T, Kiwada H, Tsukada H, Oku N. (2010) T cell-independent B cell response is responsible for ABC phenomenon induced by repeated injection of PEGylated liposomes. *Int J Pharm*, 392: 218-223.

74. Tagami T, Nakamura K, Shimizu T, Ishida T, Kiwada H. (2009) Effect of siRNA in PEG-coated siRNA-lipoplex on anti-PEG IgM production. *J Control Release*, 137: 234-240.
75. Zhao Y, Wang L, Yan M, Ma Y, Zang G, She Z, Deng Y. (2012) Repeated injection of PEGylated solid lipid nanoparticles induces accelerated blood clearance in mice and beagles. *Int J Nanomedicine*, 7: 2891-2900.
76. Bal SM, Slutter B, Verheul R, Bouwstra JA, Jiskoot W. (2012) Adjuvanted, antigen loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles for nasal and intradermal vaccination: adjuvant- and site-dependent immunogenicity in mice. *Eur J Pharm Sci*, 45: 475-481.
77. Mohanan D, Slutter B, Henriksen-Lacey M, Jiskoot W, Bouwstra JA, Perrie Y, Kundig TM, Gander B, Johansen P. (2010) Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *J Control Release*, 147: 342-349.
78. Slutter B, Bal SM, Ding Z, Jiskoot W, Bouwstra JA. (2011) Adjuvant effect of cationic liposomes and CpG depends on administration route. *J Control Release*, 154: 123-130.
79. Bachmann MF, Jennings GT. (2010) Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns. *Nat Rev Immunol*, 10: 787-796.
80. Koren E, Smith HW, Shores E, Shankar G, Finco-Kent D, Rup B, Barrett YC, Devanarayan V, Gorovits B, Gupta S, Parish T, Quarmby V, Moxness M, Swanson SJ, Taniguchi G, Zuckerman LA, Stebbins CC, Mire-Sluis A. (2008) Recommendations on risk-based strategies for detection and characterization of antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*, 333: 1-9.
81. Koren E, Zuckerman LA, Mire-Sluis AR. (2002) Immune responses to therapeutic proteins in humans--clinical significance, assessment and prediction. *Curr Pharm Biotechnol*, 3: 349-360.
82. CHMP CfMP. (2006) Concept paper on immunogenicity assessment of therapeutic proteins.
83. Gorovits B. (2009) Antidrug antibody assay validation: industry survey results. *AAPS J*, 11: 133-138.

84. Liang M, Klakamp SL, Funelas C, Lu H, Lam B, Herl C, Umble A, Drake AW, Pak M, Ageyeva N, Pasumarthi R, Roskos LK. (2007) Detection of high- and low-affinity antibodies against a human monoclonal antibody using various technology platforms. *Assay Drug Dev Technol*, 5: 655-662.
85. Lofgren JA, Dhandapani S, Pennucci JJ, Abbott CM, Mytych DT, Kaliyaperumal A, Swanson SJ, Mullenix MC. (2007) Comparing ELISA and surface plasmon resonance for assessing clinical immunogenicity of panitumumab. *J Immunol*, 178: 7467-7472.
86. Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, Parish T, Scott G, Shankar G, Shores E, Swanson SJ, Taniguchi G, Wierda D, Zuckerman LA. (2004) Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*, 289: 1-16.
87. Shankar G, Devanarayan V, Amaravadi L, Barrett YC, Bowsher R, Finco-Kent D, Fiscella M, Gorovits B, Kirschner S, Moxness M, Parish T, Quarmby V, Smith H, Smith W, Zuckerman LA, Koren E. (2008) Recommendations for the validation of immunoassays used for detection of host antibodies against biotechnology products. *J Pharm Biomed Anal*, 48: 1267-1281.
88. Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H. (2011) Immunogenicity of therapeutic proteins: the use of animal models. *Pharm Res*, 28: 2379-2385.
89. Johnson R, Jiskoot W. (2012) Models for evaluation of relative immunogenic potential of protein particles in biopharmaceutical protein formulations. *J Pharm Sci*, 101: 3586-3592.
90. Alving CR. (1991) Liposomes as carriers of antigens and adjuvants. *J Immunol Methods*, 140: 1-13.
91. Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. (1995) Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev*, 145: 5-31.
92. Alving CR, Swartz GM, Jr. (1991) Antibodies to cholesterol, cholesterol conjugates and liposomes: implications for atherosclerosis and autoimmunity. *Crit Rev Immunol*, 10: 441-453.

93. Alving CR, Swartz GM, Jr., Wassef NM, Ribas JL, Herderick EE, Virmani R, Kolodgie FD, Matyas GR, Cornhill JF. (1996) Immunization with cholesterol-rich liposomes induces anti-cholesterol antibodies and reduces diet-induced hypercholesterolemia and plaque formation. *J Lab Clin Med*, 127: 40-49.
94. Matyas GR, Wassef NM, Rao M, Alving CR. (2000) Induction and detection of antibodies to squalene. *J Immunol Methods*, 245: 1-14.
95. van de Weert M, Moller E. Immunogenicity of Biopharmaceuticals. van de Weert M, Moller E. Springer, AAPS Press, New York, 2008: 97-111.
96. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 23: 3-25.
97. Szebeni J. (2012) Hemocompatibility testing for nanomedicines and biologicals: predictive assays for complement mediated infusion reactions. *Eur J Nanomed*, 4: 33-53.
98. Szebeni J, Barenholz Y. Handbook of Harnessing Biomaterials in Nanomedicine: Preparation, Toxicity, and Applications. Peer D. Pan Stanford Publishing Singapore, 2012: 309-334.
99. Szebeni J. (2005) Complement activation-related pseudoallergy: a new class of drug-induced acute immune toxicity. *Toxicology*, 216: 106-121.
100. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Milosevits J, Alving CR, Bunger R. (2006) Complement activation-related cardiac anaphylaxis in pigs: role of C5a anaphylatoxin and adenosine in liposome-induced abnormalities in ECG and heart function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H1050-1058.
101. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. (2000) Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279: H1319-1328.
102. Szebeni J, Fontana JL, Wassef NM, Mongan PD, Morse DS, Dobbins DE, Stahl GL, Bunger R, Alving CR. (1999) Hemodynamic changes induced by liposomes and liposome-encapsulated hemoglobin in pigs: a model for pseudoallergic cardiopulmonary reactions to liposomes. Role of complement and inhibition by soluble CR1 and anti-C5a antibody. *Circulation*, 99: 2302-2309.

103. Altin JG, Parish CR. (2006) Liposomal vaccines--targeting the delivery of antigen. *Methods*, 40: 39-52.
104. Alving CR, Kinsky SC, Haxby JA, Kinsky CB. (1969) Antibody binding and complement fixation by a liposomal model membrane. *Biochemistry*, 8: 1582-1587.
105. Alving CR, Urban KA, Richards RL. (1980) Influence of temperature on complement-dependent immune damage to liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 600: 117-125.
106. Bangham AD, Horne RW. (1964) Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents as Observed in the Electron Microscope. *J Mol Biol*, 8: 660-668.
107. Barenholz Y. *Liposome Technology*. Gregoriadis G. Informa Healthcare, New York, 2006: 1-26.
108. Danenberg HD, Golomb G, Groothuis A, Gao J, Epstein H, Swaminathan RV, Seifert P, Edelman ER. (2003) Liposomal alendronate inhibits systemic innate immunity and reduces in-stent neointimal hyperplasia in rabbits. *Circulation*, 108: 2798-2804.
109. Alberts DS, Liu PY, Wilczynski SP, Clouser MC, Lopez AM, Michelin DP, Lanzotti VJ, Markman M. (2008) Randomized trial of pegylated liposomal doxorubicin (PLD) plus carboplatin versus carboplatin in platinum-sensitive (PS) patients with recurrent epithelial ovarian or peritoneal carcinoma after failure of initial platinum-based chemotherapy (Southwest Oncology Group Protocol S0200). *Gynecol Oncol*, 108: 90-94.
110. Gabizon A, Tzemach D, Mak L, Bronstein M, Horowitz AT. (2002) Dose dependency of pharmacokinetics and therapeutic efficacy of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL) in murine models. *J Drug Target*, 10: 539-548.
111. Storm G, ten Kate MT, Working PK, Bakker-Woudenberg IAJM. (1998) Doxorubicin entrapped in sterically stabilized liposomes: Effects on bacterial blood clearance capacity of the mononuclear phagocyte system. *Clin Cancer Res*, 4: 111-115.

112. Chopra R, Blair S, Strang J, Cervi P, Patterson KG, Goldstone AH. (1991) Liposomal amphotericin B (AmBisome) in the treatment of fungal infections in neutropenic patients. *J Antimicrob Chemother*, 28 Suppl B: 93-104.
113. Gabizon A, Catane R, Uziely B, Kaufman B, Safra T, Cohen R, Martin F, Huang A, Barenholz Y. (1994) Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res*, 54: 987-992.
114. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. (2003) Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet*, 42: 419-436.
115. Meunier F, Prentice HG, Ringden O. (1991) Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother*, 28 Suppl B: 83-91.
116. Solomon R, Gabizon AA. (2008) Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: Focus on pegylated liposomal doxorubicin. *Clin Lymphoma Myeloma*, 8: 21-32.
117. Sculier JP, Coune A, Brassinne C, Laduron C, Atassi G, Ruyschaert JM, Fruhling J. (1986) Intravenous-Infusion of High-Doses of Liposomes Containing Nsc-251635, a Water-Insoluble Cytostatic Agent - a Pilot-Study with Pharmacokinetic Data. *J Clin Oncol*, 4: 789-797.
118. Cabrales S, Bresnahan J, Testa D, Espina BM, Scadden DT, Ross M, Gill PS. (1998) Extravasation of liposomal daunorubicin in patients with AIDS-associated Kaposi's sarcoma: a report of four cases. *Oncol Nurs Forum*, 25: 67-70.
119. de Marie S. (1996) Liposomal and lipid-based formulations of amphotericin B. *Leukemia*, 10 Suppl 2: s93-96.
120. Eckardt JR, Campbell E, Burris HA, Weiss GR, Rodriguez GI, Fields SM, Thurman AM, Peacock NW, Cobb P, Rothenberg ML, et al. (1994) A phase II trial of DaunoXome, liposome-encapsulated daunorubicin, in patients with metastatic adenocarcinoma of the colon. *Am J Clin Oncol*, 17: 498-501.
121. Fossa SD, Aass N, Paro G. (1998) A phase II study of DaunoXome in advanced urothelial transitional cell carcinoma. *Eur J Cancer*, 34: 1131-1132.

122. Gill PS, Espina BM, Muggia F, Cabriales S, Tulpule A, Esplin JA, Liebman HA, Forssen E, Ross ME, Levine AM. (1995) Phase I/II clinical and pharmacokinetic evaluation of liposomal daunorubicin. *J Clin Oncol*, 13: 996-1003.
123. Gill PS, Wernz J, Scadden DT, Cohen P, Mukwaya GM, von Roenn JH, Jacobs M, Kempin S, Silverberg I, Gonzales G, Rarick MU, Myers AM, Shepherd F, Sawka C, Pike MC, Ross ME. (1996) Randomized phase III trial of liposomal daunorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J Clin Oncol*, 14: 2353-2364.
124. Girard PM, Bouchaud O, Goetschel A, Mukwaya G, Eestermans G, Ross M, Rozenbaum W, Saimot AG. (1996) Phase II study of liposomal encapsulated daunorubicin in the treatment of AIDS-associated mucocutaneous Kaposi's sarcoma. *AIDS*, 10: 753-757.
125. Guaglianone P, Chan K, DelaFlor-Weiss E, Hanisch R, Jeffers S, Sharma D, Muggia F. (1994) Phase I and pharmacologic study of liposomal daunorubicin (DaunoXome). *Invest New Drugs*, 12: 103-110.
126. Money-Kyrle JF, Bates F, Ready J, Gazzard BG, Phillips RH, Boag FC. (1993) Liposomal daunorubicin in advanced Kaposi's sarcoma: a phase II study. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 5: 367-371.
127. Richardson DS, Kelsey SM, Johnson SA, Tighe M, Cavenagh JD, Newland AC. (1997) Early evaluation of liposomal daunorubicin (DaunoXome, Nexstar) in the treatment of relapsed and refractory lymphoma. *Invest New Drugs*, 15: 247-253.
128. Janssen-Cilag. (2010) Doxil. Package insert.
129. Andersen AJ, Hashemi SH, Andresen TL, Hunter AC, Moghimi SM. (2009) Complement: alive and kicking nanomedicines. *J Biomed Nanotechnol*, 5: 364-372.
130. Andersen AJ, Robinson JT, Dai H, Hunter AC, Andresen TL, Moghimi SM. (2013) Single-walled carbon nanotube surface control of complement recognition and activation. *ACS Nano*, 7: 1108-1119.
131. Lieberman P. (1991) Anaphylactoid reactions to radiocontrast material. *Clin Rev Allergy*, 9: 319-338.

132. Moghimi SM, Andersen AJ, Hashemi SH, Lettiero B, Ahmadvand D, Hunter AC, Andresen TL, Hamad I, Szebeni J. (2010) Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: the challenges ahead. *J Control Release*, 146: 175-181.
133. Moghimi SM, Hamad I. (2008) Liposome-mediated triggering of complement cascade. *J Liposome Res*, 18: 195-209.
134. Moghimi SM, Szebeni J. (2003) Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Prog Lipid Res*, 42: 463-478.
135. Qiu S, Liu Z, Hou L, Li Y, Wang J, Wang H, Du W, Wang W, Qin Y. (2013) Complement activation associated with polysorbate 80 in beagle dogs. *Int Immunopharmacol*, 15: 144-149.
136. Szebeni J. (1998) The interaction of liposomes with the complement system. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 15: 57-88.
137. Szebeni J. (2001) Complement activation-related pseudoallergy caused by liposomes, micellar carriers of intravenous drugs, and radiocontrast agents. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 18: 567-606.
138. Szebeni J. *The Complement System: Novel Roles in Health and Disease*. Springer, Boston, 2004: 512.
139. Szebeni J. (2004) Hypersensitivity reactions to radiocontrast media: the role of complement activation. *Curr Allergy Asthma Rep*, 4: 25-30.
140. Szebeni J, Alving CR, Rosivall L, Bungler R, Baranyi L, Bedocs P, Toth M, Barenholz Y. (2007) Animal models of complement-mediated hypersensitivity reactions to liposomes and other lipid-based nanoparticles. *J Liposome Res*, 17: 107-117.
141. Szebeni J, Alving CR, Savay S, Barenholz Y, Prieu A, Danino D, Talmon Y. (2001) Formation of complement-activating particles in aqueous solutions of Taxol: possible role in hypersensitivity reactions. *Int Immunopharmacol*, 1: 721-735.
142. Szebeni J, Bedocs P, Rozsnyay Z, Weiszhar Z, Urbanics R, Rosivall L, Cohen R, Garbuzenko O, Bathori G, Toth M, Bungler R, Barenholz Y. (2012) Liposome-induced complement activation and related cardiopulmonary distress

- in pigs: factors promoting reactogenicity of Doxil and AmBisome. *Nanomedicine*, 8: 176-184.
143. Szebeni J, Bedocs P, Urbanics R, Bunger R, Rosivall L, Toth M, Barenholz Y. (2012) Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: a porcine model. *J Control Release*, 160: 382-387.
144. Szebeni J, Muggia FM, Alving CR. (1998) Complement activation by Cremophor EL as a possible contributor to hypersensitivity to paclitaxel: an in vitro study. *J Natl Cancer Inst*, 90: 300-306.
145. Weiszhar Z, Czucz J, Revesz C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. (2012) Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur J Pharm Sci*, 45: 492-498.
146. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Milosevits J, Bodo M, Bunger R, Alving CR. (2003) The interaction of liposomes with the complement system: in vitro and in vivo assays. *Methods Enzymol*, 373: 136-154.
147. Cheifetz A, Mayer L. (2005) Monoclonal antibodies, immunogenicity, and associated infusion reactions. *Mt Sinai J Med*, 72: 250-256.
148. Demoor PA, Matusov Y, Kelly C, Kolan S, Barnachea L, Bazhenova LA. (2011) A retrospective review of the frequency and nature of acute hypersensitivity reactions at a medium-sized infusion center: comparison to reported values and inconsistencies found in literature. *J Cancer*, 2: 153-164.
149. Gomes ER, Demoly P. (2005) Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 5: 309-316.
150. Lenz HJ. (2007) Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions. *Oncologist*, 12: 601-609.
151. Naisbitt DJ, Pirmohamed M, Park BK. (2003) Immunopharmacology of hypersensitivity reactions to drugs. *Curr Allergy Asthma Rep*, 3: 22-29.
152. Vogel WH. (2010) Infusion reactions: diagnosis, assessment, and management. *Clin J Oncol Nurs*, 14: E10-21.
153. Diminsky D, Moav N, Gorecki M, Barenholz Y. (1999) Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. *Vaccine*, 18: 3-17.

154. Barenholz Y. Handbook of harnessing biomaterials in nanomedicine: preparation, toxicity, and applications. . Peers D. Pan Stanford Publishing Singapore, 2012: 335-398.
155. Ciftcioglu N, McKay DS, Mathew G, Kajander EO. (2006) Nanobacteria: fact or fiction? Characteristics, detection, and medical importance of novel self-replicating, calcifying nanoparticles. *J Investig Med*, 54: 385-394.
156. Norman DG, Barlow PN, Baron M, Day AJ, Sim RB, Campbell ID. (1991) Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J Mol Biol*, 219: 717-725.
157. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. (2011) Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: prediction and prevention. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 1020-1030.
158. Harris C, Morgan B. The Complement System: Novel Roles in Health and Disease. Szebeni J. Springer, Boston, 2004: 129-166.
159. Sherer Y, Shoenfeld Y. (2001) Antiphospholipid syndrome, antiphospholipid antibodies, and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*, 3: 328-333.
160. Chonn A, Cullis PR, Devine DV. (1991) The role of surface charge in the activation of the classical and alternative pathways of complement by liposomes. *J Immunol*, 146: 4234-4241.
161. Hamad I, Al-Hanbali O, Hunter AC, Rutt KJ, Andresen TL, Moghimi SM. (2010) Distinct polymer architecture mediates switching of complement activation pathways at the nanosphere-serum interface: implications for stealth nanoparticle engineering. *ACS Nano*, 4: 6629-6638.
162. Hamad I, Christy Hunter A, Rutt KJ, Liu Z, Dai H, Moein Moghimi S. (2008) Complement activation by PEGylated single-walled carbon nanotubes is independent of C1q and alternative pathway turnover. *Mol Immunol*, 45: 3797-3803.
163. Coombs R, Gell P. *Clinical Aspects of Immunology*. Coombs R, Gell P. Davis, Philadelphia, 1968: 575-596.
164. Gell P, Coombs R. *Clinical Aspects of Immunology*. Gell P, Coombs R. Blackwell, Oxford, 1963: 317.

165. Aronson JK, Ferner RE. (2003) Joining the DoTS: new approach to classifying adverse drug reactions. *BMJ*, 327: 1222-1225.
166. Demoly P, Kropf R, Bircher A, Pichler WJ. (1999) Drug hypersensitivity: questionnaire. EAACI interest group on drug hypersensitivity. *Allergy*, 54: 999-1003.
167. Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. (2004) Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *J Allergy Clin Immunol*, 113: 832-836.
168. Pichler WJ, Naisbitt DJ, Park BK. (2011) Immune pathomechanism of drug hypersensitivity reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 127: S74-81.
169. Zuberbier T. (1999) Pseudoallergy or nonallergic hypersensitivity. *Allergy*, 54: 397-398.
170. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G. (2001) Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*, 158: 43-49.
171. van Beers MM, Bardor M. (2012) Minimizing immunogenicity of biopharmaceuticals by controlling critical quality attributes of proteins. *Biotechnol J*, 7: 1473-1484.
172. Haxby JA, Gotze O, Muller-Eberhard HJ, Kinsky SC. (1969) Release of trapped marker from liposomes by the action of purified complement components. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64: 290-295.
173. Haxby JA, Kinsky CB, Kinsky SC. (1968) Immune response of a liposomal model membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61: 300-307.
174. Kinsky SC, Haxby JA, Zopf DA, Alving CR, Kinsky CB. (1969) Complement-dependent damage to liposomes prepared from pure lipids and Forssman hapten. *Biochemistry*, 8: 4149-4158.
175. Dervaderics M, Hidvegi T, Schmidt B, Fust G, Varga L. (1998) Ragweed allergy: correlation between skin reactivity and in vitro complement activation. *Immunol Lett*, 64: 119-123.

176. Plank C, Tang MX, Wolfe AR, Szoka FC, Jr. (1999) Branched cationic peptides for gene delivery: role of type and number of cationic residues in formation and in vitro activity of DNA polyplexes. *Hum Gene Ther*, 10: 319-332.
177. Merkel OM, Urbanics R, Bedocs P, Rozsnyay Z, Rosivall L, Toth M, Kissel T, Szebeni J. (2011) In vitro and in vivo complement activation and related anaphylactic effects associated with polyethylenimine and polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol) block copolymers. *Biomaterials*, 32: 4936-4942.
178. Moghimi SM, Hamad I, Andresen TL, Jorgensen K, Szebeni J. (2006) Methylation of the phosphate oxygen moiety of phospholipid-methoxy(polyethylene glycol) conjugate prevents PEGylated liposome-mediated complement activation and anaphylatoxin production. *FASEB J*, 20: 2591-2593.
179. Sou K, Tsuchida E. (2008) Electrostatic interactions and complement activation on the surface of phospholipid vesicle containing acidic lipids: effect of the structure of acidic groups. *Biochim Biophys Acta*, 1778: 1035-1041.
180. Pedersen MB, Zhou X, Larsen EK, Sorensen US, Kjems J, Nygaard JV, Nyengaard JR, Meyer RL, Boesen T, Vorup-Jensen T. (2010) Curvature of synthetic and natural surfaces is an important target feature in classical pathway complement activation. *J Immunol*, 184: 1931-1945.
181. Szebeni J, Wassef NM, Hartman KR, Rudolph AS, Alving CR. (1997) Complement activation in vitro by the red cell substitute, liposome-encapsulated hemoglobin: mechanism of activation and inhibition by soluble complement receptor type 1. *Transfusion*, 37: 150-159.
182. Bonte F, Juliano RL. (1986) Interactions of liposomes with serum proteins. *Chem Phys Lipids*, 40: 359-372.
183. Cunningham CM, Kingzette M, Richards RL, Alving CR, Lint TF, Gewurz H. (1979) Activation of human complement by liposomes: a model for membrane activation of the alternative pathway. *J Immunol*, 122: 1237-1242.
184. Funato K, Yoda R, Kiwada H. (1992) Contribution of complement system on destabilization of liposomes composed of hydrogenated egg phosphatidylcholine in rat fresh plasma. *Biochim Biophys Acta*, 1103: 198-204.

185. Harashima H, Sakata K, Funato K, Kiwada H. (1994) Enhanced hepatic uptake of liposomes through complement activation depending on the size of liposomes. *Pharm Res*, 11: 402-406.
186. Hashimoto Y, Sugawara M, Endoh H. (1983) Coating of liposomes with subunits of monoclonal IgM antibody and targeting of the liposomes. *J Immunol Methods*, 62: 155-162.
187. Masaki T, Okada N, Yasuda R, Okada H. (1989) Assay of complement activity in human serum using large unilamellar liposomes. *J Immunol Methods*, 123: 19-24.
188. Mold C, Gewurz H. (1980) Activation of human complement by liposomes: serum factor requirement for alternative pathway activation. *J Immunol*, 125: 696-700.
189. Okada N, Yasuda T, Tsumita T, Okada H. (1983) Membrane sialoglycolipids regulate the activation of alternative complement pathway by liposomes containing trinitrophenylaminocaproyldipalmitoylphosphatidylethanolamine. *Immunology*, 48: 129-140.
190. Ozato K, Ziegler HK, Henney CS. (1978) Liposomes as Model Membrane Systems for Immune Attack .2. Interaction of Complement and K-Cell Populations with Immobilized Liposomes. *J Immunol*, 121: 1383-1388.
191. Richards RL, Habbersett RC, Scher I, Janoff AS, Schieren HP, Mayer LD, Cullis PR, Alving CR. (1986) Influence of Vesicle Size on Complement-Dependent Immune Damage to Liposomes. *Biochim Biophys Acta*, 855: 223-230.
192. Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, Liebes L, Rafique NM, Alving CR, Muggia FM. (2003) Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*, 14: 1430-1437.
193. Szebeni J, Bedocs P, Csukas D, Rosivall L, Bungler R, Urbanics R. (2012) A porcine model of complement-mediated infusion reactions to drug carrier nanosystems and other medicines. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 1706-1716.

194. Lazarou J, Pomeranz BH, Corey PN. (1998) Incidence of adverse drug reactions in hospitalized patients: a meta-analysis of prospective studies. *JAMA*, 279: 1200-1205.
195. Harker LA, Ratner BD, Didisheim P. (1993) Cardiovascular biomaterials and biocompatibility—a guide to the study of blood-matterial interactions. *Cardiovasc Pathol*, 2(3) (suppl.): 1S – 224S.
196. Svensson CK. (2006) Commentary: Drug hypersensitivity - Where do we stand? *Aaps Journal*, 8: E236-E238.
197. Gabizon A, Muggia F. Long-Circulating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics. Woodle M, Storm G. Landes Bioscience, Austin, 1998: 165-174.
198. Genovese A, Stellato C, Patella V, Lamparter-Schummert B, de Crescenzo G, Adt M, Marone G. (1996) Contrast media are incomplete secretagogues acting on human basophils and mast cells isolated from heart and lung, but not skin tissue. *Int J Clin Lab Res*, 26: 192-198.
199. Lieberman P. (1989) The use of antihistamines in the prevention and treatment of anaphylaxis and anaphylactoid reactions. *J Allergy Clin Immunol*, 86: 684-686.
200. Knol EF, Mul FP, Lie WJ, Verhoeven AJ, Roos D. (1996) The role of basophils in allergic disease. *Eur Respir J Suppl*, 22: 126s-131s.
201. Winkler GC. (1988) Pulmonary intravascular macrophages in domestic animal species: review of structural and functional properties. *Am J Anat*, 181: 217-234.
202. Koide H, Asai T, Hatanaka K, Urakami T, Ishii T, Kenjo E, Nishihara M, Yokoyama M, Ishida T, Kiwada H, Oku N. (2008) Particle size-dependent triggering of accelerated blood clearance phenomenon. *Int J Pharm*, 362: 197-200.
203. (2002/ (R) 10 March 2009) Biological evaluation of medical devices — Part 4: selection of tests for interaction with blood. 10993-4.
204. (1984) Standard Practice for Testing for Alternative Pathway Complement Activation in Serum by Solid Materials.
205. (1984) Standard Practice for Testing for Whole Complement Activation in Serum by Solid Materials.

206. Hastings KL. (2002) Implications of the new FDA/CDER immunotoxicology guidance for drugs. *Int Immunopharmacol*, 2: 1613-1618.
207. (2011) Data Requirements for Intravenous Liposomal Products Developed with Reference to an Innovator Liposomal Product.
208. Mollnes TE, Brekke OL, Fung M, Fure H, Christiansen D, Bergseth G, Videm V, Lappegard KT, Kohl J, Lambris JD. (2002) Essential role of the C5a receptor in E coli-induced oxidative burst and phagocytosis revealed by a novel lepirudin-based human whole blood model of inflammation. *Blood*, 100: 1869-1877.
209. Marceau F, Lundberg C, Hugli TE. (1987) Effects of the Anaphylatoxins on Circulation. *Immunopharmacology*, 14: 67-84.
210. Hugli TE. (1984) Structure and function of the anaphylatoxins. *Springer Semin Immunopathol*, 7: 193-219.
211. Hugli TE, Morgan EL. (1984) Mechanisms of leukocyte regulation by complement-derived factors. *Contemp Top Immunobiol*, 14: 109-153.
212. Szebeni J. (2014) Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals. *Mol Immunol*, 61: 163-173.
213. Baur X, Dorsch W, Becker T. (1980) Levels of complement factors in human serum during immediate and late asthmatic reactions and during acute hypersensitivity pneumonitis. *Allergy*, 35: 383-390.
214. Benoit Y, Chadenson O, Ducloux B, Veysseyre CM, Bringuier JP, Veysseyre C, Descotes J. (1983) Hypersensitivity reactions to Althesin infusion: measurement of complement involvement. *Anaesthesia*, 38: 1079-1081.
215. Hakim RM, Breillatt J, Lazarus JM, Port FK. (1984) Complement activation and hypersensitivity reactions to dialysis membranes. *N Engl J Med*, 311: 878-882.
216. Stimler-Gerard NP. (1985) Role of the complement anaphylatoxins in inflammation and hypersensitivity reactions in the lung. *Surv Synth Pathol Res*, 4: 423-442.
217. Regal JF. (1989) The role of C5a in hypersensitivity reactions in the lung. *Pulm Pharmacol*, 2: 3-12.

218. Lemke HD, Heidland A, Schaefer RM. (1990) Hypersensitivity reactions during haemodialysis: role of complement fragments and ethylene oxide antibodies. *Nephrol Dial Transplant*, 5: 264-269.
219. Anania A, Massobrio AM, Cascio B, Bosso E, Cascio G. (1998) [Components of complement in patients with immediate hypersensitivity]. *Minerva Med*, 89: 77-81.
220. Macdougall IC, Vernon K. (2017) Complement Activation-Related Pseudo-Allergy: A Fresh Look at Hypersensitivity Reactions to Intravenous Iron. *Am J Nephrol*, 45: 60-62.
221. van der Kolk LE, Grillo-Lopez AJ, Baars JW, Hack CE, van Oers MH. (2001) Complement activation plays a key role in the side-effects of rituximab treatment. *Br J Haematol*, 115: 807-811.
222. Rodriguez-Sanz A, Sanchez-Villanueva R, Dominguez-Ortega J, Fiandor AM, Ruiz MP, Trocoli F, Diaz-Tejeiro R, Cadenillas C, Gonzalez E, Martinez V, Lopez-Trascasa M, Quirce S, Selgas R, Bellon T. (2017) Mechanisms Involved in Hypersensitivity Reactions to Polysulfone Hemodialysis Membranes. *Artif Organs*, 41: E285-E295.
223. Kozma GT, Mészáros T, Weiszhar Z, Schneider T, Rosta A, Urbanics R, Rosivall L, Szebeni J. (2015) Variable association of complement activation by rituximab and paclitaxel in cancer patients in vivo and in their screening serum in vitro with clinical manifestations of hypersensitivity: a pilot study. *Eur J Nanomed*, 7: 289-301.
224. Veronese FM, Pasut G. (2005) PEGylation, successful approach to drug delivery. *Drug Discov Today*, 10: 1451-1458.
225. Allen TM, Hansen C. (1991) Pharmacokinetics of stealth versus conventional liposomes: effect of dose. *Biochim Biophys Acta*, 1068: 133-141.
226. Papahadjopoulos D, Allen TM, Gabizon A, Mayhew E, Matthay K, Huang SK, Lee KD, Woodle MC, Lasic DD, Redemann C, et al. (1991) Sterically stabilized liposomes: improvements in pharmacokinetics and antitumor therapeutic efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 11460-11464.
227. Cummins P, O'Connor B. *Protein Chromatography*. Walls D, Loughran S. Humana Press, New York, 2011: 431-437.

228. Hey MJ, Jackson DP, Yan H. (2005) The salting-out effect and phase separation in aqueous solutions of electrolytes and poly(ethylene glycol). *Polymer*, 46: 2567-2572.
229. Karmali PP, Simberg D. (2011) Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv*, 8: 343-357.
230. Ingen-Housz-Oro S, Pham-Ledard A, Brice P, Lebrun-Vignes B, Zehou O, Reitter D, Ram-Wolff C, Dupin N, Bagot M, Chosidow O, Beylot-Barry M. (2017) Immediate hypersensitivity reaction to pegylated liposomal doxorubicin: management and outcome in four patients. *Eur J Dermatol*, 27: 271-274.
231. Ganson NJ, Povsic TJ, Sullenger BA, Alexander JH, Zelenkofske SL, Sailstad JM, Rusconi CP, Hershfield MS. (2016) Pre-existing anti-polyethylene glycol antibody linked to first-exposure allergic reactions to pegnivacogin, a PEGylated RNA aptamer. *J Allergy Clin Immunol*, 137: 1610-1613.
232. Hershfield MS, Ganson NJ, Kelly SJ, Scarlett EL, Jagers DA, Sundry JS. (2014) Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients. *Arthritis Res Ther*, 16.
233. Verhoef JJF, Carpenter JF, Anchordoquy TJ, Schellekens H. (2014) Potential induction of anti-PEG antibodies and complement activation toward PEGylated therapeutics. *Drug Discov Today*, 19: 1945-1952.
234. Brinks V, Weinbuch D, Baker M, Dean Y, Stas P, Kostense S, Rup B, Jiskoot W. (2013) Preclinical Models Used for Immunogenicity Prediction of Therapeutic Proteins. *Pharm Res*, 30: 1719-1728.
235. Judge A, McClintock K, Phelps JR, Maclachlan I. (2006) Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Mol Ther*, 13: 328-337.
236. Mima Y, Hashimoto Y, Shimizu T, Kiwada H, Ishida T. (2015) Anti-PEG IgM Is a Major Contributor to the Accelerated Blood Clearance of Polyethylene Glycol-Conjugated Protein. *Mol Pharm*, 12: 2429-2435.

237. Hashimoto Y, Shimizu T, Mima Y, Abu Lila AS, Ishida T, Kiwada H. (2014) Generation, characterization and in vivo biological activity of two distinct monoclonal anti-PEG IgMs. *Toxicol Appl Pharmacol*, 277: 30-38.
238. Shimizu T, Ishida T, Kiwada H. (2013) Transport of PEGylated liposomes from the splenic marginal zone to the follicle in the induction phase of the accelerated blood clearance phenomenon. *Immunobiology*, 218: 725-732.
239. Moghimi SM. (2018) Nanomedicine safety in preclinical and clinical development: focus on idiosyncratic injection/infusion reactions. *Drug Discov Today*, 23: 1034-1042.
240. Wibroe PP, Anselmo AC, Nilsson PH, Sarode A, Gupta V, Urbanics R, Szebeni J, Hunter AC, Mitragotri S, Mollnes TE, Moghimi SM. (2017) Bypassing adverse injection reactions to nanoparticles through shape modification and attachment to erythrocytes. *Nat Nanotechnol*, 12: 589-594.
241. MacDonald RC, MacDonald RI, Menco BP, Takeshita K, Subbarao NK, Hu LR. (1991) Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*, 1061: 297-303.
242. Malvern. (2015) Dynamic light scattering - common terms defined.
243. Iraolagoitia XLR, Martini MF. (2010) Ca²⁺ adsorption to lipid membranes and the effect of cholesterol in their composition. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 76: 215-220.
244. Schilt Y, Berman T, Wei X, Barenholz Y, Raviv U. (2016) Using solution X-ray scattering to determine the high-resolution structure and morphology of PEGylated liposomal doxorubicin nanodrugs. *Biochim Biophys Acta*, 1860: 108-119.
245. Szebeni J. (2018) Mechanism of nanoparticle-induced hypersensitivity in pigs: complement or not complement? *Drug Discov Today*, 23: 487-492.
246. Urbanics R, Bedocs P, Szebeni J. (2015) Lessons learned from the porcine CARPA model: constant and variable responses to different nanomedicines and administration protocols. *Eur J Nanomed*, 7: 219-231.
247. Jansen JH, Hogasen K, Mollnes TE. (1993) Extensive Complement Activation in Hereditary Porcine Membranoproliferative Glomerulonephritis Type-Ii (Porcine Dense Deposit Disease). *Am J Pathol*, 143: 1356-1365.

248. Castiblanco-Valencia MM, Fraga TR, da Silva LB, Monaris D, Abreu PAE, Strobel S, Jozsi M, Isaac L, Barbosa AS. (2012) Leptospiral Immunoglobulin-like Proteins Interact With Human Complement Regulators Factor H, FHL-1, FHR-1, and C4BP. *J Infect Dis*, 205: 995-1004.
249. Hebecker M, Alba-Dominguez M, Roumenina LT, Reuter S, Hyvarinen S, Dragon-Durey MA, Jokiranta TS, Sanchez-Corral P, Jozsi M. (2013) An Engineered Construct Combining Complement Regulatory and Surface-Recognition Domains Represents a Minimal-Size Functional Factor H. *Journal of Immunology*, 191: 912-921.
250. Polysciences. (2018) Technical datasheet of carboxylated polystyrene nanoparticles.
251. Turjeman K, Bavli Y, Kizelsztein P, Schilt Y, Allon N, Katzir TB, Sasson E, Raviv U, Ovadia H, Barenholz Y. (2015) Nano-Drugs Based on Nano Sterically Stabilized Liposomes for the Treatment of Inflammatory Neurodegenerative Diseases. *Plos One*, 10.
252. Wei XH, Cohen R, Barenholz Y. (2016) Insights into composition/structure/function relationships of Doxil (R) gained from "high-sensitivity" differential scanning calorimetry. *Eur J Pharm Biopharm*, 104: 260-270.
253. Barenholz Y, Amselem S. *Liposome Technology*. Gregoriadis G. CRC press, Boca Raton, 1993: 527-616.
254. Talmon Y. (1996) Transmission electron microscopy of complex fluids: The state of the art. *Ber Bunsenges Phys Chem*, 100: 364-372.
255. Muller RH, Ruhl D, Luck M, Paulke BR. (1997) Influence of fluorescent labelling of polystyrene particles on phagocytic uptake, surface hydrophobicity, and plasma protein adsorption. *Pharm Res*, 14: 18-24.
256. Drin G, Morello V, Casella JF, Gounon P, Antonny B. (2008) Asymmetric tethering of flat and curved lipid membranes by a golgin. *Science*, 320: 670-673.
257. Barenholz Y. (2001) Liposome application: problems and prospects. *Curr Opin Colloid Interface Sci*, 6: 66-77.
258. Reimhult E, Hook F, Kasemo B. (2003) Intact vesicle adsorption and supported biomembrane formation from vesicles in solution: Influence of surface

- chemistry, vesicle size, temperature, and osmotic pressure. *Langmuir*, 19: 1681-1691.
259. Seantier B, Kasemo B. (2009) Influence of Mono- And Divalent Ions on the Formation of Supported Phospholipid Bilayers via Vesicle Adsorption. *Langmuir*, 25: 5767-5772.
260. Jass J, Tjarnhage T, Puu G. (2000) From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: An atomic force microscopy study. *Biophys J*, 79: 3153-3163.
261. Jass J, Tjarnhage T, Puu G. (2003) Atomic force microscopy imaging of liposomes. *Methods Enzymol*, 367: 199-213.
262. Richter RP, Brisson AR. (2005) Following the formation of supported lipid bilayers on mica: A study combining AFM, QCM-D, and ellipsometry. *Biophys J*, 88: 3422-3433.
263. Wu LB, Zhang J, Watanabe W. (2011) Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev*, 63: 456-469.
264. Varga Z, Mihaly J, Berenyi S, Bota A. (2013) Structural characterization of the poly(ethylene glycol) layer of sterically stabilized liposomes by means of FTIR spectroscopy. *Eur Polym J*, 49: 2415-2421.
265. Queiroz JA, Tomaz CT, Cabral JMS. (2001) Hydrophobic interaction chromatography of proteins. *J Biotechnol*, 87: 143-159.
266. Rozenberg M, Loewenschuss A, Marcus Y. (1998) IR spectra and hydration of short-chain polyethyleneglycols. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 54: 1819-1826.
267. Ananthapadmanabhan KP, Goddard ED. (1987) Aqueous Biphasic Formation in Polyethylene Oxide - Inorganic Salt Systems. *Langmuir*, 3: 25-31.
268. Prieu A, Samuni A, Tirosh O, Barenholz Y. Targeting of Drugs 6 NATO ASI Series (Series A: Life Sciences). Gregoriadis G, McCormack B. Springer, Boston, MA, 1998: 147-167.
269. Povsic TJ, Lawrence MG, Lincoff AM, Mehran R, Rusconi CP, Zelenkofske SL, Huang Z, Sailstad J, Armstrong PW, Steg PG, Bode C, Becker RC, Alexander JH, Adkinson NF, Levinson AI, Investigators R-P. (2016) Pre-existing anti-PEG antibodies are associated with severe immediate allergic

- reactions to pegnivacogin, a PEGylated aptamer. *J Allergy Clin Immunol*, 138: 1712-1715.
270. Poppenborg SM, Wittmann J, Walther W, Brandenburg G, Krahmer R, Baumgart J, Leenders F. (2016) Impact of anti-PEG IgM antibodies on the pharmacokinetics of pegylated asparaginase preparations in mice. *Eur J Pharm Sci*, 91: 122-130.
271. Bani D, Nistri S, Mannaioni PF, Masini E. (2006) Cardiac anaphylaxis: Pathophysiology and therapeutic perspectives. *Curr Allergy Asthma Rep*, 6: 14-19.
272. Arvedson T, O'Kelly J, Yang BB. (2015) Design Rationale and Development Approach for Pegfilgrastim as a Long-Acting Granulocyte Colony-Stimulating Factor. *Biodrugs*, 29: 185-198.
273. Hanna GG, Edgar D, Clarke JEM. (2008) A case of prolonged type 1 hypersensitivity reaction to pegfilgrastim. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 20: 315-316.
274. Dadla A, Tannenbaum S, Yates B, Holle L. (2015) Delayed hypersensitivity reaction related to the use of pegfilgrastim. *J Oncol Pharm Pract*, 21: 474-477.
275. van den Hoven JM, Nemes R, Metselaar JM, Nuijen B, Beijnen JH, Storm G, Szebeni J. (2013) Complement activation by PEGylated liposomes containing prednisolone. *Eur J Pharm Sci*, 49: 265-271.
276. Garbuzenko O, Zalipsky S, Qazen M, Barenholz Y. (2005) Electrostatics of PEGylated micelles and liposomes containing charged and neutral lipopolymers. *Langmuir*, 21: 2560-2568.
277. Foley JH, Peterson EA, Lei V, Wan LW, Krisinger MJ, Conway EM. (2015) Interplay between fibrinolysis and complement: plasmin cleavage of iC3b modulates immune responses. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 13: 610-618.
278. Manning ML, Williams SA, Jelinek CA, Kostova MB, Denmeade SR. (2013) Proteolysis of complement factors iC3b and C5 by the serine protease prostate-specific antigen in prostatic fluid and seminal plasma. *J Immunol*, 190: 2567-2574.

279. Al-Hanbali O, Rutt KJ, Sarker DK, Hunter AC, Moghimi SM. (2006) Concentration dependent structural ordering of poloxamine 908 on polystyrene nanoparticles and their modulatory role on complement consumption. *J Nanosci Nanotechnol*, 6: 3126-3133.
280. Cacace MG, Landau EM, Ramsden JJ. (1997) The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Q Rev Biophys*, 30: 241-277.
281. Jackman JA, Mészáros T, Fulop T, Urbanics R, Szabeni J, Cho NJ. (2016) Comparison of complement activation-related pseudoallergy in miniature and domestic pigs: foundation of a validatable immune toxicity model. *Nanomedicine*, 12: 933-943.

10. Saját publikációk

10.1 Disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- 1) *Bozó T, ***Mészáros T**, Mihály J, Bóta A, Kellermayer MSZ, Szebeni J, Kálmán B. (2016) Aggregation of PEGylated liposomes driven by hydrophobic forces. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 147: 467-474. IF: 3,887
- 2) **Mészáros T**, Csincsi ÁI, Uzonyi B, Hebecker M, Fülöp TG, Erdei A, Szebeni J, Józsi M. (2016) Factor H inhibits complement activation induced by liposomal and micellar drugs and the therapeutic antibody rituximab in vitro. *Nanomedicine*, 12(4): 1023-1031. IF: 5,720
- 3) ***Mészáros T**, *Kozma GT, Shimizu T, Miyahara K, Turjeman K, Ishida T, Barenholz Y, Urbanics R, Szebeni J. (2018) Involvement of complement activation in the pulmonary vasoactivity of polystyrene nanoparticles in pigs: Unique surface properties underlying alternative pathway activation and instant opsonization. *Int J Nanomed*, 13: 6345-6357. IF: 4,370 (2017)

*Megosztott első szerzőség

10.2 Disszertációtól független közlemények

- 1) **Mészáros T**, Füst G, Farkas H, Jakab L, Temesszentandrás G, Nagy G, Kiss E, Gergely P, Zeher M, Griger Z, Czirják L, Hóbor R, Haris A, Polner K, Varga L. (2010) C1-inhibitor autoantibodies in SLE. *Lupus*, 19(5): 634-8. IF: 2,600
- 2) Kocsis J, **Mészáros T**, Madaras B, Tóth EK, Kamondi S, Gál P, Varga L, Prohászka Z, Füst G. (2011) High levels of acute phase proteins and soluble 70 kDa heat shock proteins are independent and additive risk factors for mortality in colorectal cancer. *Cell Stress Chaperones*, 16(1): 49-55. IF: 3,013
- 3) Kuznetsova NR, Sevrin C, Lespineux D, Bovin NV, Vodovozova EL, **Mészáros T**, Szebeni J, Grandfils C. (2012) Hemocompatibility of liposomes loaded with lipophilic prodrugs of methotrexate and melphalan in the lipid bilayer. *J Control Release*, 160(2): 394-400. IF: 7,633
- 4) **Mészáros T**, Szénási G, Rosivall L, Szebeni J, Dézsi L. (2015) Paradoxical rise of hemolytic complement in the blood of mice during zymosan- and liposomeinduced CARPA: a pilot study. *Eur J Nanomed*, 7(3): 257–262.

- 5) Kozma GT, **Mészáros T**, Weiszhar Zs, Schneider T, Rosta A, Urbanics R, Rosivall L, Szebeni J. (2015) Variable association of complement activation by rituximab and paclitaxel in cancer patients in vivo and in their screening serum in vitro with clinical manifestations of hypersensitivity: a pilot study. *Eur J Nanomed*, 7(4): 289–301.
- 6) Bugna S, Buscema M, Matviyiv S, Urbanics R, Weinberger A, **Mészáros T**, Szebeni J, Zumbuehl A, Saxer T, Müller B. (2016) Surprising lack of liposome-induced complement activation by artificial 1,3-diamidophospholipids in vitro. *Nanomedicine*, 12(3): 845-849. IF: 5,720
- 7) Jackman JA, **Mészáros T**, Fülöp T, Urbanics R, Szebeni J, Cho NJ. (2016) Comparison of complement activation-related pseudoallergy in miniature and domestic pigs: foundation of a validatable immune toxicity model. *Nanomedicine*, 12(4): 933-943 IF: 5,720
- 8) Buscema M, Matviyiv S, **Mészáros T**, Gerganova G, Weinberger A, Mettal U, Mueller D, Neuhaus F, Stalder E, Ishikawa T, Urbanics R, Saxer T, Pfohl T, Szebeni J, Zumbuehl A, Müller B. (2017) Immunological response to nitroglycerin-loaded shear-responsive liposomes in vitro and in vivo. *J Control Release*, 264: 14-23. IF: 7,877 (2017)
- 9) Fülöp T, Nemes R, **Mészáros T**, Urbanics R, Kok RJ, Jackman JA, Cho NJ, Storm G, Szebeni J. (2018) Complement activation in vitro and reactogenicity of low-molecular weight dextran-coated SPIONs in the pig CARPA model: Correlation with physicochemical features and clinical information. *J Control Release*, 270: 268-274. IF: 7,877 (2017)
- 10) Fülöp T, **Mészáros T**, Kozma GT, Szebeni J, Józsi M. (2018) Infusion Reactions Associated with the Medical Application of Monoclonal Antibodies: The Role of Complement Activation and Possibility of Inhibition by Factor H. *Antibodies*, 7(1): 14
- 11) Kovács ÁF, Láng O, Turiák L, Ács A, Kőhidai L, Fekete N, Alasztics B, **Mészáros T**, Buzás EI, Rigó J Jr., Pállinger É. (2018) The impact of circulating preeclampsia-associated extracellular vesicles on the migratory activity and phenotype of THP-1 monocytic cells. *Sci Rep*, 8(1): 5426. IF: 4,122 (2017)

- 12) Matviyiv S, Buscema M, Gerganova G, **Mészáros T**, Kozma GT, Mettal U, Neuhaus F, Ishikawa T, Szebeni J, Zumbuehl A, Müller B. (2018) Immunocompatibility of Rad-PC-Rad liposomes in vitro, based on human complement activation and cytokine release. *Prec Nanomed* 1(1): 43-62.

11. Köszönetnyilvánítás

Külön köszönetet szeretnék mondani témavezetőmnek Szebeni Jánosnak, illetve a disszertáció alapjául szolgáló közlemények munkatársainak, különösképpen Bozó Tamásnak, Kálmán Benedeknek (aki sajnos már nem lehet velünk), Józsi Mihálynak, Kozma Tibor Gergelynek és Urbanics Rudolfnak, akik munkám során mindvégig kiemelten segítettek. Természetesen a publikációkban résztvevő többi embernek is szeretnék köszönetet mondani, mivel nélkülük ezen eredmények nem születhettek volna meg. Mihály Juditnak, Bóta Attilának és Kellermayer Miklós Sándor Zoltánnak az aggregációval kapcsolatos munka miatt, Csincsi Ádámnak, Uzonyi Barbarának, Mario Hebeckernek, Fülöp Gyula Tamásnak és Erdei Annának a H-faktorral kapcsolatos munka miatt, míg Taro Shimizunak, Tatsuhiro Ishidanak, Koga Miyaharanak, Keren Turjemannak és Yechezkel Barenholznak a nanogyöngyökkel kapcsolatos munka miatt tartozom hálával. Ezenkívül a következő embereknek is szeretnék köszönetet mondani, mivel munkájukkal ők is hozzájárultak, hogy a disszertációm elkészüljön: Yaelle Bavli, Dézsi László, Órfi Erik, Tom Erik Mollnes, Rosivall László és Vashegyi Ildikó.