

**SEMMELWEIS EGYETEM**  
**DOKTORI ISKOLA**

**Ph.D. értekezések**

**2664.**

**MILOSEVITS GERGELY**

**A folyadék- és elektrolitháztartás szabályozásának élet- és kórélettana-Keringés és  
vérnyomás szabályozás  
című program**

Programvezető: Dr. Zsembery Ákos, egyetemi docens

Témavezető: Dr. Szabó János, egyetemi tanár

# Lipid alapú orvosi nanopartikulumok által okozott, komplement aktivációhoz köthető hiperszenzitivitási reakciók mechanizmusa és gátlása

Doktori értekezés

**Dr. Milosevits Gergely**

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Szebeni János, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Herszényi László, DSc, egyetemi tanár  
Dr. Farkas Viktor, PhD, tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Losonczy György, DSc, egyetemi tanár

Tagok: Dr. Zsembery Ákos, PhD, egyetemi docens

Dr. Járai Zoltán, PhD, egyetemi docens

Budapest  
2021

**Tartalomjegyzék**

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>3</b>
<b>I. BEVEZETÉS.....</b>	<b>4</b>
I.1. A KLINIKAI GYAKORLATBAN HASZNÁLT, LIPID ALAPÚ NANOHORDOZÓK TÍPUSAI, FEJLŐDÉSÜK .....	4
<i>I.1.1. Liposzómák: liposzómális doxorubicin (Doxil/Caelyx) .....</i>	<i>4</i>
<i>I.1.2. Micellák és lipid-polimer „hibrid” nanohordozók .....</i>	<i>7</i>
<i>I.1.3. Lipid komplexek: amphotericin B lipid komplex (Abelcet) .....</i>	<i>8</i>
<i>I.1.3.1. Abelcet felnőtt- és gyermekgyógyászati felhasználása a klinikai gyakorlatban ..</i>	<i>9</i>
<i>I.1.3.2. Abelcet vizsgálata állatmodellekben .....</i>	<i>11</i>
I.2. LIPID ALAPÚ NANOHORDOZÓK TULAJDONSÁGAINAK VIZSGÁLATI LEHETŐSÉGEI .....	13
I.3. A KOMPLEMENT RENDSZER SZEREPE A LIPID ALAPÚ NANOMEDICINÁLIS GYÓGYSZEREK MELLÉKHATÁSAINAK KIALAKULÁSÁBAN .....	18
<i>I.3.1. A komplement rendszer alkotóelemei, aktiválódásának mechanizmusai és hatásai .....</i>	<i>18</i>
<i>I.3.2. Komplement aktiválódásához kötött pseudoallergiás reakció (CARPA) .....</i>	<i>20</i>
<i>I.3.3. CARPA vizsgálata, szűrésének lehetőségei.....</i>	<i>21</i>
<i>I.3.4. CARPA prevenciója, a komplement aktiváció gátlásának lehetőségei.....</i>	<i>22</i>
<i>I.3.5. Infúzió sebességének hatása az infúziós reakciók, CARPA kialakulására.....</i>	<i>24</i>
<i>I.3.6. Komplement aktivációtól független, lipid alapú nanohordozókhöz köthető egyéb mellékhatások és toxicitás .....</i>	<i>25</i>
I.5. A LIPID ALAPÚ NANOHORDOZÓK FEJLESZTÉSÉNEK LEHETŐSÉGEI.....	26
I.6. EXOSZÓMÁK, MINT TERMÉSZETES NANOHORDOZÓK MODELLEZÉSE A GYÓGYSZERFEJLESZTÉSBEN.....	29
<b>II. CÉLKITŰZÉSEK .....</b>	<b>33</b>
<b>III. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK.....</b>	<b>34</b>
1. LIPOSZÓMÁLIS DOXORUBICIN GYÁRI KÉSZÍTMÉNYÉNEK (CAELYX) VIZSGÁLATA DINAMIKUS FÉNYSZÓRÁS, ÁRAMLÁSI CITOMETRIA ÉS ELEKTRONMIKROSKÓPOS MÓDSZEREKKEL. (64) .....	34
<i>1.1. Caelyx vizsgálata dinamikus fényszóródás (DLS) módszerrel .....</i>	<i>34</i>
<i>1.2. Caelyx vizsgálata, szortírozása áramlási citometriával (FACS).....</i>	<i>35</i>
<i>1.3. Caelyx vizsgálata elektronmikroszkóppal .....</i>	<i>35</i>

2. GYERMEKGYÓGYÁSZATI ONKO-HEMATOLÓGIAI BETEGEK ABELCET KEZELÉSE SORÁN ÉSZLELT MELLÉKHATÁSOK VIZSGÁLATA .....	36
3. ABELCET INFÚZIÓ SEBESSÉG HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA ÁLLATMODELLBEN.....	36
4. A KOMPLEMENT AKTIVÁCIÓ ÉS VÉRKÉP ELTÉRÉSEK VIZSGÁLATA .....	37
5. STATISZTIKAI ANALÍZIS .....	37
<b>IV. EREDMÉNYEK.....</b>	<b>38</b>
1. CAELYX VIZSGÁLATA ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁVAL .....	38
1.1. Becton Dickinson áramlási citométer kalibrálása latex gyöngyökkel.....	38
1.2. Caelyxben látható makrorészecskék észlelése áramlási citométerrel .....	38
1.3. A Caelyxben található szupravezikuláris struktúrák szeparációja és morfológiai analízise .....	39
2. KLINIKAI VIZSGÁLAT ÉS ÁLLATKÍSÉRLETEK .....	41
2.1. Mellékhatások vizsgálata.....	41
2.2. A komplement rendszer szerepe az Abelcet által okozott infúziós reakciós kialakulásában.....	45
2.3. Az Abelcettel okozott CARPA patkány modellje.....	48
<b>V. MEGBESZÉLÉS .....</b>	<b>52</b>
1. CAELYX VIZSGÁLATA DINAMIKUS FÉNYSZÓRÁS, ÁRAMLÁSI CITOMETRIA ÉS ELEKTRONMIKROSKÓP MÓDSZEREK ALKALMAZÁSÁVAL. ....	52
2. KLINIKAI VIZSGÁLAT ÉS ÁLLATMODELL AZ ABELCET ÁLTAL OKOZOTT INFÚZIÓS REAKCIÓK VIZSGÁLATÁRA.....	56
2.1. Állatkísérletes vizsgálat .....	59
3. A CARPA GÁTLÁSÁNAK POTENCIÁLIS LEHETŐSÉGEI ELVÉGZETT VIZSGÁLATOK ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS ALAPJÁN, EXOSZÓMÁK POTENCIÁLIS SZEREPE .....	62
<b>VI. KÖVETKEZTETÉSEK .....</b>	<b>64</b>
<b>VII. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>65</b>
<b>VIII. SUMMARY .....</b>	<b>66</b>
<b>IX. IRODALOMJEGYZÉK.....</b>	<b>67</b>
<b>X. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....</b>	<b>75</b>
1. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK .....	75
2. A DISSZERTÁCIÓTÓL FÜGGETLEN KÖZLEMÉNYEK.....	75
<b>XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>76</b>

## Rövidítések jegyzéke

cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CARPA	complement activation-related pseudoallergy
CMC	critical micelle concentration = kritikus micella koncentráció
CRP	C-reaktív protein
DLS	dinamikus fényszóródás (dynamic light scattering)
DOPC	1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EPC	1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine
FACS	fluorescence-activated cell sorting, áramlási citometria
FasL	Fas ligand
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FSC	forward scatter
i.v.	intravénás
MABP	mean arterial blood pressure = artériás középnyomás
MAC	membránkárosító komplex (membrane attack complex)
MASP	mannose-binding lectin-associated serine protease
MBL	mannose-binding lectin
MHC	major histocompatibility complex
PBS	phosphate-buffered saline
PEG	polietilén-glikol
PEG-DSPE	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)-2000]
PNH	paroximalis nocturnalis hemoglobinuria
Rh	hidrodinamikus részecskeméret
SSC	side scatter
TRPS	tunable resistive pulse sensing
TXB2	tromboxán B2
UV	ultraviolet = ultraibolya

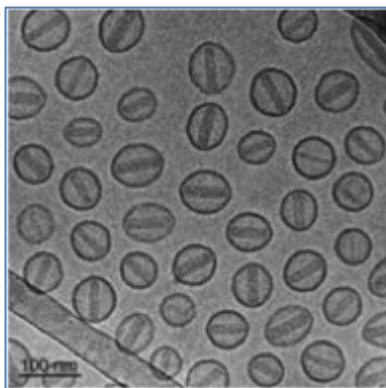
## **I. Bevezetés**

### **I.1. A klinikai gyakorlatban használt, lipid alapú nanohordozók típusai, fejlődésük**

A klinikai használatban hozzáférhető, különböző molekulák szállítására kifejlesztett, úgynevezett „nanohordozók” (1) száma, valamint az azokban használt szerkezeti elemek dinamikusan változó sokszínűsége hozzájárult ahhoz, hogy a nanotechnológia egy rohamosan fejlődő területévé váljon az orvostudománynak. Számos különböző típusú nanogyógyszer létezik, ezek definíció szerint egy mikrométer átmérőnél kisebb részecskék, amelyek passzív vagy aktív módon juttatnak el egy adott molekulát, legtöbbször gyógyszert, egy célterületre az emberi szervezetben. (2) A nanohordozók használata a mellékhatások csökkentését, valamint a terápia hatékonyságának növelését irányozza elő. A leggyakrabban vizsgált, valamint a terápiás célból történő felhasználásra javasolt első ilyen hordozó részecskék a liposzómák voltak. Ezek olyan foszfolipid kettős réteget alkotó nanohordozók, amelyek képesek egy aktív hatóanyag adott célterületre történő szállítására a szervezetben. (3) Egyéb lipid alapú nanohordozók közé tartoznak a lipid-polimer „hibrid” nanohordozók és a lipid komplex részecskék.

#### **I.1.1. Liposzómák: liposzómális doxorubicin (Doxil/Caelyx)**

A liposzómák korai formáit már az 1960-as években leírták A.D. Bangham és munkatársai, akik megfigyelték a spontán formálódó lecitin kristályok és a biológiai membránok közötti hasonlóságot, valamint azok képességét részecskék befogadására és változó körülmények közötti kibocsátására. (4) A liposzómák gyógyszerhordozóként történő alkalmazását először Colley és Ryman vetette fel. Ezt az elképzelést később számos közlemény megerősítette, jelenleg a liposzómák klinikai jelentősége, elsősorban a kemoterápiás formulációk kapcsán, megkérdőjelezhetetlen. (5)



**1. ábra:** Liposzomális doxorubicin (Doxil™) elektronmikroszkópos képe. (6)

Az 1980-as években megalkotott, szabadalmaztatott, majd 1995-ben az amerikai gyógyszerhatóság (Food and Drug Administration, FDA) által elsőként klinikai felhasználásra engedélyezett nanogyógyszer, a Doxil (később Európában a Janssen gyógyszercég Caelyx-ként hozta forgalomba (7)), a nanomedicina széles körű adoptációjának katalizátora volt, amely az egyéb nanohordozók kifejlesztését is felgyorsította. A Doxil (1. ábra) doxorubicint tartalmaz, ami *Streptomyces* baktériumok által termelt, antraciklinek csoportjába tartozó kemoterápiás gyógyszer, amely gátolja a tumorsejtek osztódását a DNS bázispárjai közé kötődve, valamint a topoisomerase II-t gátolva. A doxorubicin számos tumortípus kemoterápiás protokolljában szerepel. Használják például leukémia és limfóma, mell-, petefészek- és tüdőrák kezelésében.

A doxorubicin szabadgyökök képzésével és következményes oxidatív folyamatok hatására képes a sejtfehérjék és sejtmembránok, különösen a mitokondriális membrán károsítására. Az így létrejött oxidatív károsító hatás kiemelt jelentőséggel bír a doxorubicin toxicitásának és mellékhatásainak kialakulásában. A szívizom magas mitokondriumtartalma magyarázhatja az így létrejött gyakori mellékhatást, a kardiotoxicitást. A további mellékhatások közé tartozik a súlyos csontvelő-szupresszió, hányinger és hányás, valamint a bőr- és nyálkahártya károsodás, amely egyebek mellett stomatitis, alopecia és bélrendszeri károsodás formájában nyilvánulhat meg. A doxorubicin liposzomális formulációjának létrehozása ezeknek a mellékhatásoknak a csökkentését célozta. Az első próbálkozások során doxorubicint, valamint két ún. „fluid” phospholipidet (EPC és EPG) és koleszterint tartalmazó oligolamelláris liposzómákat (OLV-DOX) hoztak létre, ami a 200-500nm-es mérettartomány és negatív töltés miatt a retikulocitoteliális rendszer (RES) makrofágjai gyorsan felveszik, de nem dúsultak

megfelelő mértékben a tumorszövetekben, így ez tévútnak, a kapcsolódó klinikai kísérlet pedig kudarcnak bizonyult. Az újragondolt formuláció megalkotását megelőzően Barenholz, Gabizon és munkatársaik meghatározták a nanohordozó részecske sikerességéhez szükséges alapvető kritériumokat. A liposzómák célterülethez történő eljutásához elengedhetetlen az ehhez lehetőséget biztosító, megtartott stabilitás és szerkezet mellett elért hosszabb keringési idő, amit sztérikus stabilizáció útján értek el. Ehhez a Doxil esetében magas olvadáspontú foszfolipideket, koleszterint és egy lipopolimert, a <sup>2000</sup>PEG-DSPE-t, alkalmazták. A megfelelő gyógyszerkoncentráció és hatékonyság eléréséhez elengedhetetlen volt aktív töltési technológiák kifejlesztése. Ez a cél több úton is elérhetőnek bizonyult, a Doxil esetében ammóniumszulfát transzmembrán gradiensevel sikerült a liposzóma hatékony és stabil töltése (Héber Egyetem - Hadassah Orvosi Egyetem, Jeruzsálem), a Myocet, egy másik doxorubicint tartalmazó liposzomás készítmény töltésére pedig a pH gradiens hatását használták (The Liposome Company, Princeton).

A liposzómák extravazációja elengedhetetlen a szöveti felhalmozódás eléréséhez, amihez nanoméretű, 100-120 nm-nél kisebb liposzómák szükségesek.

További fontos kritérium, hogy a liposzómák által hordozott gyógyszer tartalomnak el kell jutnia a célterülethez, amely több módon lehetséges. A Doxil esetén ez passzív folyamat formájában valósul meg, amelyben a tumorszövet fokozott permeabilitást mutató erein jut át a nanohordozó, így elősegítve lokális felhalmozódást. (8) Ez a passzív folyamat azonban több tényezőtől is nagymértékben függ, amelyek közé tartozik a tumor erezettségének mértéke, az endotéliumon található pórusok mérete, ami az adott tumor fajtájától függ. Ezek a tényezők befolyásolják a liposzómák farmakokinetikáját és a biodisztribúcióját. Az aktív célzás a liposzómák szerkezetében található olyan ligandok segítségével lehetséges, amelyek a célterületen található receptorokhoz kötődnek, és ezt követően a liposzóma endocitózisán keresztül történik az aktív hatóanyag bejuttatása a célsejtekbe. A ligandok közé tartoznak az antitestek, peptidek, vitaminok (pl. folsav), amelyek a tumorokban túlexpresszált receptorokhoz kötődhetnek. (9)

A nanohordozóban szállított aktív hatóanyag aktív kioldása több módon érhető el, amire számos példa található a szakirodalomban. A liposzómák csökkenő pH,



hőmérséklet változás és ultrahang expozíció következtében megváltozott töltőkapacitása miatt a célzott területen kioldódhat az aktív hatóanyag. További példák közé tartozik a fény hatására lebomló lipidek alkalmazása, ami a fény hatására a hatóanyag kioldását teszi lehetővé. (10)

A Barenholz és munkatársai által fejlesztett, szabadalmaztatott, majd ezt követően a klinikai gyakorlatba széles körben bevezetett liposzómális doxorubicin úttörőnek bizonyult az egyéb lipid alapú nanogyógyszerek terápiás felhasználásában. A gyógyszer mellékhatások rizikójának, gyakoriságának és súlyosságának csökkentése céljából létrehozott lipid-alapú nanohordozók az előnyök mellett új kihívásokat is magukkal hoztak. Ezek közül kiemelendő az alábbiakban részletesen tárgyalt, részben a komplement rendszer aktiválódásához köthető pszeudoallergiás reakció, a CARPA. A CARPA hátterében húzódó patomechanizmusok vizsgálata és megértése alapvető fontossággal bír a gyógyszerfejlesztés és a klinikai alkalmazás vonatkozásában is, tekintettel a CARPA számottevő, az IgE által közvetített I-es típusú túlérzékenységi reakcióhoz képest magasabb gyakoriságára, potenciálisan akár életet veszélyeztető jellegére. (11)

### **I.1.2. Micellák és lipid-polimer „hibrid” nanohordozók**

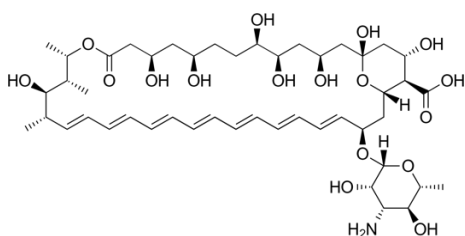
A micellák hidrofób mag és hidrofil köpeny polimerekből álló kolloid részecskék, általában az 5-100 nm közötti mérettartományban, amelyek megfelelő, úgynevezett kritikus micella koncentrációban („critical micelle concentration”, CMC), spontán összerendeződéssel jönnek létre. A köpeny polimer gátolja a retikuloendoteliális rendszerbe történő gyors felvételt, ezzel biztosítja a hosszabb keringési időt. A leggyakrabban erre a célra polietilén-glikolt (PEG) használnak. A hidrofób mag kialakítására többek között poliétereket, poliaminosavakat és poliésztereket alkalmaznak. A hidrofób blokk nagyobb molekulásúlya alacsonyabb CMC-t eredményez, valamint a hidrofób láncok végeinek módosítása hozzájárulhat a micellák stabilitásához. Klinikai vizsgálatokban több micelláris formuláció hatékonyságát tanulmányozták. Ezek közé tartozik például az NK105, amely paclitaxelt tartalmazó, előrehaladott gyomorrák kezelésére alkalmazott kemoterápiás gyógyszer, az SP1049C, amely doxorubicint

tartalmaz és gasztrointesztinális adenocarcinoma kezelésnél alkalmazták, az NC-6004 nevű, cisplatint tartalmazó micella, amelyet különböző szolid tumorok kezelésénél vizsgáltak, valamint a Genexol-PM és NK012 nevű formulációk, amelyek többek között mellkrák kezelésében merültek fel kemoterápiás lehetőségként. (12)

A polimer alapú micellák és lipid láncok kombinációjával lipid alapú micellák vagy azokhoz alapvetően hasonló nanohordozók létrehozása is lehetséges. Erre alkalmasnak bizonyult a DSPE (1, 2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) és polietilén-glikol kombinációja, amelyet például az asthma bronchiale kezelésére is alkalmazott inhalációs kortikoszteroid, a budesonide vízdoldékonyá alakításával kapcsolatban vizsgáltak. (13-16)

### 1.1.3. Lipid komplexek: amphotericin B lipid komplex (Abelcet)

A liposzómák és lipid-polimer nanohordozók mellett egyéb foszfolipid-komplex formulációk is megjelentek a nanomedicinális gyógyszerek terápiás arzenáljában. Erre a gyógyszer típusra példa az amphotericin B lipid-komplex, az Abelcet, amelyet a szabad gyógyszerforma toxicitásának csökkentése céljából hoztak létre. Ez L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylcholine és L- $\alpha$ -dimyristoylphosphatidylglycerol 0,9%-os sóoldatban, 1:1 arányban kevert oldata. (17) Az aktuálisan a National Library of Medicine (pubmed.com, 2021) adatbázisában megtalálható, Abelcethez valamilyen szempontból kapcsolódó, 1995 óta megjelent tudományos publikációk száma 24279, ami jól mutatja, hogy az amphotericin B lipid komplex formulációja az elmúlt években élénken foglalkoztatta a kutatókat.



**2. ábra:** Az amphotericin B szerkezete. (18)

Az amphotericin B egy újabb lipid komplex formulációja az LC-Amb, amely egy

egereken végzett vizsgálatban az Abelcethez hasonlóan csökkentett toxicitást eredményezett a szabad hatóanyaghoz képest. (19)

Amellett, hogy az amphotericin B a legtöbbet vizsgált és alkalmazott hatóanyag a lipid-komplex nanogyógyszerek csoportjában, egyéb hatóanyagok felhasználását is vizsgálták. Ezek közé tartozik az apolipoprotein A-I mimetikus peptid 4F, amely a Paraoxonase-1-hez kötődve fokozza annak aktivitását és stabilitását. Az utóbbi alapvető fontossággal bír a HDL (high density lipoprotein) antioxidáns, gyulladáscsökkentő és antiaterogén hatásának kialakulásában. (20)

#### **I.1.3.1. Abelcet felnőtt- és gyermekgyógyászati felhasználása a klinikai gyakorlatban**

Egy 23 centrumot és 2677 beteg eseteit magába foglaló meta-analízisben az amphotericin B különböző lipid-alapú (liposzómális, lipid komplex, kolloid diszperzió, intralipid) formulációinak biztonságosságát vizsgálták, és azt találták, hogy ezek között nem volt szignifikáns különbség, ugyanakkor a magasabb toxicitású szabad gyógyszerformához hasonló hatékonyságot mutattak. (21)

Az Abelcet farmakokinetikáját vizsgálták 17 felnőtt beteg bevonásával, akiket szisztémás gombafertőzés miatt kezeltek, amely során az Abelcet magas arányú, multiexponenciális szöveti felhalmozódását és hosszú fél-életidejét figyelték meg anélkül, hogy az ismételt kezelések során a vérben a hatóanyag koncentrációjának kummulálódását észlelték volna. (22)

Egy klinikai vizsgálatban az amphotericin B liposzómális (AmBisome) és lipid komplex formulációját hasonlították össze coccidioidomycosis kezelésében, amely során a kezelés kimenetelét a tünetek, komplement koncentráció és egyéb laboratóriumi paraméterek függvényében elemezték. A vizsgálatba 64 jelöltet vontak be. Az AmBisome kezelésben részesült betegek 68,8%-ában minősítették sikeresnek a kezelést, míg Abelcet esetében ez 73% volt. A befejezett kezelések esetében szignifikáns különbségnek bizonyult a két gyógyszer között, hogy akut vesekárosodás miatt az AmBisome esetében

3,1%-ban hagyták abba a kezelést, míg Abelcet esetében erre 27%-ban volt szükség. Ezek alapján felvetették, hogy az AmBisome vesetoxicitása kisebb lehet. (23)

Egy retrospektív tanulmányban invazív aspergillosis kezelésére liposzómális amphotericin B-t és Abelcet monoterápiáját hasonlították össze hematológiai malignitás miatt kezelt felnőtt betegekben. Összesen 381 beteget vontak be a vizsgálatba, akiknél bizonyított, vagy a vonatkozó irányelvek alapján feltételezett invazív aspergillosis zajlott. Ezek közül 158 kapott Abelcetet vagy liposzómális amphotericin B-t. A vizsgált betegekben az első, valamint második kezelésre adott terápiás válasz mindkét gyógyszer esetében rossz volt (7,7-15,8%-ban reagáltak megfelelően a kezelésre). Az első kezelést követően az Abelcet esetén szignifikánsan több esetben észleltek vesetoxicitást. (24)

A daganatos betegek kemoterápiája vagy csontvelő transzplantációja kapcsán kialakult immunszuppresszió fokozott fertőzéshajlamhoz, kiemelten a gombafertőzések fokozott rizikójához vezet. Johansen és munkatársa 13 klinikai vizsgálatot, 1960 beteg esetét tekintette át ebből a betegcsoportból, amelyekben a gombaellenes kezelést profilaktikusan vagy láz jelentkezése esetén alkalmazták az amphotericin B különböző, lipid-alapú és szabad formulációival. Azt találták, hogy a lipid alapú amphotericin B, többek között az Abelcet, nem csökkentette a mortalitást a szabad amphotericin B-hez képest, azonban hatékonyabb volt az invazív gombafertőzések kezelésében, valamint csökkentette a vesetoxicitást. Ezzel együtt kiemelték, hogy az amphotericin B szabad és lipid-alapú formulációi közötti egységes, következetes összehasonlítás, és ezek alapján egyértelmű következtetések levonása csak további, nagyobb klinikai vizsgálatok elvégzésével lehetséges. (25)

Egy gyermekgyógyászati felhasználást vizsgáló tanulmányban az amphotericin B lipid komplex kezelés hatékonyságát és biztonságosságát vizsgálták invazív gombafertőzés miatt kezelt 548 gyermek és serdülő esetében (életkor tartomány 0-20 év) 4 éven keresztül, amely a publikálás időpontjáig a legnagyobb, egy terápiás ágens bevonásával készült ilyen jellegű vizsgálat volt. A vizsgálatba bevont betegek mindegyike onkológiai beteg volt, vagy a kezelést megelőző anamnézisében őssejt-/szerv-transzplantáció szerepelt. A begyűjtött adatok tartalmazták a demográfiai információkat, alapbetegséget, az Abelcet használatának indokait, az alkalmazott dózist, a klinikai hatékonyságot és a vesefunkcióra vonatkozó értékeket. A legtöbb beteg vagy

nem tolerálta vagy nem reagált megfelelően a konvencionális gombaellenes kezelésre és a betegek közel fele neutropéniás volt a kezelés megkezdésének idején. Az 548 betegből 300 (54,7%) részesült korábban transzplantációban és a 393 (71,7%) kapott egy vagy több egyéb vesetoxikus kezelést. Egy vagy több gombafajt 285 beteg esetén sikerült izolálni, amely leggyakrabban Candida és Aspergillus volt. A 285 beteg közül a klinikai válaszra vonatkozó adatok 255 esetben voltak értékelhetőek. A teljes (gyógyulás) vagy részleges (javulás) terápiás választ a betegek 54,9% érték el és további 16,9% esetében stabil állapotot értek el. Az igazolt Aspergillus fertőzés miatt kezelt betegek 40,5 és 37,5%-ában érték el ilyen terápiás választ a transzplantált és nem transzplantált betegcsoportokra vonatkozóan, ami a stabil állapot elérését is figyelembe véve 48,6 és 71,9% volt. Klinikailag szignifikáns vesekárosító hatást csak kevés esetben sikerült igazolni. Nem volt szignifikáns különbség a már más okból hemodialízisre szoruló betegek és az Abelcet kezelést követően hemodialízisre szoruló betegek száma között. A szérum kreatinin szint Abelcet kezelést megelőző értékeihez képest legalább másfélszeres emelkedést 24,8%-ban és legalább két és félszeres emelkedést 8,8%-ban észleltek. Az eredmények alapján azt a következtetést vonták le, hogy a hatékonyság és biztonságosság tekintetében az eredmények alátámasztják az amphotericin B lipid komplex használatát immunkompromitált gyermekek és serdülők esetében a magas rizikó csoportba tartozó transzplantált betegekkel együtt. (26)

Az Abelcet gyógyszerleírásában is szereplő, a kezelés során jelentkező mellékhatásokat tartalmazó adatok 921 beteg kezelése során észlelt infúziós reakciókat tartalmaznak. Ezek alapján az Abelcet beadását követően hidegrázással járó akut infúziós reakciót a vizsgált nagykorú betegpopuláció 18 %-ban észleltek. A reakciók kiütéssel, nehézlégzéssel, bronchospazmussal, hipo- vagy hipertenzióval, aritmiával, mellkasi fájdalommal, thrombocytopeniával, leukopeniával jártak együtt az esetek 3-7%-ában. A mellékhatások gyakrabban jelentkeztek az első dózisok beadása után, majd a következő dózisok beadásaival enyhültek. (27)

#### **I.1.3.2. Abelcet vizsgálata állatmodellekben**

Egy tanulmányban immunszuprimált egerekben gombaellenes gyógyszerek, többek között az Abelcet hatékonyságát és toxicitását vizsgálták invazív pulmonális aspergillosis kezelésében. Az egerek immunfunkcióit glucocorticoid adásával gátolták,

majd azokat intranazálisan megfertőzték *Aspergillus fumigatus* gombával. Abelcet adása után a vizsgált egerekben hosszabb túlélést dokumentáltak, azonban teljes gyógyulást nem értek el, és progresszív betegséget észleltek, az Abelcet emelt dózisa viszont csökkentette a túlélést. (28)

Egy másik egér modellben az Abelcet hatékonyságát vizsgálták központi idegrendszeri aspergillosis kezelésében, amely során megállapították, hogy bár az Abelcet hatékonynak bizonyult, teljes gyógyulást egy esetben sem sikerült elérni az alkalmazásával, valamint caspofungin, egy lipopeptid gombafertőzés ellenes gyógyszer együttes adása érdemben nem befolyásolta a kezelések kimenetelét. (29)

Egy tanulmányban az Abelcet és amphotericin B immunotoxicitását hasonlították össze egerekben, amelyben a naponta, 28 napig alkalmazott gyógyszer beadását követően rögzítették az észlelt tüneteket, testsúlyt és a lép súlyát, valamint analizálták a makrofágok, az NK sejtek, limfociták funkcióját. Az eredmények alapján megállapították, hogy egyik gyógyszer sem befolyásolta a vizsgált immunfunkciókat az analizált egerekben. (30)

Az Abelcet és Ambisome által egerekben okozott mellékhatások patomechanizmusában a komplement rendszer szerepéről Órfi és munkatársai számoltak be. Az egereket intravénásan kezelték 30-300 mg/kg gyógyszerrel, valamint pozitív kontrollként ismert komplement aktivátorokat (kobramérget és zymosant) alkalmaztak, majd mérték a vérnyomás, pulzus, fehérvérsejtszám, vérlemezkeszám és plazma tromboxán és C3 koncentrációk változásait. Az Abelcet és AmBisome adását követően átmeneti vérnyomás-emelkedést, thrombocytopeniát, valamint a plazma tromboxán és C3a koncentrációk emelkedését figyelték meg. C3a receptor inhibitor (SB-290157) alkalmazása esetén a korábban, Abelcet és AmBisome kezelés hatására bekövetkező átmeneti vérnyomás-emelkedés csökkent, ami alátámasztja az eltérések hátterében patomechanizmusként felmerülő, komplement aktivációhoz kötött pszeudoallergia (CARPA) meghatározó szerepét. (31)

Egy patkányokon végzett kísérletben az Abelcet stabilitását vizsgálták a vérplazmában *in vitro* és *in vivo*. A patkányok plazmájába Abelcetet tettek, majd

centrifugálással a szabad Abelcetet különválasztották, amely 90%-ban megtartott integritású amphotericin B-lipid komplex formát igazolt, tehát a beadott nanogyógyszer integritása döntően megmaradt eredeti formájában a plazmában is. A további kísérletek alapján megállapították, hogy a szabad amphotericin B aránya idő- és hőmérséklet függvényében nőtt, valamint az asszociált a plazma lipoprotein és a nem lipoprotein fehérjével. Az *in vivo* kísérletekben az amphotericin B koncentrációt 24 óráig mérték egy adag (1 mg) Abelcet és dózis ekvivalens mennyiségű amphotericin B beadását követően, és azt találták, hogy a szabad gyógyszer esetén a mért amphotericin B koncentráció négyszeres volt az Abelcetéhez képest. A lipid komplex formuláció gyorsan kikerült a szövetekbe. A patkányok egy másik csoportjában 0,5 mg/kg/nap adagolásban amphotericin B-t, 10 mg/kg/nap adagolásban pedig Abelcetet adtak be 15 napon keresztül, és azt találták, hogy a plazmafehérjékhez kötődött szabad amphotericin B koncentráció csak 1-2-szer volt magasabb a szabad gyógyszer beadásához képest a 20-szor nagyobb dózis ellenére. Az eredmények alapján megállapították, hogy részben a szövetek általi gyors felvétel és az alacsony keringő szabad hatóanyag tartalom magyarázhatja az Abelcet csökkent toxicitását és fokozott hatékonyságát. (32)

Egy sertéseken végzett kísérletsorozatban az Abelcet beadását követően jelentkező láz háttérben pirogénok kiáramlást figyeltek meg a vérben, valamint ezzel összefüggésben megemelkedett NF-kappaB expressziót észleltek, ami a TNF-alfa és IL-1 beta gének transzkripciók regulátora. (33)

## 1.2. Lipid alapú nanohordozók tulajdonságainak vizsgálati lehetőségei

A nanomedicinában alkalmazott nanorészecskék karakterizálása kritikus pontja a gyógyszer tervezésének, fejlesztésének, az *in vivo* hatékonyság megítélésének, valamint a minőségkontroll folyamatának. A részecskék nanomérete, a lipid természetű alkotóelemek, a különleges mag-kettősréteg struktúra mind nehezítik azok vizsgálatát, amelyek közé tartozik a lipidek meghatározása, a gyógyszer befogadás hatékonyság, a stabilitás és a gyógyszerkibocsátás vizsgálata. 2018-ban az FDA kiadott egy gyógyszeripari ajánlást a liposzómális gyógyszertermékek fejlesztésére, amelyben több fontos tulajdonságot megneveztek, aminek liposzómális gyógyszereknek meg kell felelniük. Ennek megfelelően meg kell határozni a felhasznált lipideket és azok mennyiségét; a nanohordozóban lévő, szabad és teljes hatóanyagtartalmat; a

nanorészecske morfológiáját, struktúráját, részecskeméret eloszlását és felületi töltését; a részecskék fizikai stabilitását (fúzió és aggregáció) és kémiai stabilitását (lipid és hatóanyag degradáció); valamint az *in vitro* hatóanyag kibocsátás farmakokinetikáját.

A lipid-alapú nanohordozók lipid összetételének kvalitatív meghatározása több módszerrel lehetséges. Ezek közé tartozik a széles körben alkalmazott NMR (nuclear magnetic resonance) spektroszkópia, amely a vizsgált molekula atommagjainak egyedi elektronszerkezetét vizsgálva többek között alkalmassá teszi az egyes lipid alkotóelemek elkülönítésére.

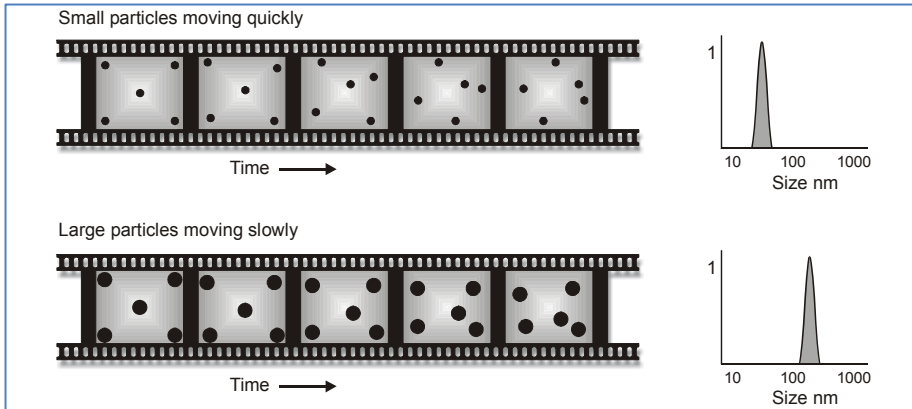
Egy másik módszer a lipidek koncentrációjának kvantitatív meghatározására a tömegspektrometria, ami a nanohordozó alkotóelemeinek molekuláris tömegét határozza meg, ezzel segíti azok elkülönítését. Ez egy szenzitív, sokoldalú technológia, amit gyakran folyadékkromatográfiával (LC, liquid chromatography) kombinálnak. A vibrációs spektrometria a lipidkomponenseinek meghatározására szintén alkalmas lehet. A Raman spektroszkópia a részecskék úgynevezett „narrow-band” fotonokkal történő megvilágítását követően a szórt fényt detektálja és jelölés nélkül, valamint *in situ* alkalmas a lipid membránok vizsgálatára, amely során a mért jel korrelál a keresztkötések átlagos számával és az oldalcsoportokkal a lipidek alkilcsoportjaiban.

A lipidek folyadékkromatográfiával történő kvantitatív meghatározása széles körben alkalmazott módszer, ezek közül is a fordított fázisú, nagyteljesítményű folyadék kromatográfia (RP-HPLC) a legtöbbet használt technológia. Utóbbi során a lipideket általában organikus oldószerekkel (pl. kloroform és metanol keverékével) oldják fel, majd a telítetlen foszfolipidek mennyiségét UV fényelnyelés alapján határozzák meg a 200-220 nm-es hullámhossz tartományban, ahol erősebb fényelnyelést mutatnak, mint a telített foszfolipidek. Singh és munkatársai vizsgálatai során a liposzómák 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC) és koleszterin tartalmát mérték C8 szilika folyadékkromatográfiás oszlop és UV<sub>205</sub> alkalmazásával. A telített zsírsavak, mint pl. a 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) és phosphoethanolamine (DPPE) elkülönítése trimethylsilane-nal módosított szilika oszlop alkalmazásával, valamint kloroformmal, metanollal és vízzel történő előzetes oldással és ELSD-vel (evaporative light scattering detector) történő detektálással bizonyult lehetségesnek.



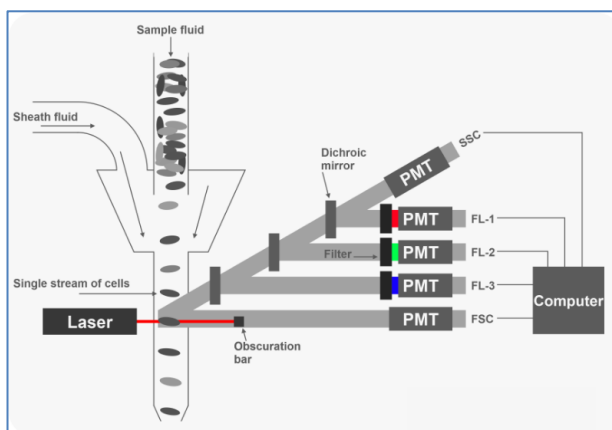
A nanorészecskék morfológiájának és méretének vizsgálata számos transzmissziós elektronmikroszkópiás (TEM) módszerrel lehetséges. Ezek közé tartozik a negatív-festés alkalmazása, amelynek során a mintákat szénréteggel bevont rézrácsra helyezik, majd uranyl-acetáttal vagy foszfowolfránsavval festik, hogy megfelelő kontrasztot hozzanak létre a nagy energiájú elektronsugár alatt. Az elektronmikroszkóp alatt a lipid-alapú nanohordozók morfológiája jól vizsgálható, azonban a negatív festéses módszer a pontos méret meghatározására kevésbé alkalmas a festési módszereket megelőző, levegőn történő szárítás során bekövetkező zsugorodás miatt. Ezzel ellentétben a fagyasztásos módszerrel végzett, úgynevezett cryo-TEM elektronmikroszkópia nem igényel előzetes szárítási folyamatot.

A nanorészecskék méreteloszlásának vizsgálata több módszerrel lehetséges. A dinamikus fényszóródás (DLS, dynamic light scattering) módszer (3. ábra) alkalmasnak bizonyult a nanogyógyszerek méreteloszlásának vizsgálatára a 0,5 nm és 1  $\mu\text{m}$  közötti mérettartományban. A DLS a Brown-mozgást (a folyadékban szuszpendált részecskék szüntelenül zajló, véletlenszerű mozgás (34)) végző részecskékről szóródó fény időfüggő fluktuációját méri. A mérés során változtatható a hőmérséklet, az oldószer viszkozitása és refraktív indexe, amelyeket előre meg kell határozni a hidrodinamikus részecskeméret ( $R_h$ ) kiszámításához. A vizsgálattal és annak értékelésével kapcsolatban több fontos tényezőt is figyelembe kell venni. A készülék a részecskéket tökéletes gömbnek feltételezve számítja ki a hidrodinamikus rádiuszt. A minták nem nyelhetik el a fényt, nem világíthatnak és fluoreszkálhatnak a használt fényforrás hullámhosszán, amit tipikusan magas értékre állítanak be (például 633 nm vagy 830 nm). A használt oldószer hígításának nem befolyásolhatja a részecskék méretét és formájának stabilitását. A mérés minőségellenőrzése során autokorrelációs görbék megfelelő használata javasolt. Az intenzitás-alapú  $R_h$  mérés a nagyobb részecskéket szignifikánsan nagyobb mértékben veszi számításba, hiszen azok több fényt szórnak, mint a kisebb részecskék. A kisebb részecskék jelét maszkolhatja a nagyobbakról érkező jel, és szintén fontos megjegyezni, hogy a részecske szubpopulációk csak akkor jelennek meg külön, ha az átlag méretűtől 2-3-szoros mértékben különböznek.



**3. ábra:** a dinamikus fényszóródás (DLS) módszer működési elvét szemléltető ábra. A DLS a Brown-mozgás alapján határozza meg a részecskék méreteloszlását. A Brown-mozgás a részecskék random mozgása egy folyadékban, amely a részecskéket körülvevő folyadék molekulák mozgása miatt alakul ki. (35)

Az áramlási citometria, amely a sejtek vagy részecskék nagy sebességű vizsgálatára alkalmas (4. ábra), is felmerült a liposzómák méretének megállapítására alkalmas vizsgálati módszerként. A vizsgálat során a vizsgált részecskéket egy lézer fényforrással megvilágítják, majd a szóródó fényt a fényszórás előre meghatározott irányai szerint, előre- és oldalszórás (forward-, side scatter) formájában rögzítik. A fényszórás jellegéből és mértékéből következtetni lehet a részecskék méretére, azonban ehhez egy előre meghatározott, pontosan ismert mérettű részecskékkel történő kalibráció szükséges.



**4. ábra:** az áramlási citometria működési elvét szemléltető ábra. (36)

Egy másik méret-meghatározásra potenciálisan alkalmas módszer a TRPS (tunable resistive pulse sensing), amely egy ionáram megtörését rögzíti, amikor egy részecske áthalad egy vékony membránban található, meghatározott méretű póruson. Ezzel a módszerrel kapott eredmények tartalmazzák a részecske méreteloszlást és a részecske koncentrációt, valamint ezzel együtt az egyes részecskék zeta-potenciálját (felületi feszültségét) is rögzíti. A TRPS relatív nagy mérettartományban (40 nm-10  $\mu\text{m}$ ) alkalmazható, valamint összehasonlító vizsgálatokban nagyobb pontosságú eredmények elérésére képes a DLS-nél.

A nanopartikulumok méretének meghatározására, valamint méret és/vagy forma alapján történő frakcionálására alkalmas a SEC (size exclusion chromatography), amely különböző méretű pórusokat alkalmaz a részecskék elkülönítésére. (37)

A nanorészecskék felszíni töltését általában a foszfolipidek poláris része határozza meg, ami pozitív töltésű tercier aminokat vagy negatív töltésű karboxil csoportokat tartalmazhat. A felszíni töltés fontos fizikokémiai tulajdonság, mert meghatározza a részecskék közötti interakciókat, az adszorpciót és a következményes részecskestabilitást. Ezt a paramétert a leggyakrabban a zéta-potenciál értékében határozzák meg, ami egy részecske töltésprofilját mutatja, és a részecske elektroforetikus mobilitás alapján, PALS (phase analysis light scattering) módszerrel számítható ki. A mérési eredményeket befolyásolja többek között a pH, hőmérséklet, az oldószer ionerőssége, viszkozitása és refrakciós indexe, így ezek előzetes meghatározása kiemelten fontos a reprodukálhatóság szempontjából. A zéta-potenciál lineáris összefüggést mutat a liposzómákban található ionizált lipidek moláris százalékával. A PEG-gel történő módosítás eltakarhatja a lipidek töltését és stabilizálhatja a liposzómákat még akkor is, ha a módosítás csak a lipidek kis százalékát (0,2 mol%) érinti. A liposzómák tényleges felületi töltése számos technológiával mérhető, ezek közé tartozik a fluoreszcens jelölés, az EPR (elektron paramagnetic resonance) és a SHG (second harmonic generation) optikai analízis. (38)

A nanopartikulumok integritásának, beadást követően történő, *in vivo* követésére is van lehetőség. Ilyen technológiai megoldás a fluoreszcencia alapú FRET (Forster resonance energy transfer) technológia. Ezzel a módszerrel igazolták, hogy *in vivo* a PEG köpennyel rendelkező, úgynevezett „lopakodó” lipid nanokapszulák nagyobb stabilitást

mutatnak, azonban a hosszú PEG lánc a részecskék szervezeten belüli eloszlását is befolyásolja. (39)

### **I.3. A komplement rendszer szerepe a lipid alapú nanomedicinális gyógyszerek mellékhatásainak kialakulásában**

#### **I.3.1. A komplement rendszer alkotóelemei, aktiválódásának mechanizmusai és hatásai**

A komplement rendszer a veleszületett immunitás részét képezi és nagyszámú szolubilis fehérjét tartalmaz, amelyek a keringésben és szövetekben találhatóak, és az aktiválódási kaszkád alkotóelemei. Az aktiválódás három ismert útvonalon történhet, amelyek az ún. klasszikus, alternatív és lektin út formájában vezetnek a membránkárosító komplex (membrane attack complex, MAC) kialakulásához, valamint az egyes komplement fehérjék különböző biológiai folyamatok katalizálásában vesznek részt. A komplement rendszer szerepet játszik többek között a patogének és antigének eltávolításában, az opsonizált molekulák fagocitózisában, a humorális és sejtes immunválasz kialakulásában és regulálásában, az apoptózis során keletkezett törmelék eltávolításában, valamint az immunkomplexek transzport mechanizmusában.

A klasszikus útvonal aktiválódása a komplement fehérjék antitesthez kötődését követően, valamint antitestektől független mechanizmussal is lehetséges. Az IgM-nek a legerősebb a komplement kötő potenciálja, ezt követik az IgG alosztályai, sorrendben az IgG3, IgG1, IgG2, és azoktól is lemaradva az IgG4. Az IgA az alternatív útvonal aktiválásában vehet részt, azonban az IgE csak speciális körülmények között mutat komplement aktiválási potenciált. Az antigén-antitest komplexhez C1q komplement fehérje (C1s és C1r komplex) kötődik, ami a C1r autokatalíziséhez vezet. Utóbbi következménye a C1s aktiválódása, ami a klasszikus útvonal C4 és C2 komplement fehérjéből C4a és C2b komplementeket hasítanak, amelyek a C4b2a multiprotein komplex kialakulásához vezetnek. Ez a komplex a klasszikus útvonal a C3 konvertáz aktiváló enzime. Antitest-független aktivátorok lehetnek például a C-reaktív protein (CRP), a beta amyloid fibrilek, a szérum amyloid P, valamint szövetkárosodás során keletkező termékek (például a mitokondriális membrán fehérjék), amelyek mindegyike közvetlenül kapcsolódik a C1q-hoz, ami szintén a klasszikus út aktiválódáshoz vezet. (40)

Az alternatív útvonalat először Pillemer és munkatársai írták le, ekkor még tévesen egy szérumfehérje, a properdin központi szerepét emelték ki. (41) Utóbbiról kiderült, hogy stabilizáló szerepe van, azonban az általuk leírt antitest-független útvonal koncepcióját később megerősítették. Ellentétben a klasszikus és lektin útvonalakra jellemző specifikus antitest-antigén kötődésekkel, az alternatív útvonal aktiválódása során megfigyelhető autoaktivációs, ún. „tick-over” mechanizmus következményeként, amely során a C3 komplement spontán konformációs változásai által kialakuló C3(H<sub>2</sub>O) képessé válik a faktor B kötésére. Utóbbi következtében a faktor D Ba és Bb komplementeket tud hasítani a faktor B-ből. A Bb komplement fehérje a komplex része marad, valamint saját szerin proteáz aktivitásának hatására, C3 komplementek hasításával C3b kialakulásához, a faktor B jelenlétében C3 konvertáz aktivitáshoz vezet. A katalitikus folyamatot a már korábban említett properdin stabilizálja. Az alternatív útvonal a klasszikus és lektin út során keletkező C3b-hez kötődő faktor B hatására, azokban amplifikációs hurokként is aktiválódhat. Az alternatív útvonal a szervezet saját sejtjei és idegen molekulák elkülönítésében, a patogének eliminációjában fontos szerepet játszik. A szöveti károsodás, gyulladás során „megváltozott saját” antigének is aktiválhatják ezt az útvonalat, amelynek a következménye a különböző autoimmun betegségek kialakulása. (42)

A legutóbb leírt komplement aktiválódási kaszkád a lektin útvonal, amelyben központi szerepet játszik az MBL (Mannose Binding Lectin). Az MBL a kollektinek családjába tartozó, Ca<sup>2+</sup> függő, humán szérumban található oligomer lektin, ami képes a patogének felszínén található szénhidrátok (többek között a mannóz és az N-acetilglukózamin) felismerésére és megkötésére, így jelentős szerepet játszik a különböző patogének eliminálásában. Az MBL komplexet alkot MASP (MBL-associated serine proteases) szerin proteázokkal, amelyekből az emberben két fő altípus, a MASP-1 és a MASP-2 ismert. Az MBL és a MASP kötődését követően az utóbbi szerkezeti változásának következtében proteolitikus aktivitásra tesz szert, és a képessé válik a C4, C2 és C3 komplementek aktiválására. (43)

### I.3.2. Komplement aktiválódásához kötött pszeudoallergiás reakció (CARPA)

A jelenleg FDA engedéllyel rendelkező, a klinikai gyakorlatban is alkalmazott nanomedicinális készítményeket, többek között a liposzómák és egyéb lipid alapú nanogyógyszerek egy részét az immunrendszer idegenként ismerheti fel, ami részben a komplement rendszer aktiválásán keresztül egy túlérzékenységi szindróma kialakulásához, az ún. komplement aktivációval összefüggő pszeudoallergiához (CARPA, complement activation-related pseudoallergy) vezethet. A CARPA az akut, I-es típusú túlérzékenységi reakció egy altípusát jelöli, ami legtöbbször enyhe, átmeneti mellékhatásként figyelhető meg, azonban egyes betegeknél súlyos, akár halálos formában jelentkezhethet. A kialakulásához több tényező is hozzájárulhat, ilyen például a PEG-et tartalmazó liposzómák felszíni töltése, a korábbi vizsgálatok során elsősorban a negatív töltésű DPPE liposzómák mutattak fokozott komplement aktiválási potenciált, míg egy vizsgálatban a közel semleges töltésű liposzómák csökkent kardiopulmonális mellékhatásokhoz vezettek sertésekben. A liposzómák aggregációja vagy formájuk változásával kialakuló hosszúkás vagy irreguláris liposzómák szintén hozzájárulhatnak a CARPA rizikójának fokozódásához azzal, hogy jelentősen megnövelhetik a vérben a nanohordozók felületét. A Doxil esetében a szabad doxorubicin is hozzájárulhat a liposzóma felületi görbületeinek megváltozásához, és növelheti a komplement aktiválódás lehetőségét. A nanogyógyszerek beadását követően különböző faktorok hatására felszabaduló C3a és C5a specifikus receptoraikon keresztül aktiválják a mastocitákat, bazofil sejteket és egyéb fagocitákat, amelyek vazoaktív mediátorok, úgynevezett allergomedinek szekréciójával hozzájárulnak a jellemző mellékhatások kialakulásához. Egyes mediátorok, például a PAF (platelet-activating factor), hisztamin, triptáz és tromboxán A<sub>2</sub> azonnal felszabadulnak, míg mások *de novo* szintetizálódnak és így fokozatosan kerülnek a keringésbe. Ez a lépcsőzetesen bekövetkező allergomedin felszabadulás magyarázhatja a CARPA-ra jellemző tünetek kezdetének egyéni változatosságát. A H<sub>1</sub> receptorok aktiválódása vazokonstrikcióhoz, és a kapilláris endotélium permeabilitásának fokozódás révén az érből számos anyag kiáramláshoz vezet, és a kardiovaszkuláris tünetek, valamint az anafilaxis bőrtünetek megjelenéséért felelős. A H<sub>2</sub> receptorok ezzel ellentétben a sejtek cAMP szintjének emelésével vazodilatációt okoz és emeli a pulzusszámot. A túlérzékenységi reakció változatosságához szintén hozzájárulhatnak a különböző szervekben eltérő számban jelen

lévő receptorok. A CARPA eltérő patomechanizmusa miatt, a hasonlóságok ellenére, a megnyilvánuló tünetekben is jelentős különbségeket mutat a klasszikus, IgE mediálta I-es típusú túlérzékenységhez képest. A CARPA tüneteire jellemző, hogy azok döntően az első kezelésnél jelentkeznek előzetes expozíció nélkül, enyhébbek vagy hiányozhatnak a kezelés ismétlésénél, spontán elmúlnak, enyhébbek lehetnek vagy ritkábban jelentkezhetnek az infúziós sebesség csökkentése esetén, szteroid és antihisztamin adása esetén jelentős változást nem mutatnak, valamint megfigyelték a tachyphylaxisnak nevezett, a gyógyszerhatás jelentős csökkenésével járó jelenséget a CARPA kialakulása esetén. A CARPA-ra jellemző továbbá, hogy az I-es típusú reakcióhoz képest nagyobb arányban jelentkezik, amely elérheti a 2-10 %-os vagy akár ennél magasabb előfordulást is, valamint a standard allergia tesztekkel nem lehet megjósolni a kialakulását. (44)

### **I.3.3. CARPA vizsgálata, szűrésének lehetőségei**

Az emberi szervezetben komplement aktiválódáshoz köthető súlyos mellékhatások vizsgálata szempontjából a legszenzitívebb, és biológiai szempontból leginkább releváns állatmodellben a klinikai gyakorlatban használt, valamint kutatás tárgyát képező nanomedicinális készítmények intravénás beadását követően sertésekben vizsgálják a kardiopulmonális választ. A sertések különösen érzékenyek a lipid-alapú nanohordozók intravénás beadására, és jelentős hemodinamikai és hematológiai változásokkal reagálnak már kis mennyiség alkalmazása esetén is. Egy vizsgálatban már 0,1 mg/kg Ambisome intravénás beadása is átmeneti, jelentős emelkedést okozott a pulmonális artériás nyomásban, amely együtt járt a szisztémás vérnyomás esésével. A különböző nanopartikulumok esetén a változás mértéke, valamint iránya is eltérő lehet, amely a pathomechanizmus különböző útvonalának aktiválódására utalhat. A CARPA vizsgálata lehetséges további állatmodellekben, így kutyákban, patkányokban és majmokban is megfigyelték a sertés modellben észleltekhöz hasonló reakciókat, azonban a különböző állatok szenzitivitása és a tünetek spektruma eltérő lehet. A kutyák szenzitivitása a hemodinamikai változások tekintetében közel áll a sertésekhez, de azokkal ellentétben kutyákban megfigyelték CARPA reakciót micelláros lipidek, például

Cremphor EL, beadását követően is. A kutyában észlelt tünetek között szerepeltek a kifejezett fehérvérsejt eltérések (leukopenia, amit leukocytosis követett), trombocitopénia, valamint vegetatív tünetek (nyákszekréció fokozódása). A patkányok kevésbé érzékenyek a liposzómák beadását követő CARPA tekintetében, így akár egy-két nagyságrenddel magasabb relatív dózisra lehet szükséges hasonló mértékű reakció kiváltásához. A vérnyomásesés a patkányokban gyakran megfigyelhető reakció liposzómák beadását követően. A különböző nanopartikulumok komplement aktiválási potenciálját analizáló vizsgálatokban látható variancia a végpontként használt sC5b-9 szintjének hátterében szerepet játszhatnak az eltérő vizsgálati körülmények (azonos gyógyszer típus különböző forrásai, tárolási idő, a keverés sebessége a hígítás során), ezért kiemelkedően fontos a komplement aktiváció vizsgálatára szolgáló kísérleti körülmények standardizálása. Chanan-Khan és munkatársai által végzett klinika vizsgálatban egyértelmű összefüggést véleményeztek Doxil beadását követően 10 perccel mért komplement aktiválódás (sC5b-9 szint emelkedés) és a mellékhatások megjelenése között. (44)

### **I.3.4. CARPA prevenciója, a komplement aktiváció gátlásának lehetőségei**

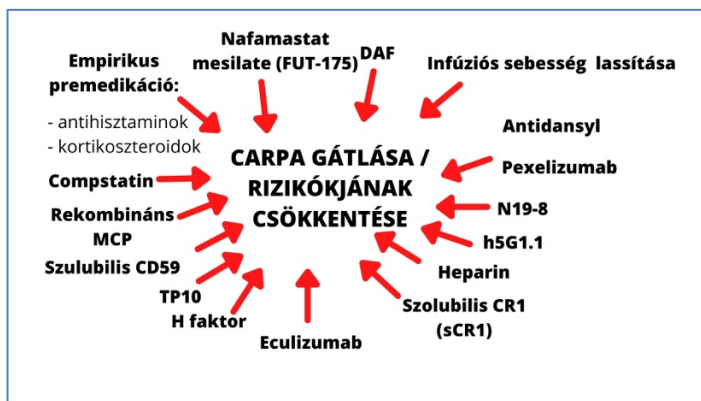
A korábbiakban részletesen tárgyalt, komplement aktivációhoz kötött pszeudoallergiás reakció (CARPA) megelőzése és gátlása is élenként foglalkoztatja a tudományos közösséget.

A CARPA rizikójának csökkentése céljából alkalmazott empirikus premedikáció és elővigyázatossági lépések között leírták antihisztaminok, kortikoszteroidok adását és az infúziós sebesség csökkentését. A súlyos reakciók esetén szükséges a gyógyszer adásának leállítását, valamint szóba jön támogató kezelés, például folyadékpótlást és bronchodilatátorok adása. Bár ezek a gyógyszerek, beavatkozások részben hatékonyak lehetnek, teljes védelmet a CARPA megelőzésében és kezelésében sem nyújtanak. A széles körben vizsgált liposzómális doxorubin készítmények (Doxil/Caelyx) esetén a leghatásosabb módszernek az infúziós sebesség lassítása bizonyult az eddigi vizsgálatok alapján. (44)



A komplement rendszer patológiás mértékű aktiválódásának gátlása több kórállapotnál és betegségénél is kiemelt jelentőséggel bírhat, ezek közé tartozik a szervtranszplantáció, az iszkémiás-reperfúziós károsodás, a koszorúér-betegség és szívinfarktus, a sztrók, a fertőzések, daganatos megbetegedések, immunszuppresszió, paroxysmalis nocturnalis haemoglobinuria, a glomerulonephritis, reumás ízületi gyulladás, az akut légzőszervi distressz szindróma, valamint a kardiopulmonális bypass és dialízis esetén felhasználják az extrakorporális keringető-rendszerek belső felületi kezelésére. Az elsőként leírt komplement inhibitor a kobraméreg volt, amely a C3 komplement felhasználásával gyakorlatilag felfüggeszti a komplement aktiváció mechanizmusát. Az első szintetikus létrehozott komplement inhibitorok közé tartozik a nafamostat mesilate, másik nevén a FUT-175, amely a C1r, C1s, C3 konvertáz, C5 konvertáz, és Factor D gátlásán keresztül fejt ki a hatását, habár nem teljesen komplement-specifikus, és több más plazma proteáz is képes gátolni. A Compstatin a C3 komplement fehérjéhez kötődve gátolja a C3 konvertáz aktivitását. A heparin komplement ellenes tulajdonsága is ismert, például a C1 komplementhez kötődve gátolja azt, valamint gátolja a MAC összeállítását és blokkolja a C3 konvertáz kialakulását. A komplementrendszer szabályozó fehérjéinek génjeit felhasználó rekombináns, gátló hatású fehérjék létrehozása is lehetségesnek bizonyult. Az első ilyen mesterségesen létrehozott fehérje a szolubilis CR1 (sCR1) elnevezést kapta, és az elvégzett kísérletekben képes volt gátolni a C3- és C5 konvertázok kialakulását. Ebbe a csoportba tartozik még szolubilis rekombináns MCP és DAF, amelyek *in vitro* és *in vivo* is gátolták a komplementrendszer aktiválódását, amire a rekombináns CAB-2 nevű fehérje *in vitro* volt képes. Egy másik lehetséges módja a komplementrendszer gátlásának az antitestek alkalmazása. Ilyenek például az N19-8 és a h5G1.1, amelyek a C5 hasadását gátolják. Rekombináns DNS technológia alkalmazásával komplement-kötő antitestek és komplement szabályozó fehérjék gátlószakaszainak kombinálása is lehetővé vált, erre a hibridmolekulára példa az antidansyl antigénkötő karjának fúziója a CD59 vagy DAF molekulákkal. A komplement rendszer patológiás mértékű aktiválódásának gátlása több kórállapot és betegség esetén is kiemelt jelentőséggel bírhat, a támogató vagy definitív terápia részévé vált vagy válhat a klinikai vizsgálatok tanulságai alapján. Paroxysmalis nocturnalis hemoglobinuria (PNH) és glomerulonephritis kezelésében klinikai vizsgálatok formájában elemezték a C5 komplement-fehérje gátlásának hatásait eculizumab adásával.

A thrombolysissal vagy angioplasztikával kezelt akut szívinfarktus és kardiopulmonalis bypass műtétek esetén szintén a C5 gátlását vizsgálták pexelizumab adásával, amely szintén monoklonális antitest alapú készítmény. PNH esetében vizsgálták még a rekombináns szulubilis CD59 adásának lehetőségét is, amely a hiányzó komplement gátló molekulák pótlásán keresztül fejt ki hatását. A kardiopulmonális bypass alkalmazásával végzett szívműtétek kapcsán vizsgálták továbbá a heparin komplement rendszer gátló hatását, valamint a rekombináns szulubilis komplement receptor TP10 alkalmazásának lehetőségét. A koszorúér bypass műtét vagy trombolízissel kezelt akut szívinfarktus ellátást követően elemezték a patológiás mértékű komplement aktiválódás gátlásának lehetőségeit, ezért C1 inhibitort adtak a betegeknek. (45) A további lehetséges megoldások között került említésre a H faktor, amellyel kapcsolatban egy vizsgálatban igazolták, hogy hatékonyan képes gátolni a liposzómális és micella alapú gyógyszerek által okozott, mellékhatásokban is megnyilvánuló komplement aktivációt (46) (5. ábra).



**5. ábra:** A komplement aktivációhoz kötött pseudoallergia (CARPA) gátlására, rizikójának csökkentésére alkalmazható molekulák és stratégiák összefoglalása.

### I.3.5 Infúzió sebességének hatása az infúziós reakciók, CARPA kialakulására

Az alkalmazott lipid-alapú nanogyógyszerek infúziós sebességének empirikus lassítása korábbi vizsgálatok eredményei alapján jelentősen csökkentheti a CARPA

gyakoróságát és súlyosságát. (11, 47, 48) Egy sertéseken végzett tanulmányban leírták, hogy a multilamelláris liposzómák infúziós sebességének szignifikáns hatása volt azok reaktogenitására és az infúziós sebesség lassítása csökkent kardiopulmonális distresszhez vezetett. (49) Ezt a tendenciát egyéb kifejezetten reaktogén gyógyszerek, a biológiai terápiaként alkalmazott monoklonális antitestek esetén is leírták egy humán vizsgálatban, ahol az infúziós sebesség csökkentette a megfigyelt hiperszenzitivitási reakciók előfordulási arányát. (50) Egy vizsgálatban lassú infúziós protokoll alkalmazása mellett a CARPA előfordulási aránya kevesebb mint 2-10%-ra volt csökkenthető és az anafilaxiás reakciók aránya is 0,1%-ra csökkent. (11)

Egy sertéseken végzett CARPA vizsgálatban PEGilált liposzómális prednisolont (PLP) különböző sebességgel adták be az állatoknak. Összehasonlították a bólus infúzió hatását a 2, 3 és 4 lépésben emelt dózissal, és különböző sebességgel beadott infúziós protokollokéval. A túlérzékenységi reakciókat a hemodinamikai paraméterek folyamatos regisztrálásával, valamint a tromboxán B2 szintek mérésével követték nyomon. Azt találták, hogy a PLP bólusban vagy gyors infúzióban történő beadása átmeneti változásokat okozott a szisztémás és pulmonális vérnyomásban, valamint pulzusban. A legnagyobb mértékű eltérés a beadást követően észlelt pulmonális hipertónia volt. Azt is észlelték, hogy a hemodinamikai változásokkal párhuzamosan a plazma tromboxán B2 koncentrációja is emelkedett. A beadás következtében megfigyelt mellékhatások előfordulási arányát jelentősen csökkentette a PLP lassú infúzióban történt beadása, és a 3 óránként 3 lépésben történt dózisemeléssel protokoll alkalmazása esetén észlelték a legkevesebb túlérzékenységi reakciót. (51)

### **I.3.6. Komplement aktivációtól független, lipid alapú nanohordozókhoz köthető egyéb mellékhatások és toxicitás**

Amellett, hogy a nanohordozók fejlesztésében a toxicitás és immunogenitás csökkentése jelentette a legfontosabb motivációt, többek között azok lipid tartalma és egyéb alkotóelemei is okozhatnak mellékhatásokat, amelyek a korábban ismertetett komplement aktiváció mellett számos egyéb úton is szerepet játszhatnak a mellékhatások

patomechanizmusában. A liposzómákban található kationos lipideket a makrofágok fagocitálhatják, és a citotoxicitásban szerepet játszhatnak reaktív oxigénradikálok képződése által, valamint fokozhatják az interleukin 6 (IL6) és tumor nekrozis faktor (TNF) termelődését és így ezeken keresztül a gyulladást okozhatnak a szervezetben. A koleszterin tartalom citokinek és IgG modulálásán keresztül okozhat negatív hatásokat a komplement aktiváció mellett. A foszfolipid tartalom hozzájárulhat a hiperszenzitivitási reakciók kialakulásához, citokinek termelődéséhez, valamint a makrofágok csökkent mértékű fagocitózisához. Az anionos lipidek thrombogén hatásúak lehetnek, valamint befolyásolhatják a Th2 citokin termelődését. A liposzómák felszínén található proteinek fokozhatják a sejtek által történő felvételt, megváltoztathatják a farmakokinetikát és a célsejtek receptorait blokkolhatják. Ezek a változások potenciálisan jelentős mértékben hozzájárulhatnak a különböző mellékhatások kialakulásához. (52) A nanohordozók közvetlen kötődése masztocitákon és makrofágokon található toll-like receptorokhoz (TLR) és más veszélyjelző receptorokhoz (danger-signaling receptor, DSR) is hozzájárulhat a tünetek kialakulásához. Ezek a receptorok a patogéneken általánosan megtalálható molekuláris mintázatokat (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) ismernek fel, és a nanohordozók felületén lévő elemek ezekre hasonlíthatnak, ami hozzájárulhat a mellékhatásokhoz vezető mediátorok felszabadulásához. (44)

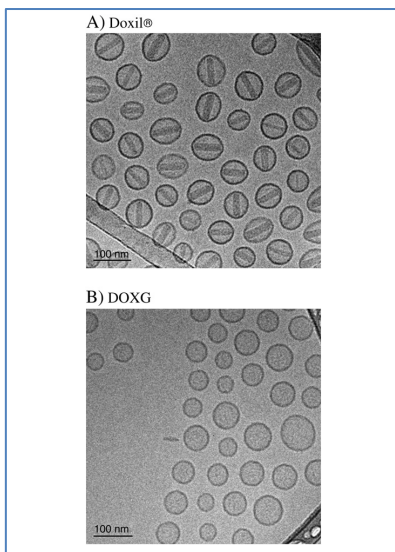
### **I.5. A lipid alapú nanohordozók fejlesztésének lehetőségei**

A nanopartikulumok szerkezetének fejlesztésére, funkcióinak kibővítésére tett kísérletekről számos publikációban olvashatunk. A nanopartikulumok membránjához, azok módosításával különféle molekulák köthetők annak érdekében, hogy a hordozó funkció mellett egyéb szerepet tölthessenek be. Ilyen például a sejtmembrán alapú nanohordozók kémiai módosítása NHS-PEG-Maleimid alkalmazásával, ami egy publikált kísérletben lehetővé tette egy nagy bioaktív molekula, az emberi rekombináns hyaluronidase stabil megkötését. Utóbbi módosítás nem csökkentette az adott nanohordozó keringési idejét, azonban alkalmassá teheti például a prosztatarák hyaluronsavas pericelluláris mátrixába történő bejutásra. (53)

Számos lipid alapú nanogyógyszer szerkezetében/összetételében megtalálható a PEG, amely a gyógyszer kijutását késlelteti, ezzel a keringési időt megnöveli, azonban a PEG káros hatása is igazolódott. Chen és munkatársai beszámoltak arról, hogy az anti-PEG antitestek befolyásolhatják a liposzómális doxorubicin biztonságosságát, és akár a terápiás hatékonyságát is olyan betegek esetében, akiknél a kezelés megelőzően is nagy mennyiségben jelen vannak ezek az antitestek. (54) Az elérhető tanulmányok szerint a lakosság magas aránya (22-44%) rendelkezik anti-PEG antitesttel a vérükben. Az antitest titer nagy egyéni variációt mutat, és a vizsgált esetek kis részében (akár 10 %-ban) magas koncentrációt mértek. Felmerül, hogy a magas anti-PEG antitest titert mutató egyének esetében a PEG-et tartalmazó nanogyógyszerekkel történő kezelésnek a rizikója magasabb lehet. Elfogadott megállapítás, hogy a liposzómák és egyéb nanogyógyszerek PEG-nek köszönhető lényeges farmakológiai és klinikai előnyeit ellensúlyozhatja a túlérzékenységi reakciók fokozott arányú megjelenése, és a hatékonyság csökkenése, amit az úgynevezett ABC jelenség okozhat. A PEG-gel módosított asparaginase (Oncaspar) az akut limfoblasztos leukémia kezelésére fejlesztették ki. Az esetek közel felében azonban anti-PEG IgM és IgG antitestek megjelenéséhez vezetett, ami összefüggést mutatott a gyors kiürüléssel és a hatékonyság csökkenésével. Egy másik klinikai vizsgálatban a betegek közel 13%-ában le kellett állítani az Oncaspar kezelést a súlyos túlérzékenységi reakciók miatt. A PEGilált uricase (Pegoticase), amit köszvény kezelésére alkalmaznak, IgG2 izotípusú anti-PEG antitestek megjelenéséhez vezetett a betegek 89%-ában, ami korrelált a túlérzékenységi reakciók megjelenésével és a kezelés sikertelenségével. A polietilén-glikol alkalmazása kapcsán felmerülő hátrányok miatt felmerült, hogy azt megváltoztatott formában alkalmazzák, vagy egyéb szerkezeti elemmel helyettesítik. Az anti-PEG antitesteken kívül számos más szerkezeti elem és tulajdonság befolyásolja a mellékhatások kialakulását egy adott nanogyógyszer beadását követően. A nanohordozók felületi töltése, különös tekintettel a pozitív töltésre, azok formája, polidiszperzitása és mérete sok más faktor mellett hozzájárul a komplement rendszer aktiválódásához és a következményes túlérzékenységi reakciók kialakulásához. (11)

A Doxilban a doxorubicin-szulfát formában található hatóanyag hosszú és rostszerű kristályokká formálódik, ami a 6. ábra A részén szereplő elektronmikroszkópos képen is látható. Ez a nano-kristály formáció a liposzómában nem alakult ki, amennyiben

a szulfát ionokat glukoronát ionokra cserélték (6. ábra B. része), ez utóbbi vegyület DOXG-nek nevezték el. A Doxilban található, doxorubicin aggregációja kapcsán kialakult nanokristályok hozzáérnek a vezikulák membránjához és elősegítik a gömbtől eltérő formájú liposzómák kialakulását. Ezt a formaváltoztató hatást nem figyelték meg a DOXG esetén, amiben nem találhatóak meg a Doxilhoz hasonló intraliposzómális nanokristályok. Ez a Doxil esetében megfigyelhető disztorzió hozzájárulhat a Doxil által okozott komplement aktivációhoz és következményes mellékhatások kialakulásához. (8)



**6. ábra:** Doxil® (doxorubicin szulfát pegilált nano-liposzómák) és DOXG (doxorubicin glucoronate pegilált nano-liposzómák) összehasonlító elektronmikroszkópos képe. A doxorubicin koncentrációja mindkét formuláció esetében 2mg/ml. (8)

Egy másik probléma, ami hozzájárulhat a liposzómák terápiás hatékonyságához, az alacsony gyógyszer koncentráció esetén megfigyelhető fokozott aggregációs hajlam, ami változó (általában kis) számú oligomerek kialakulásához vezethet. A liposzómák felszíni töltése szintén hozzájárulhat aggregátumok kialakulásához, ami a megnövekedett felszín miatt fokozhatja a komplement aktivációt és infúziós reakciók kialakulásának esélyét. (8)

## **I.6. Exoszómák, mint természetes nanohordozók modellezése a gyógyszerfejlesztésben**

A nanomedicinában általánosan megfigyelhető törekvés a természet modellezése. Amikor 50 évvel ezelőtt Bangham és Horn először vizualizálta elektronmikroszkóppal a kettős foszfolipid membránokat, azt gondolták, hogy reprodukálták a sejtek kettős kettősrétegű membránját, amit a liposzómák természetes modelljének tartottak. Nem sejtették, hogy két évtizeddel később, az exoszóma formájában felfedezik a természetben előforduló szofisztikáltabb modellt, ami a gyógyszerfejlesztésben is alapul szolgálhat a mesterséges nanohordozók kialakításában. Az exoszómákat először az 1980-as években Johnstone és munkatársai írták le, és az endoszómális kompartmentekben keletkező vezikulákként kerültek meghatározásra (multivezikuláris endoszómák), amelyek kijuthatnak az extracelluláris térbe, hogy nano-tutajokként hordozzanak biológiai információt a sejtek között. Az exoszómák különböző sejtekből eredhetnek a szervezetben az őssejtektől a differenciált sejtekig.

A pontos méret, amely általában a 30 és 100 nm közötti tartományba esik, az eredettől függ, amihez hasonlóan a struktúrájuk és a sejtek közötti kommunikációban betöltött szerepük is attól függ, hogy a szervezetben milyen sejtből erednek. Az exoszóma egy másik, azonos elemet jelölő megnevezése a mikrovezikula, azonban ezek meghatározása kevésbé pontos, tekintettel arra, hogy intra- és extracelluláris vezikulákat is jelölhetnek, amíg az exoszómák csak extracelluláris nanohordozóként kerültek meghatározásra.

Az exoszóma, kialakulásának mechanizmusából fakadóan, döntően citoszolból származó molekulákat tartalmaz, mint pl. mikro- és messenger RNS, fehérjék, peptidok és duplaszálú DNS. Az exoszómák lipid kettősrétegéhez csatlakozó fehérjék a plazmamembránból származnak, és megtartják eredeti orientációjukat. Ezek immunmoduláló és sejtjelismerő molekulák széles spektrumát mutató, általánosan előforduló vagy sejt-specifikus fehérjék lehetnek. Előbbi csoport tagjai citoszkeletális (például aktin és tubulin), membrántranszport és fúziós (például annexinek és Rab) fehérjék, integrinek és hősokk fehérjék (például immunaktivátor Hsp70, Hsc70 és Hsp90) is lehetnek. A sejt típus specifikus fehérjék közé tartoznak MHC I-es és II-es osztályú

fehérjék, amelyek antigéneket prezentálnak, tetraspaninok (CD63, CD81, CD82, CD9 és CD86), amelyek a sejt-sejt kontaktusokban és a célsejthez történő szelektív csatlakozásban játszanak szerepet. A célsejtek elérésén kívül az exoszómák felületén található fehérjéknek fontos szerepe van az immunválasz befolyásolásában az aktiváción és szupresszión keresztül is. Ezen kívül fontos megjegyezni, hogy az exoszómák a plazmamembrán fragmentumait az eredeti formában őrzik meg, így az adott sejt glikokálixát is tartalmazzák, ami fontos szerepet játszik az exoszómákkal szemben megfigyelhető veleszületett immuntoleranciában.

Az exoszómák rendszeresen kontaktusba kerülnek az immunrendszer egyes elemeivel és különböző mechanizmusokat alkalmaznak az immuntolerancia kialakítására. Az exoszómák szerepére a korai magzati fejlődésben a Fas ligandot (FasL) tartalmazó vezikulák nyújtanak bizonyítékot. Ez a molekula több immunmodulációs mechanizmusban játszik szerepet, amelyre példa az embrionális szövetekre kialakuló immuntolerancia a T sejtekben, az autoimmunitás progressziója, a T sejtek klonális deléciója, a B-sejt reguláció és az egyes szövetekben idegen antigénekre kialakuló immuntolerancia, az immunprivilegium (ilyen szerv az agy, petefészek, here, méh, placenta és a szem). A FasL két mechanizmussal alakítja ki az immuntoleranciát, egyrészt az adott antigén-specifikus limfociták apoptózisával, másrészt az így kialakuló apoptotikus elemek antigén-prezentáló sejtek (például dendritikus sejtek) által történő felvételén keresztül a regulatorikus sejtek aktivációjával. Ehhez hasonló, az immuntolerancia kialakítását eredményező mechanizmus tumorok esetében is leírásra került korábban. Egy másik immun-modulációs mechanizmus az ún. toleroszómák kiáramlása a sejtekből, amelyek antigéneket prezentálnak a II-es osztályú MHC-nek. További lehetőség a microRNS-ek eljuttatása más sejtek citoszoljába az exoszómák segítségével.

Annak ellenére, hogy az immunmodulációban fontos szerepet játszanak, magukat az exoszómákat mégsem ismeri fel idegenként az immunrendszer, ebből kifolyólag nem okoznak az egyéb, mesterséges nanohordozók által előidézett komplement aktivációt és következményes CARPA reakciót, ami sok nanogyógyszer immunogenitásának oka. Ez, az exoszómákkal szemben megfigyelhető immuntolerancia az eredeti sejtek felületi antigénjeinek „megöröklése” miatt alakulhat ki, amely megvédi az vezikulákat az



idegenként történő felismeréstől. Ezekre a fontos, exoszómákban található, korábbi vizsgálatokban leírt felületi antigénekre mutat példákat az 1. táblázat.

**1. táblázat:** immuntoleranciában szerepet játszó, exoszómákon található molekulák.

Csoport	Molekula	(Kór)élettani funkció	hivatkozás
Komplement modulátorok	CD46	Membrán kofaktor fehérje, C3 regulátora	(55)
	CD55	a lebomlás felgyorsításának gátlása a C3 regulációján keresztül	(56, 57)
	CD59	MAC (membrane attack complex) kialakulásának gátlása a C9 regulációján keresztül	(55, 56)
	CK2	a lízis megakadályozása a C9 foszforilálásán keresztül	(58)
Specifikus toleranciát kiváltó molekulák	Humán Leukocita antigén (HLA)-G I. osztálya	immuntolerancia kialakítása tumorokkal szemben	(59)
	MHC I. és II. osztálya + antigének	immuntolerancia kialakítása tumorokkal szemben	(60)
	FasL	Aktivált T sejtek apoptózisának indukciója	(58)

Az immuntoleranciát okozó, exoszómák által mutatott „lopakodó” stratégiák felvetik annak lehetőségét, hogy hasonló szerkezeti elemek alkalmazásával, hasonló tulajdonsággal bíró, a jelenlegi implementációknál kisebb immunogenitást mutató, mesterséges nanohordozók hozhatók létre. Az immuntolerancián kívül jelentős előnyt biztosíthat adott sejtek vagy szövetek célzásában az azokból kiváló exoszómák antigénspektrumának utánzása. Ezek adott, például kemoterápiában alkalmazott hatóanyagot specifikus célzással juttathatják el a célzott sejtekhez.

Az exoszómális struktúra nagy kapacitású modellezését már korábbi vizsgálatokban szemléltették. Egy publikációban például hasnyálmirigy tumorból kivont exoszómákat kombináltak *Staphylococcus enterotoxin*nal, amelyet az exoszómák felszínén lévő specifikus antigén biomarkerek segítségével eljutattak a tumorszövethez, ahol a kiáramló enterotoxin a tumorsejtek apoptózisát okozta. (61) Egy másik közleményben bemutattak egy mikro-emulzió és micella formációs módszert, amellyel exoszómát modellező, DEC205 monoklonális antitestet tartalmazó, dendritikus sejteket céljzó kationos liposzómát hoztak létre. (62) Az exoszómákat modellező, nanohordozók létrehozására irányuló próbálkozások jól mutatják, hogy a nanomedicinán belül kiemelt jelentőséggel bír a természetben előforduló hasonló vezikulák tanulmányozása a potenciális fejlesztések érdekében. (63)

## II. Célkitűzések

Munkám célkitűzése a lipid alapú nanomedicinális készítmények immunogenitásában potenciálisan szerepet játszó szerkezeti anomáliák kimutatása, valamint a CARPA háttérének klinikai gyakorlatban betöltött jelentőségének és állatmodellben észlelhető megnyilvánulásának vizsgálata az alábbi vizsgálatok elvégzésével:

1. Annak tisztázása, hogy áramlási citometria, dinamikus fényszórás (DLS) valamint elektronmikroszkópos módszerekkel észlelhetők-e liposzomális doxorubicin (Caelyx) gyári készítményében szerkezeti anomáliák, amelyek potenciálisan hozzájárulhatnak mellékhatások kialakulásához.
2. Az amphotericin B lipid-komplex alapú formulációjának, az Abelcet gyermekgyógyászati onko-hematológiai osztályon történő alkalmazása során előforduló mellékhatások és a kezelés időtartamának dokumentálása és értékelése a kezelési idő függvényében, valamint a komplement aktiváció mérése a kezelés során levett vérmintákban.
3. Az Abelcettel okozott mellékhatások és az infúziós sebesség kapcsolatának, valamint a komplement aktiváció szerepének vizsgálata altatót patkányban.

### III. Eszközök és módszerek

#### 1. Liposzómális doxorubicin gyári készítményének (Caelyx) vizsgálata dinamikus fényszórás, áramlási citometria és elektronmikroszkópos módszerekkel. (64)

A vizsgálatunkban felhasznált, budapesti gyógyszertárban vásárolt Caelyx (gyártója a Ben Venue Laboratories, Inc.) összetevői a doxorubicin HCl (2 mg/mL, 4,22 mM), hidrogenizált szójalecithin (HSPC, 9,58 mg/mL); koleszterin (3.19 mg/mL); 2K-PEG-DSPE (1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethylene glycol)] ammónium só (3,19 mg/mL); ammónium szulfát (0,2 mg/mL); hisztidin (10 mM, pH 6.5); és szukróz (10%), a teljes foszfolipid tartalma 12.8 mg/mL,  $\approx$ 13.3 mM. A készítményeket 4 C-on tároltuk felhasználásig.

##### 1.1. Caelyx vizsgálata dinamikus fényszóródás (DLS) módszerrel

A Caelyxben található részecskék méretének, méreteloszlásának vizsgálata Zetasizer Nano-S eszközzel (Malvern Panalytical Ltd, Egyesült Királyság) történt, amely 4 mW-os, 633nm-en működő, He-Ne lézert használ a fényszórás alapján történő méreteloszlás meghatározásához (7. ábra). A vizsgálatokat szobahőmérsékleten, 175,7 keps számlálási rátával, 70 másodpercig folytattuk, melyet 15 alkalommal futtattunk. Ezeket a mérési ciklusokat 3 alkalommal megismételtük, az eredményeket méreteloszlási görbék formájában, Dispersion Techonolgy Software (version 5.10, Malvern Instruments) segítségével prezentáltuk.



7. ábra: A DLS vizsgálataink során alkalmazott Malvern Zetasizer Nano.

## 1.2. Caelyx vizsgálata, szortírozása áramlási citometriával (FACS)

A FACS mérésekhez az eredeti gyári, 4 C-on tárolt, percekkel a mérés előtt felbontott Caelyx ampullákat 0,2  $\mu\text{m}$  pórusú (Millipore) filteren átszűrt, steril foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) hígítottuk 250-, 500-, 1000- és 2000-szeres hígításban külön eldobható küvetákban. Ezt követően az oldatokat további 10-szeres hígítás után, 1 percig vortexeltük közvetlenül a FACS mérések megelőzően, amelyeket a Becton Dickinson FACScan készüléken (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) végeztünk el (8. ábra). A kalibrációt a méretanalízishez a Fluoresbrite® Carboxylated polystyrene Size Range kit (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) felhasználásával végeztük el, amely ismert méretű (100, 200, 500, 750 and 1019 nm) latex gyöngyöket tartalmazott. A részecskék analízise egy percig vagy 20000 részecskeszám eléréséig történt. A részecskeszámok és a részecskék fényszórása (FSC: forward scatter, SSC: side scatter) szobahőmérsékleten került rögzítésre.



**8. ábra:** az áramlási citometria vizsgálatunk során alkalmazott Becton Dickinson FACScan.

A Caelyxben található nagyobb méretű részecskék szűrése ún. „sorting” funkcióval ellátott, Becton Dickinson FACSria (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Egyesült Államok) áramlási citométeren történt a fényszórási ábrán megjelenő, 500 nm feletti részecskék kapuzásával. Ezt követően a frakcionált mintát méretanalízis céljából ismét DLS metodikával vizsgáltuk, valamint azokról elektronmikroszkópos felvételeket készítettünk.

## 1.3. Caelyx vizsgálata elektronmikroszkóppal

Az elektronmikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez a liposzómákat uranil-

acetáttal, negatív festés formájában kezeltük standard technológiát használva. A mintákról 200kV-on, FEI Tecnai G2 (FEI Company, Hillsboro, Oregon, Egyesült Államok) elektronmikroszkóppal készítettünk felvételeket. (64)

## **2. Gyermekgyógyászati onko-hematológiai betegek Abelcet kezelése során észlelt mellékhatások vizsgálata**

Ez a tanulmány a Tudományos és Kutatásetikai Bizottság által adott engedély (Tudományos és Kutatásetikai Bizottság 15576/2018/EKU) kiadását követően, Prof. Dr. Szabó András klinikaigazgató felügyeletével zajlott a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján. A vizsgálatban 22 gyermekonkológiai beteg Abelcet kezelése során rögzítettük a betegek nemét, életkorát, az alkalmazott premedikációt, valamint az észlelt mellékhatásokat. 6 beteg esetében az Abelcet kezelés megkezdése előtt közvetlenül (0. percben), valamint az infúzió adásának 10. és 60. percében vérvétel történt klinikai használatban alkalmazott EDTA konténerekbe, a mintákat centrifugálást követően -80°C fokon tároltuk, melyet követően a vérmintákban (P1-P6) a komplement aktiváció mértékének meghatározása céljából sC5b-9 koncentrációt mértünk a továbbiakban ismertetett eszközökkel.

A fenti tanulmány kiegészítéseként Abelcet *in vitro* inkubálása történt három egészséges humán donor szérumában (S1, S2, S3), majd az sC5b-9 koncentrációját ( $\mu\text{g/ml}$ ) határoztuk meg az idő függvényében (0., 10., 30., és 60. percben) az alábbi eszközökkel.

## **3. Abelcet infúzió sebesség hatásának vizsgálata állatmodellben**

Minden elvégzett állatkísérlet összhangban volt az NIH (National Institute of Health, USA) irányelveivel és a Magyarország törvényeivel. A kísérleti protokollt jóváhagyta a Pest Megyei Kormányhivatal és a budapesti Semmelweis Egyetem Állat Etikai Bizottsága (regisztrációs szám: PEI-001/3948-6/2014). A kísérleti állatok a Toxicoop Kft. (Budapest, Magyarország) cégtől vásárolt hím „Wistar” patkányok voltak, amelyeket pentobarbitállal (90 mg/kg, intraperitonealisan alkalmazva, Sigma Aldrich,

Budapest, Magyarország) elaltattunk, szükség esetén kis dózisban (10 mg/kg) ismételtük. Az állatokat 10 mg/kg Abelcet dózissal kezeltük 1, 5, valamint 20 perces intravénás infúzió formájában. Két állat amphotericin B infúzióban Semmelweis Központi Gyógyszertár) is részesült 0,1 mg/kg intravénás dózisban 20 perc alatt, utóbbi dózist megelőző kísérletek alapján határoztuk meg, amelyekben a szabad amphotericin B 10 mg/kg és 1mg/kg dózisban is halálos kimenetelű hipotenziós sokkot okozott néhány perccel a beadást követően. Az artériás középnyomást (MABP, mean arterial blood pressure) mérése a bal femorális artériában, BPR-02 nyomásmérő és HG-01D erősítő (Experimetria Kft., Budapest, Magyarország) használatával mértük. Az adatok rögzítése PowerLab (ADIstruments Ltd., Oxford, Egyesült Királyság) rendszerrel, LabChart (ADIstruments Ltd., Oxford, Egyesült Királyság) analízáló programmal történt.

#### **4. A komplement aktiváció és vérkép eltérések vizsgálata**

ELISA módszerrel történt a vérplazma C3a koncentrációjának (Cloud- Clone Corp, Katy, TX 77494, USA), valamint a tromboxán B2 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) mérése. A humán vérplazmában az SC5b-9 szintekmeghatározása C5b-9 ELISA szett segítségével történt, mely a TecoMedical (Sissach, Switzerland) cégtől került beszerezésre. Vérkép vizsgálatok során az Abacus Vet5 hematology analyzer (Diatron MI Co., Budapest, Hungary) készüléket alkalmaztuk..

#### **5. Statisztikai analízis**

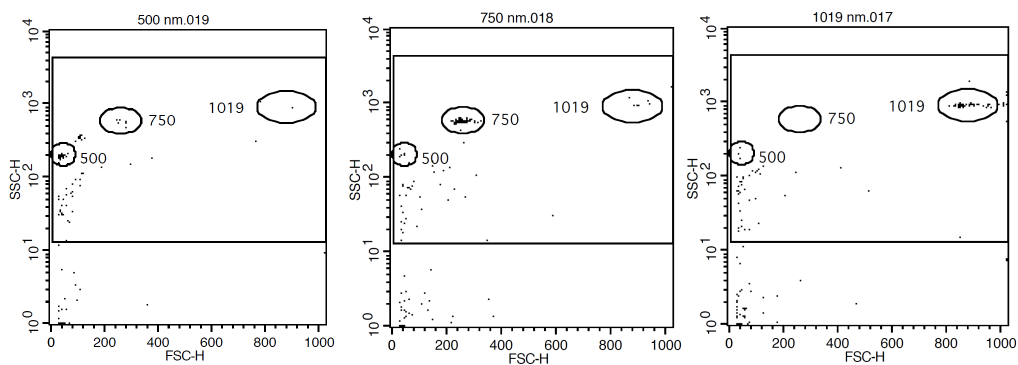
A bemutatott adatok az átlagokat  $\pm$  standard hibákat mutatják. A statisztikai analízist T próba vagy kétszemponos ANOVA módszerrel végeztük a megismételt mérések esetében, melyet Sidak féle többszörös összehasonlítás követett. Az idő függvényében rögzített változásokat minden csoportban egyszemponos ANOVA módszerrel analizáltuk a megismételt mérések esetében, amiken Dunett féle többszörös összehasonlítás tesztet végeztünk (GraphPad Prism 6. verzió Windows operációs rendszerre; GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

## IV. Eredmények

### 1. Caelyx vizsgálata áramlási citometriával

#### 1.1. Becton Dickinson áramlási citométer kalibrálása latex gyöngyökkel

A vizsgálatunkban használt áramlási citométer latex gyöngyökkel végzett kalibrálása során az 500, 750 és 1019 nm átmérőjű részecskék emelkedő FSC vs. SSC értékeknek megfelelően ábrázolódtak a szórásdiagramon (9. ábra). Ez megfelel a korábban Durand és munkatársai által leírt (65), a FACS analitikában ismert nem lineáris arányosságnak, azonban a kísérletben felhasznált oldatban jelen lévő 100 és 200 nm átmérőjű gyöngyök a szórásdiagramon nem voltak láthatóak, ami az áramlási citométer detektálási mérethatárával magyarázható, és arra utal, hogy a használt FACScan csakis az 500nm-es méretű és annál nagyobb részecskék detektálására volt képes.

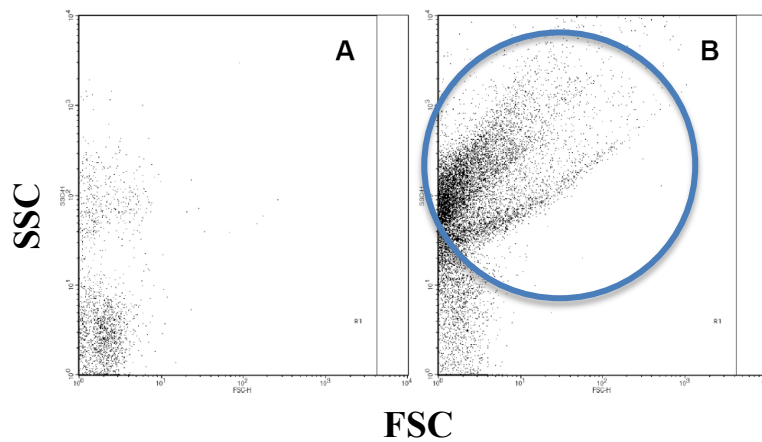


**9. ábra:** Ismert méretű (A: 500, B: 750, C: 1050 nm) kalibrációs latex gyöngyök szórásdiagramja az SSC és FSC függvényében. (64)

#### 1.2. Caelyxben látható makrorészecskék észlelése áramlási citométerrel

A 10. ábra a Caelyx FSC vs. SSC szórásdiagramját ábrázolja, amelyen látható részecskék a kalibráció alapján az 500 nm-nél nagyobb tartományba estek. A méréseket több (>5) Caelyx készítmény felhasználásával elvégeztük, a minták szórásdiagramjai a vizualizált csóvákban hasonlóságot mutattak.





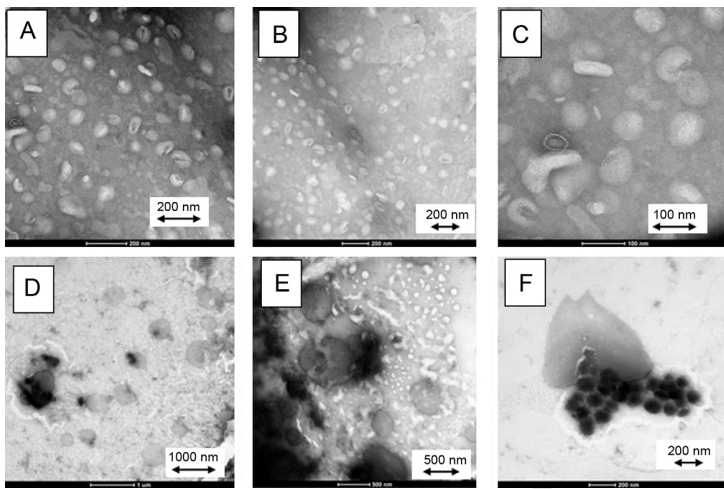
**10. ábra:** SSC vs. FSC szórásdiagram kontrollként használt PBS (A) és Caelyx (B) FACS mérése esetén. (64)

### 1.3. A Caelyxben található szupravezikuláris struktúrák szeparációja és morfológiai analízise

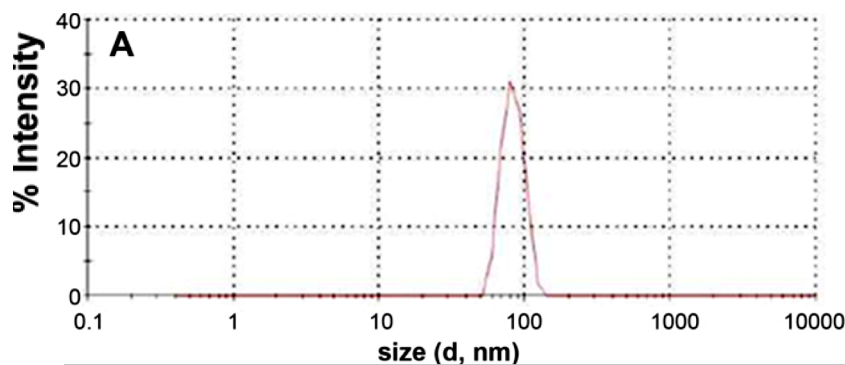
A Caelyxben bármilyen okból található szupravezikuláris makro-részecskék kimutatására a liposzómáknál nagyobb részecskék szeparálása érdekében szortírozó funkcióval ellátott FACS készüléket alkalmaztunk, majd a teljes mintát és az elkülönített frakciót elektronmikroszkópos ábrázolás és méretanalízis segítségével összehasonlítottuk. Az 12. ábra A részén látható, hogy a szortírozás nélkül vizsgált Caelyxben mért részecskék szűk mérettartományban ábrázolódtak 80 nm-es átlaggal, ami megfelel a liposzómális doxorubicin gyári készítményében várt értékeknek (Caelyx/Doxil). Az 12. ábra B részén a szortírozott, nagyobb részecskéket tartalmazó minták láthatóak, amelyek a szortírozás nélküli teljes mintában is látható csúcson kívül egy széles mérettartományú (400-1010nm) 600 nanométernél csúcsosodó görbe volt látható, amely megfeleltethető a FACS-on kapuzott és szortírozott részecskék méretének, ezzel alátámasztva a Caelyxben található, stabil szupravezikuláris struktúrák létezését.

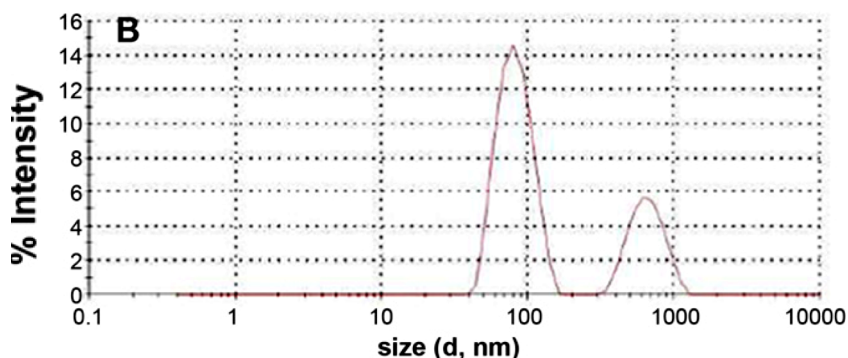
A fentiekben szemléltetett konklúzióknak megfelelően, a szortírozás nélküli Caelyx mintáról készített elektronmikroszkópos felvételeken (11. ábra A-C) döntően

különálló liposzómák láthatóak elvértve kávébabszerű, ovális vagy patkószerű alakú Caelyx vezikulumokkal. A 11. ábra D és F része a szortírozott Caelyx frakciót ábrázolja, amelyeken nagyobb számban 300-1000 nm-es, különböző amorf anyagokból (legnagyobb valószínűséggel szolid lipid részecskékből) álló, és egyéb morfológiai elemeket mutató szupravezikuláris struktúrák láthatóak. Ezek között az 11. ábra F részén egy 600 nm-es részecske látható, amely két tucat tökéletesen szferikus Caelyx-méretű vezikulákból áll.



**11. ábra:** Caelyx liposzómák elektronmikroszkópos felvételei az 500 nm feletti részecskék szortírozása előtt (A-C) és azt követően (D-F). Az alkalmazott negatív festés a szövegben található leírásnak megfelelően történt. (64)





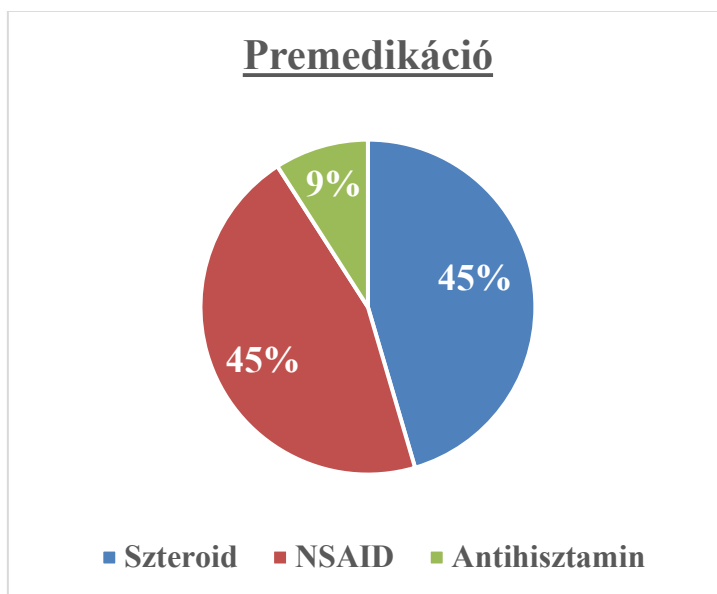
12. ábra: Caelyx DLS vizsgálata szortírozás előtt (A) és után (B). (64)

## 2. Klinikai vizsgálat és állatkísérletek

### 2.1. Mellékhatások vizsgálata

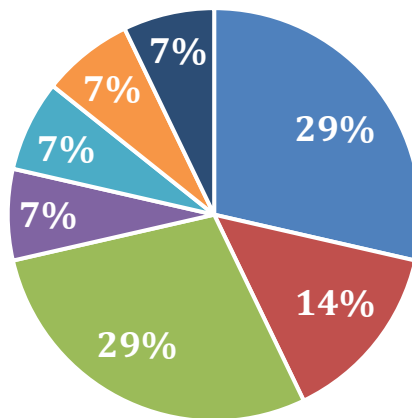
A klinikai vizsgálatunkba 14 fiú- és 8 lánygyermek került bevonásra a 9 hónap és 17 év közötti életkortartományban (2. táblázat). A betegek 5 mg/kg Abelcet kezelésben részesültek gombaszepszisre utaló különböző tünetek, laboratóriumi eltérések és radiológiai eltérések kapcsán, amelyek közé tartozott többek között az emelkedett CRP általában normális procalcitonin (PCT) érték mellett, a mucositis, a láz, kóros mellkasröntgen. Figyelembe véve az invazív gombafertőzések esetén ajánlott Abelcet infúziós sebességet (2,5 mg/kg/óra), egy beteg kivételével a vizsgálatba bevont gyermekek mindegyike 2-3-szor lassabb infúziós sebességgel kapta az Abelcet kezelést, mint a gyógyszerleírásban jelenleg ajánlott 2 óra. Azonban ezzel az óvintézkedéssel együtt is 7 gyermeknél figyeltünk meg infúziós reakciót a vizsgálatba bevont 22 beteg közül (2. táblázatban látható félkövér, dőlt betűkkel kiemelt rész) ami nagyobb gyakoriságot (32%) mutat a felnőttek bevonásával készült korábbi tanulmányok eredményeihez (3-18%) képest. Az Abelcet beadását megelőzően az általános klinikai gyakorlatnak megfelelően, a kezelőorvos vagy ügyeletes orvos egyéni megítélése szerint alkalmazott nem-szteroid gyulladásgátló, szteroid vagy antihisztamin adása (13. ábrán látható az egyes gyógyszer csoportok alkalmazási aránya a premedikáció során), az infúzió beadása során észlelt infúziós reakciókat érdemben nem befolyásolta. A vizsgálat során bevont betegek életkora, amelyek tartománya 9 hónap és 17 év között volt, szintén nem mutatott szignifikáns összefüggést az Abelcethez köthetően kialakult tünetek

előfordulásával vagy súlyosságával kapcsolatban. A megfigyelt infúziós reakció az esetek döntő többségében az első kezelésnél jelentkezett, a további adagok beadása közben csak egy betegnél volt észlelhető. A különböző tünetek formájában jelentkező mellékhatások közé tartozott a betegek közel felénél észlelt, hirtelen jelentkező láz, valamint a betegek felénél jelentkező hidegrázás. A betegek kisebb százalékában urticária, hipotenzió, ödéma vagy nyugtalanság jelentkezett, ami szintén infúziós reakcióként értékelhető. (14. ábra)



**13. ábra:** Abelcet beadása előtt, az infúziós reakciók megelőzését célzó gyógyszer alkalmazásának százalékos aránya.

### Infúziós reakció során észlelt tünetek



- AL (alacsony láz)    ■ ML (magas láz)    ■ H (hidegrázás)
- U (urticaria)        ■ HT (hipotenzió)    ■ O (Odema)
- NY (nyugtalanság)

**14. ábra:** Abelcet intravénás beadását követően észlelt mellékhatások előfordulásának százalékos aránya.

Továbbá a vizsgálatunk során 10-ből 6 esetben észleltünk infúziós reakciókat abban a csoportban, ahol 2-4 óra volt az infúziós idő, de csak 14-ből 1 esetben volt hasonló reakció 5-6 órás infúziós idő esetén. Az infúziós reakciók vizsgálatunkban észlelt nagyobb gyakoriságának oka nem tisztázott, de felveti az infekció miatt kialakult immunaktivációhoz köthető érzékenyítés lehetőségét. Ez a hipotézis, valamint a patogén és életkor szerepe a megfigyelt jelenségben további tanulmányok elvégzését teszi szükségessé.

**2. táblázat:** Túlérzékenységi reakciók az invazív gombafertőzések miatt i.v. Abelcettel kezelt gyermekekben.

*A szaggatott vonal feletti adatok a retrospektív analízist mutatják, az alatta lévő részben láthatóak a prospektív vizsgálat eredményei, melyben levett vérminták analízisét is elvégeztük.*

*\*A vizsgált időszakban több kezelési ciklusban részesült betegek. \*\*Rövidítések: NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug/ non-szteroid gyulladásgátló gyógyszer; AH, antihisztamin; ML, magas láz (38-39°C); AL, alacsony láz (38-39°C); H, hidegrázás; HT, hipotenzió; O, ödéma; U, urticaria; NY, nyugtalanság; V, hányás  
\*\*\*HSR=hypersensitivity reaction/ hiperszenzitivitási reakció Grade I= helyi reakció, Grade II= enyhétől közepes szisztémás reakció, Grade III= súlyos szisztémás reakció, anafilaxis*

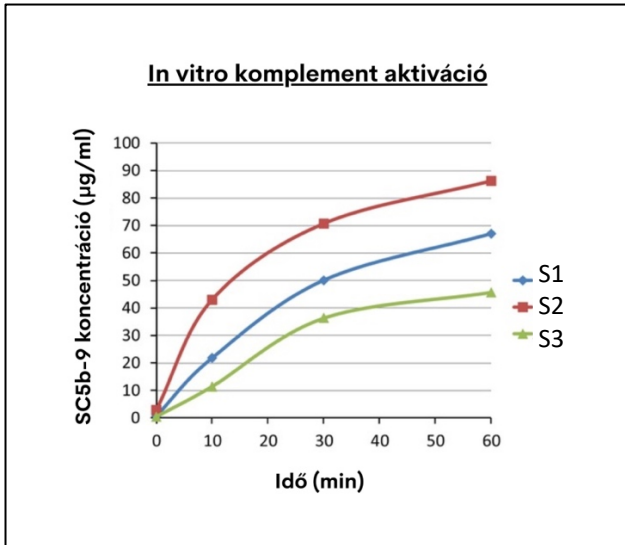
Beteg*	Nem/életkor (év)	Infúziós idő (óra)	Premedikáció**	Tünetek**	HSR fok***
<b>1</b>	<b>F/12</b>	<b>2</b>	<b>-</b>	<b>AL, H, U</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>M/1</b>	<b>4</b>	<b>szteroid</b>	<b>AL</b>	<b>2</b>
3	M/6	4	NSAID		
4/1*	F/8	4	-		
<b>4/2*</b>	<b>F/8</b>	<b>4</b>	<b>-</b>	<b>H</b>	<b>2</b>
<b>5</b>	<b>M/1</b>	<b>4</b>	<b>szteroid, NSAID</b>	<b>ML, H, V, NY</b>	<b>2</b>
6	F/9 hónapos	4	-		
<b>7</b>	<b>M/16</b>	<b>4</b>	<b>NSAID</b>	<b>AL, H</b>	<b>2</b>
<b>8</b>	<b>F/7</b>	<b>4</b>	<b>szteroid, NSAID</b>	<b>AL</b>	<b>2</b>
<b>9</b>	<b>M/17</b>	<b>5</b>	<b>szteroid, NSAID</b>	<b>ML, H, HT, O</b>	<b>3</b>
10	M/15	5	-		
11	F/15	5	NSAID		
12/1*	M/17	6	-		
12/2*	M17	6	-		

13	M/5	6	szteroid, AH
14	F/6	6	-
15	M/11	6	szteroid
16	F/9	6	NSAID
-----			
17	M/13	4	szteroid, NSAID, AH
18	M/16	5	szteroid, NSAID
19	M/6	5	-
20	F/16	6	-
21	M/3	6	szteroid, NSAID
22	F/8	6	szteroid

## 2.2. A komplement rendszer szerepe az Abelcet által okozott infúziós reakciós kialakulásában

Az Abelcet által okozott infúziós reakciókat bemutató táblázatban felsorolt tünetek jellemzőek a CARPA reakcióra is, azonban más, komplement aktiválódástól független mechanizmusok is szerepet játszhatnak, amelyek közé tartozik a masztociták, makrofágok, fehérvérsejtek és már gyulladásban résztvevő sejtek allergén mediátor termelésének indukálása. Tekintettel a tisztázatlan patomechanizmusra, tanulmányoztuk a komplement aktiváció szerepét az Abelcettel okozott reakciókban *in vitro* és 6 beteg esetében *in vivo*.

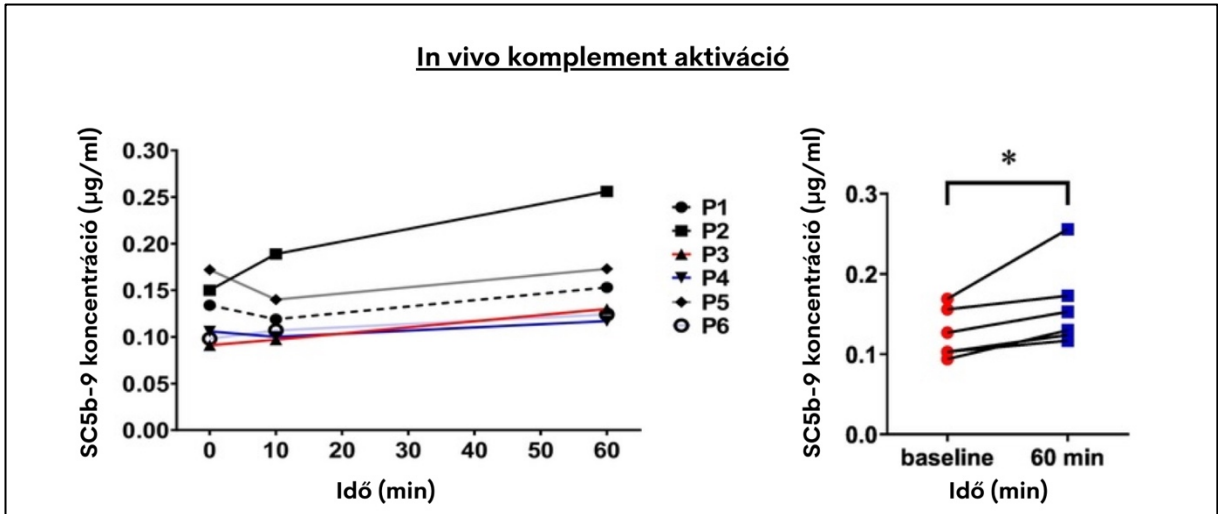
Az *in vitro* vizsgálatok célja annak bemutatása volt, hogy a klinikai gyakorlatban alkalmazott Abelcet képes aktiválni a komplement rendszert, ahogyan az emberek (66) és egerek (31) esetében is bemutatták korábban *in vivo*. Ennek megfelelően 3 egészséges humán szérumban inkubáltunk Abelcetet, és megmértük az sC5b-9 koncentráció emelkedését, mint a komplement aktiválódás végpontját. A 0, 10, 30 és 60 perc után a mért mintákban következetes és szignifikáns SsC5b-9 emelkedést észleltünk mind a 3 szérumban, ami bizonyítékkal szolgál arra, hogy az Abelcet képes aktiválni a komplement rendszert emberben is.



**15. ábra:** Abelcet *in vitro* inkubálása három egészséges humán donor szérumban (S1, S2, S3), majd a komplement aktiváció mértékének mérése a terminális komplex (sC5b-9) koncentrációjának ( $\mu\text{g/ml}$ ) meghatározásával az idő függvényében (0., 10., 30., és 60. percben).

A 16. ábra mutatja be az *in vivo* komplement mérések eredményeit, amelyek során az sC5b-9 koncentrációt vizsgáltuk 6 betegből vett szérumban, akiktől a 4-6 órás infúzióban beadott Abelcet kezelés során vettünk mintákat a kezelés kezdetekor, majd 10 és 60 perccel később. Ezekben az esetekben az alkalmazott 4-6 órás beadási idő 2-3-szor volt lassabb, mint a gyógyszerleírásban javasolt 2,5 mg/kg/órás infúziós sebesség. Az 10 percnél levett mintákban a kezdeti értékekhez képest nem észleltünk következetes, szignifikáns eltéréseket (16. A ábra), azonban a 60 percnél levett mintákban az sC5b-9 koncentráció kismértékű, de szignifikáns emelkedését észleltük (16. B ábra). Az utóbbi eredmény megfelel a kismértékű, korlátozott komplement aktivációnak.





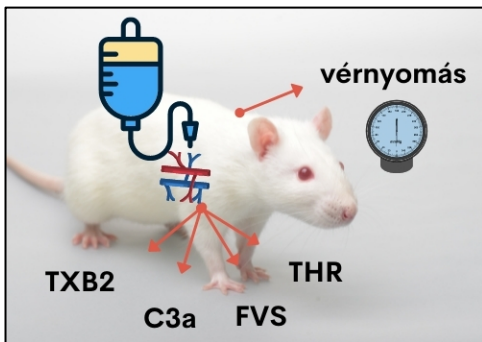
**16. ábra:** *In vivo* komplement aktiváció mérése Abelcet intravénás kezelésében részesülő onkológiai beteg gyermekek esetében a terminális komplex (sC5b-9) koncentrációjának (µg/ml) meghatározásával az idő függvényében (az infúzió beadásának 0., 10. és 60. percében történt mintavétel).

Figyelembe véve egy korábbi klinikai vizsgálatot, amelyben egy liposzómás nanomedicinális gyógyszer (Doxil) beadásához kapcsolatosan infúziós reakciót csak azokban a betegekben észleltek, amelyeknél az sC5b-9 koncentrációk 5-10-szeres mértékben emelkedtek a kezdeti értékekhez képest (67), az *in vivo* klinikai vizsgálatunkban az Abelcet kezelésben részesült betegeknél észlelt 10-60%-os sC5b-9 koncentráció emelkedés kapcsán nem volt várható komplement aktivációhoz kapcsolódó mellékhatás kialakulása. Ennek megfelelően ezeknél a betegeknél nem észleltünk infúziós reakciókat (ez az eredmény az 2. táblázat szaggatott vonal alatti részén látható), valamint közvetetten alátámasztják az Abelcettel okozott infúziós reakciók CARPA mechanizmusát. Továbbá, ezek az adatok azt sugallják, hogy az infúziós sebesség ilyen mértékű lassítása szükséges lehet a komplement aktiválódásának biztonságos szinten tartásához, amely nem éri el a pseudoallergiás reakció klinikai megjelenéséhez szükséges szintet. A gyermekonkológiai betegek Abelcet kezelése során vérminták levételével, majd az sC5b-9 szintek mérésével végzett prospektív vizsgálatunk a klinikai gyakorlat változtatása nélkül történt, ebben a szakaszban az alkalmazott lassabb infúziós sebesség és premedikáció mellett a vizsgált korszámú betegcsoportban mellékhatásokat,

infúziós reakciót nem észleltünk, emiatt érdemi komplement koncentráció emelkedés sem volt várható.

Bár ezek az eredmények megegyeznek a komplement rendszerrel kapcsolatos jelenlegi tudásunkkal, kiemelik a klinikai vizsgálatok korlátait a komplement rendszer mellékhatásokban betöltött szerepének vizsgálatában. Emiatt megterveztünk egy utóvizsgálatot, amiben egy patkány modell alkalmazásával analizáltuk ezt a kérdéskört.

### 2.3. Az Abelcettel okozott CARPA patkány modellje



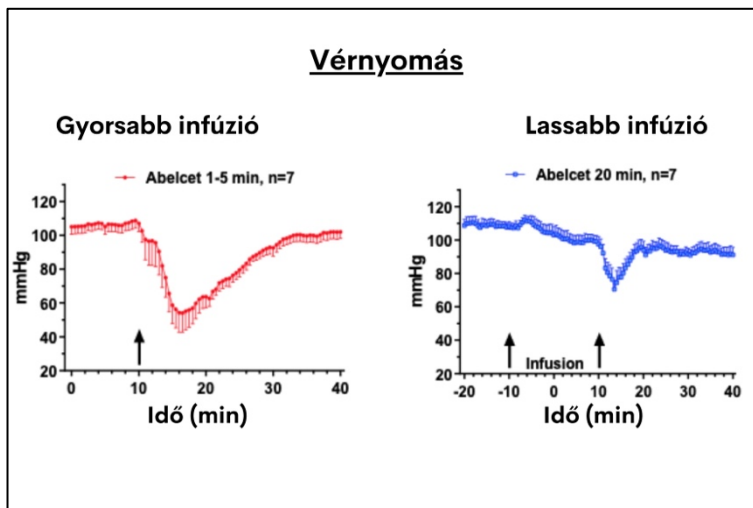
**17. ábra:** A fenti képen a vizsgálatainkban alkalmazott patkány kísérletet szemléltetjük a mért paraméterek és laborvizsgálatok feltüntetésével (vérnyomás, TXB2: tromboxán B2, C3a, FVS: fehérvérsejtszám, THR: thrombocitaszám).

Annak érdekében, hogy közvetlen bizonyítékot keressünk az infúziós sebesség meghatározó szerepére a komplement aktivációban, egy patkány modellt hoztunk létre, amelyben az állatokat 1, 5 és 20 percen keresztül infundáltuk Abelcettel. Az első két csoportra gyors (az 1 és 5 perces infúziós sebességeket összevontuk), a 20 perces kezelésre pedig lassú infúziós sebességként hivatkozunk. Annak érdekében, hogy bemutassuk a szabad amphotericin B hatását a megfigyelt reakciókra, két állatot 0,1mg /kg i.v. dózisban 20 percig alatt kezeltünk a hatóanyag szabad formájával (20. ábra).

A szisztémás vérnyomás ((mean arterial blood pressure, MABP), fehérvérsejtszám (WBC), thrombocytaszám és plazma tromboxán B2 (TXB2) koncentrációváltozásait az infúziós reakciók végpontjaiként rögzítettük, valamint a plazma C3a koncentrációkat

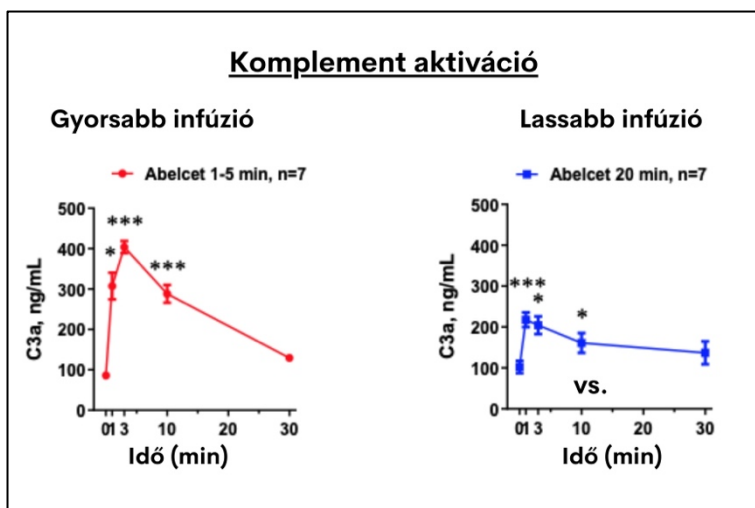
mértük, ami a komplement aktiváció biomarkere (17. ábra). Az 1 és 5 perces értékek összevonását a „gyors infúzió” csoportban az összes végpontban mért különbségek hiányával indokoltuk.

A 18. ábrán látható, hogy 10 mg/kg Abelcet intravénás infúziója a patkányokban az artériás középnyomás csökkenéséhez vezetett, amely 5 percen belül elérte a mélypontot és 20 percen belül visszatért a normálértékhez. Ez az átmeneti MABP csökkenés, amely korábbi tanulmányok alapján jellemző CARPA reakció patkányokban és egerekben is, szignifikánsan nagyobb mértékű és tartósabb volt a gyors infúzió esetében a lassabb beadással szemben.



**18. ábra:** Vérnyomás változások gyorsabb (1-5 min) és lassabb (20 min) Abelcet infúzió kezelés során patkányokban.

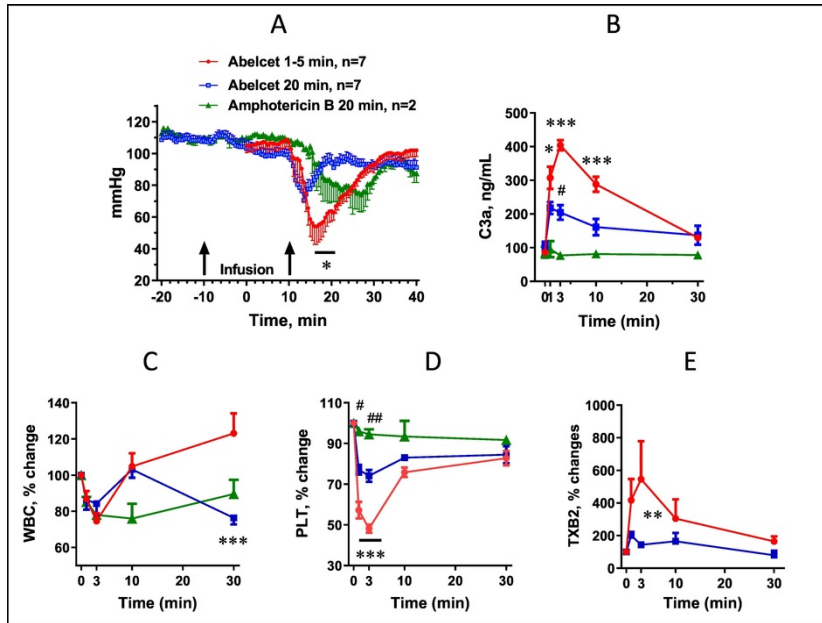
Ehhez hasonlóan a gyors infúzió szignifikánsan nagyobb mértékű (4-szeres) C3a komplement koncentráció emelkedést (19. ábra) eredményezett a lassú infúzióval összehasonlítva.



**19. ábra:** Komplement aktiváció vizsgálata a C3a komplement szintjének mérésével gyorsabb (1-5 min) és lassabb (20 min) Abelcet infúzió beadása során patkányokban.

Egy további szignifikáns különbség volt az infúziós sebesség tekintetében az volt, hogy a gyors infúziónál a kezdeti leukopeniát követően 30 perc után kompenzatórikus leukocytosis volt megfigyelhető, míg a lassú infúziót után leukopenia volt észlelhető (20. ábra C része). A gyors infúziót követően trombocitopénia (20. ábra D része), és TXB2 koncentráció emelkedés (20. ábra E része) is megfigyelhető volt.

A 20. ábra A és C része arra is rávilágít, hogy a lipid-mentes szabad amphotericin B az Abelcethez képest 100-szor kisebb dózisban beadva is átmeneti vérnyomás csökkenéshez és leukopeniához vezetett. Ez a hatás hasonló volt a lassú Abelcet infúzió esetében megfigyelt változáshoz, azzal a különbséggel, hogy a vérnyomáscsökkenés maximuma (mélypontja) 10 perccel később jelentkezett. Továbbá a plazma C3a koncentráció és a trombocitaszám nem változott a szabad amphotericin B beadását követően (20. Ábra, B és D), ami arra utal, hogy az amphotericin B nem okoz komplement aktivációt lipid-mentes, szabad hatóanyag beadása esetén.



**20. ábra:** Infúziós sebesség hatása az Abelcet beadását követően észlelt mellékhatásokra patkányokban. \*, \*\*, \*\*\*:  $P < 0,5$ ,  $0,01$ ,  $0,001$  az 1-5 perces és 20 perces infúziós csoportok között. #, ##:  $P < 0,5$ ,  $0,01$  a 20 perces infúziós csoport és az amphotericin B-vel kezelt csoport között. (68)

## V. Megbeszélés

### 1. Caelyx vizsgálata dinamikus fényszórás, áramlási citometria és elektronmikroszkóp módszerek alkalmazásával.

A liposzómális gyógyszerek fizikokémiai stabilitása hosszú ideg történő tárolás során elengedhetetlen feltétele a klinikai használatuknak, azonban ezt a feltételt nem könnyű teljesíteni a komplex, több összetevőből és részből álló nanogyógyszerek, így a liposzómák esetében sem. Az aktív hatóanyag kémiai stabilitása mellett fontos a nanohordozók mérete, méreteloszlása, lipid kettősrétegének szerkezete, felszíni töltése, valamint a részecskék aggregálódási ill. fúziós hajlama, amelyek precíz meghatározása a preklinikai stabilitás vizsgálatok fontos része. Ezeknek a paramétereknek a mérésére számos, széles körben elfogadott és alkalmazott módszer ismert, azonban kivételnek tekinthetők a szupravezikuláris makroformációk, például aggregátumok vagy fúzionált liposzómák detektálása, amelyek vizsgálata nehézségekbe ütközhet a teljes oldat tekintetében relatív alacsony előfordulási arányuk miatt, mert a vizsgálati módszerek detektálási korlátai potenciálisan nehezíthetik a kimutatásukat. Habár az aggregátumok vizualizálhatóak lehetnek elektronmikroszkóppal, ez a döntően szemikvantitatív vizsgálati módszer nem elégíti ki a minőségellenőrzési feltételeket a gyógyszerfelügyeleti hatóságok esetében. (64)

A DLS ismert és széles körben alkalmazott módszer a nanogyógyszerek vizsgálatában az átlagos méret és méreteloszlás meghatározására, azonban a méréseink eredményei felhívják a figyelmet a vizsgálatot korlátozó fontos tényezőkre. A vizsgálatink során többek között arra a kérdésre kerestük a választ, hogy a Caelyx oldatának DLS módszerrel történő mérése önmagában alkalmas-e az oldatban potenciális jelen lévő kis számú, liposzómáknál nagyobb részecskék kimutatására, mérettartományának meghatározására. Az általunk vizsgált liposzómális doxorubicin készítmények (Caelyx) oldataiban DLS módszerrel észlelt részecskék következetesen szűk mérettartományban, 80 és 90 nm közötti átlaggal ábrázolódtak, ami megfelel a gyári készítményében várt értékeknek és homogenitásnak (Caelyx/Doxil). Ezzel a

méréssorozattal megerősítettük, hogy a liposzómális doxorubicin (Caelyx) gyári oldatában kizárólag a DLS módszert alkalmazva nem észlelhetők a liposzómáknál jelentősen nagyobb részecskék, ami két okból lehetséges. Az egyik ok az lehet, hogy az oldatban ténylegesen egyáltalán nem találhatóak a liposzómáknál nagyobb részecskék, például aggregált vagy fuzionált liposzómák, esetleg kontaminációval oldatba került makromolekulák. A másik lehetőség a DLS módszer gyakorlatban is fontos, az FDA nanomedicinális gyógyszerek fejlesztésével foglalkozó ajánlásában is szereplő elméleti korlátja, miszerint ez a metodika nem alkalmas kis számú részecskepopulációk elkülönítésére döntően homogén szuszpenziókban, így többek között a szuszpenzióban potenciálisan jelen lévő kis számú nagyobb részecske kimutatására sem alkalmas. A DLS módszer korlátozó tényezői közé tartozik továbbá, hogy a hidrodinamikus rádiusz, azaz a részecskék méretének ( $R_h$ ) kiszámítása feltételezi, hogy azok tökéletes gömb alakúak, valamint a méretük és formájuk is stabil. A vizsgálataink során is alkalmazott intenzitás alapú méretmeghatározás a nagyobb részecskéket szignifikánsan nagyobb mértékben veszi számításba, hiszen azok több fényt szórnak, mint a kisebb részecskék, de még itt is fontos korlátot jelent, hogy a részecske szubpopulációk csak akkor jelennek meg külön, ha az átlagos mérettől 2-3-szoros mértékben különböznek. Ezekből egyenesen következik, hogy az oldatban arányosan jelentősen kisebb számban jelen lévő makrorészecskék a liposzómák mellett potenciálisan nehezen kimutatható szubpopulációt képviselnek a DLS módszer esetében.

Két módszert alkalmaztunk annak érdekében, hogy a Caelyx oldatában potenciálisan jelen lévő, arányosan kisebb számú, nagyobb méretű részecskék létezését igazoljuk. Az egyik ilyen módszer az áramlási citometria volt, amely fluoreszcens jelölés nélkül is alkalmas lehet egyes részecskék észlelésére és mennyiségi meghatározására. A méréseink során használt áramlási citométer, az ismert méretű latex gyöngyökkel végzett kalibrációval is megerősítve, nem alkalmas különálló, standard méretű (80-90 nm-es) liposzómák észlelésére, azonban az oldatban bármilyen okból jelen lévő, nagyobb méretű (nagyobb, mint 500 nm-es) részecskék mérésére még akkor is alkalmas lehet, ha azok száma az oldatban alacsony. Ezért tájékozódó jelleggel a laborunkban rendelkezésre álló áramlási citométerrel a sterilen kezelt, 22-nm-es szűrőn átszűrt PBS pufferoldattal hígított, gyógyszertárból beszerzett gyári Caelyx oldatokat megvizsgáltuk különböző mértékű hígításokban. A méréseink azt mutatták, hogy az oldatban több ezer, mérésel

feletti (500 nm-nél nagyobb) részecske volt látható a kapott szórásdiagramon, annak ellenére, hogy a korábbi DLS vizsgálat során ez a részecske populáció nem volt észlelhető, hiszen a dinamikus fényszórás módszerrel korábban mért Caelyx oldatban csak a liposzómák ismert méretének megfelelő csúcs látszódott, nagyobb molekulákra utaló szubpopuláció nem volt látható. Annak ellenére, hogy a köpenyfolyadéként használt pufferoldatot (PBS) tartalmazó kontroll mintában is láthatóak részecskéknek megfelelő pontok a szórásdiagramon, amelyek akár műtermékek is lehetnek, a Caelyx mérése során észlelt szórásdiagram ettől jelentősen és következetesen eltért, annak szórásdiagramján szignifikánsan több részecske volt látható jellegzetes mintázatot alkotva. A vizsgálatunk során is alkalmazott Becton Dickinson típusú FACScan tehát alkalmasnak bizonyult az adott oldatban lévő, 500 nm feletti részecskék észlelésére az szuszpenzió heterogenitásától függetlenül. Az ábrázolódott részecskék eredetével kapcsolatban további vizsgálatok szükségesek, azonban az általunk elvégzett elektronmikroszkópos vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a nagyobb részecskék között előfordulnak liposzóma aggregátumok. A liposzómális doxorubicin gyári készítményeiben potenciálisan jelen lévő aggregátumok, tehát a liposzómánál jelentősen nagyobb részecskék létezését igazoló korábban végzett vizsgálatra több példa is található az irodalomban. Többek között a Caelyx/Doxil készítmények fejlesztésében kiemelkedő szerepet játszó - Barenholz és munkatársai a Doxil/Caelyx megalkotása alatt összegyűlt tapasztalatokat bemutató cikkükben is beszámolnak a liposzómák alacsony koncentrációja esetén megfigyelt fokozott aggregációs hajlamról, így a méréseink során alkalmazott gyári készítmények további hígítása is szerepet játszhatott az észlelt liposzómáknál nagyobb részecskék megjelenésében. (8)

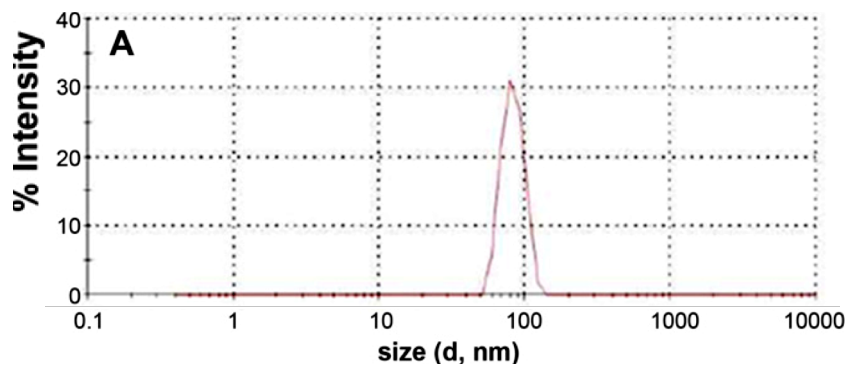
A vizsgálatunk alapján megállapítható, hogy az áramlási citometria potenciálisan fontos, gyors és informatív tájékozódó vizsgálati módszere lehet a lipid-alapú nanopartikulumok oldataiban található szupravezikuláris részecskék és egyéb makromolekulák észlelésére. Továbbá, fontos megjegyezni, hogy az áramlási citometria nem alkalmas a makroformációk méretének, struktúrájának pontos meghatározására, hiszen a fényszórás ezek szempontjából csak tájékoztató jellegű információkat szolgáltat, ezért csak kiegészítő vizsgálatként alkalmazható a pontos méretanalízis, például DLS módszer, alkalmazása mellett.



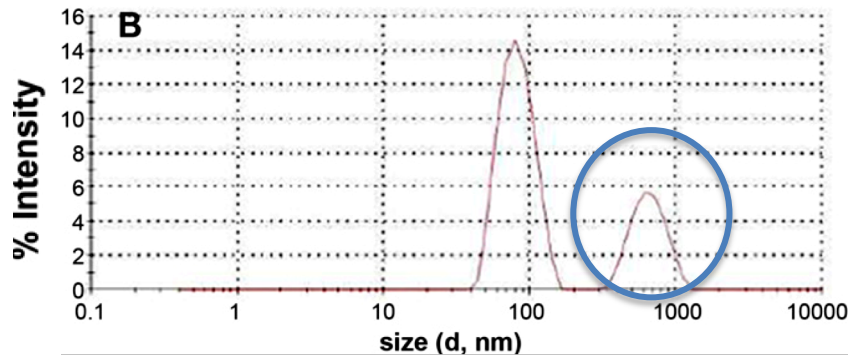
A fenti megállapítást követően arra is választ kerestük, hogy szortírozó funkcióval ellátott áramlási citométerrel a vizsgálat során észlelt nagyobb részecskék kapuzásával és szortírozásával nyerhetőek-e olyan frakciók, amelyekben a nagyobb részecskék relatív nagyobb aránya miatt azok már kimutathatóak a DLS módszerrel. Ennek megfelelően a DLS vizsgálattal korábban homogénnek észlelt mintákat az áramlási citométerrel észlelt nagyobb részecskéknek megfelelően kapuztuk, valamint szortíroztuk és ezt követően ismételtén megmértük DLS módszerrel. A vizsgálati eredmények azt mutatták, hogy a korábbi méreteloszlási görbe megváltozott, a korábbi egy, liposzómák várt átlagos méretének megfelelő méretcsúcs mellett megjelent egy újabb, szélesebb méretcsúcs a nagyobb mérettartományban, ami igazolta a nagyobb méretű részecskék jelenlétét a szuszpenzióban.

Ezek alapján megállapítható, hogy a DLS módszer önmagában nem alkalmas egy döntően homogén, nagyszámú, hasonló méretű és formájú részecskéket tartalmazó oldatban szignifikánsan kisebb számú és eltérő méretű részecskék kimutatására, azonban szortírozó funkcióval ellátott áramlási citometriával kombinálva ez lehetségessé válhat a heterogén szuszpenziók vizsgálata is, ami a 21. ábrán is látható. A két módszer kombinálásával nagyobb eséllyel észlelhetőek olyan szerkezeti makroformációk vagy akár szennyeződések a különböző liposzómális és egyéb lipid alapú nanomedicinális készítményekben, amelyek nagyobb felszínükkel potenciálisan hozzájárulhatnak azok immunogenitásához, valamint a CARPA kialakulásához.

#### DLS mérés szortírozás előtt és után:



Nagyobb részecskék szortírozása áramlási citométerrel



**21. ábra:** A képen a DLS mérések eredménye látható az 500 nm méret feletti részecskék áramlási citometriás szortírozása előtt (A) és után (B). Az ábra A részén látható hígított Caelyx oldatban csak egy részecskepopuláció látható, amely megfelel a liposzómák várt mérettartományának, azonban a nagyobb részecskék frakcionálását követően megjelenik egy nagyobb méretű részecskepopuláció a liposzómák korábbi csúcsa mellett (B).

A preklinikai vizsgálatok során a fentiek miatt előnyös lehet az áramlási citometriával történő szortírozást követő DLS vizsgálatok elvégzése is. Ez egy gyors, natív mintákon elvégezhető munkafolyamat lehet akár a gyógyszerfejlesztés korai szakaszában, ami segítheti a különböző formulációk fejlesztését. A szortírozás fontosságára hívták fel a figyelmet a Caelyx mintákról készített elektronmikroszkópos felvételek is, amelyeken a szortírozás előtt döntően különálló liposzómák voltak láthatóak, azt követően nagyobb számban detektáltunk szupravezikuláris struktúrákat. Ettől függetlenül az elektronmikroszkópia szemikvantitatív, relatíve jelentősen lassabb vizsgálati módszer szemben az áramlási citometria gyors, emiatt többször, nagyobb mintaszámmal elvégezhető vizsgálatával.

## **2. Klinikai vizsgálat és állatmodell az Abelcet által okozott infúziós reakciók vizsgálatára**

A fent részletezett, alapkutatást érintető vizsgálatok elvégzése után, a gyermekgyógyászati szakképzésem megkezdése lehetőséget biztosított a liposzómáktól eltérő, de szintén lipid alapú, lipid-komplex nanomedicinális készítmények klinikai vizsgálatára, ezzel az alapkutatás és a klinikum összekapcsolására. A lipid-komplex alapú

nanohordozók is jelentős mértékben aktiválhatják a komplementrendszer, ezzel mellékhatásokat, potenciálisan CARPA reakciót okozva. Az ebbe a csoportba tartozó, a Semmelweis Egyetem, II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján is alkalmazott Abelcet a súlyos, invazív gombafertőzések kezelésére használt gyógyszer, amely amphotericin B-t tartalmaz és az azonos hatóanyagot tartalmazó liposzómális formulációkhoz (AmBisome és Amphotec) hasonlóan a szabad gyógyszerhez képest jelentősen csökkent toxicitása miatt került bevezetésre a klinikai gyakorlatba. Az előnyök mellett, a szabad hatóanyaghoz hasonlóan, az Abelcet alkalmazása során is gyakoriak az infúziós reakciók, amelyek közül az Abelcet infúzió kezdetét követően 1-2 órán belül láz és a hidegrázás a felnőtt betegek akár 18%-ában jelentkezhet a gyógyszerleírásnak megfelelően alkalmazott 2 órás és 5 mg/kg dózisban beadott infúziós kezelés esetén. Az esetek akár 3-7 %-ában jelentkezhet kiütés, nehézlégzés, hörgőgörcs, hipo-/hipertenzió, aritmia, mellkasi fájdalom, trombocitopénia, vagy leukopenia, amelyek az első néhány dózis beadása során gyakoriak és általában csökkennek a következő adagok beadása közben.

(27) Az általunk vizsgált, a II. sz. Gyermekklinikán kezelt gyermekkonkológiai betegek eseteinek retrospektív és prospektív analizálása a mellékhatások ismertetésén keresztül arra világított rá, hogy infúziós reakciók az Abelcet infúzió beadását követően gyermekek esetén is észlelhetők. A klinikai vizsgálatba bevont 22 gyermek közül 6 betegnél figyeltünk meg mérsékelt fokú és egy esetben súlyos fokú túlérzékenységi reakciót. Összességében a kezeléseik során a gyermekek harmadában jelentkezett infúziós reakció, ami a felnőttekben megfigyelt és publikált arányt meghaladta. Az Abelcet beadását megelőzően az általános klinikai gyakorlatnak megfelelően, a kezelőorvos vagy ügyeletes orvos egyéni megítélése szerint alkalmazott nem-szteroid gyulladásgátló, szteroid vagy antihisztamin adása, az infúzió beadása során észlelt infúziós reakciókat érdemben nem befolyásolta, így a kezeléssel gátolt patomechanizmusok és a mellékhatások között érdemi összefüggés nem volt megállapítható. A vizsgálat során bevont betegek életkora, amelyek tartománya 9 hónap és 17 év között volt, szintén nem mutatott szignifikáns összefüggést az Abelcethez köthetően kialakult tünetek előfordulásával vagy súlyosságával kapcsolatban. A vizsgálatba bevont 9 hónapos gyermek esetén ugyanúgy észleltünk infúziós reakciót, mint a 17 éves gyermek esetében, ami statisztikai következtetésre nem ad lehetőséget, de felhívhatja a figyelmet arra, hogy gyakorlatilag minden életkorban potenciálisan előfordulhat hasonló jelenség. A megfigyelt infúziós

reakció az esetek döntő többségében az első kezelésnél jelentkezett, a további adagok beadása közben csak egy betegnél volt észlelhető. A különböző tünetek formájában jelentkező mellékhatások közé tartozott a betegek közel felénél észlelt, hirtelen jelentkező láz, valamint a betegek felénél jelentkező hidegrázás. A betegek kisebb százalékában urticária, hipotenzió, ödéma vagy nyugtalanság jelentkezett, ami szintén infúziós reakcióként értékelhető.

Az infúziós sebesség potenciálisan jelentős szerepére hívhatja fel a figyelmet a klinikai vizsgálat során észlelt megfigyelések. A vizsgálat során 10-ből 6 betegnél észleltünk infúziós reakciókat abban a csoportban, amelyikben 2-4 óra volt az infúziós idő, de csak 14-ből 1 betegnél volt hasonló reakció 5-6 órás infúziós idő esetén. Ez, a tünetek jellege és spontán elmúlása, a premedikáció látszólagos hatástalansága, valamint az Abelcet korábban publikált *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokban leírt komplement aktiváló hatása, felvetették a tünetek hátterében a CARPA mechanizmus áll. Az elvégzett *in vitro* kísérleteink, amelyeket egészséges humán szérumon végeztünk, a korábbi irodalmi adatoknak megfelelően megerősítették, hogy az Abelcet, képes lehet a komplement rendszert aktiválni, amit az Abelcettel történő inkubációt követően a terminális komplex szérumszintjének megemelkedett értékei igazolnak. A vizsgálatunk prospektív szakaszában az Abelcet beadását megelőzően, valamint a kezelés során vérvétel is történt az észlelt tünetek rögzítése mellett. Ebben a szakaszban azonban infúziós reakciót nem észleltünk és a vizsgálati eredményeink alapján a szérumban csak minimális mértékű komplement aktiváció (sC5b-9 koncentráció emelkedés) volt látható, amely feltételezhetően nem érte el a CARPA tünetek kialakulásához elegendő mértéket, így infúziós reakciót sem észleltünk. Az irodalmi adatok és a tájékoztató, humán szérumon *in vitro* végzett méréseink, valamint a prospektív klinikai vizsgálatban mellékhatások kialakulása nélkül is észlelt sC5b-9 koncentráció emelkedés felvetették az infúziós reakciók hátterében a CARPA esetleges szerepét. Tekintettel arra, hogy a retrospektív vizsgálatokban szereplő, jelentős infúziós reakciókat mutató esetekben a komplement szintek vizsgálatára utólag már nem volt lehetőség, ez csak indirekt módon utalhat a mellékhatások hátterében álló CARPA mechanizmusra. Az viszont egyértelműen látszik a fent részletezett klinikai vizsgálatunkból, hogy a CARPA esetén a szakirodalomban prevenció célból is javasolt lassabb infúziós sebesség negatívan korrelál a kialakult mellékhatások arányával. Az Abelcet leírásában ajánlott 2 órás beadási időhöz képest a 4

óra, vagy annál rövidebb infúziós idő esetén a gyermekonkológiai betegek 60 %-ban jelentkezett infúziós reakció. Tekintettel ezekre az adatokra, etikai okokból nem merülhetett fel gyors infúziós sebességgel tervezett vizsgálatra a gyermekonkológiai betegek körében, így szükségessé vált egy állatmodell kidolgozása az Abelcethez köthető, különböző infúziós idők alkalmazása során jelentkező infúziós reakciók vizsgálatára, valamint a komplement rendszernek a patomechanizmusban betöltött szerepének tisztázása céljából.

## **2.1. Állatkísérletes vizsgálat**

A patkányokon elvégzett vizsgálatokban szignifikánsan nagyobb következményes vérnyomáscsökkenés volt megfigyelhető gyors (1 perc), mint lassú (20 perc) infúziós sebesség után. Ezt a jelenség megfelel az Abelcet beadásával egereken végzett korábbi vizsgálatoknak, valamint a fent részletezett, Abelcettel kezelt gyermekonkológiai betegek bevonásával végzett humán vizsgálatban is előfordult az Abelcet beadását követően. (31) Ez a hipotenzív hatás kiemelten fontos lehet egy septicus beteg esetében, hiszen a kezelés indikációi közé tartozó gombaszepszis (26) esetében a septicus sokk részjelenségeként előforduló, a prognózist és mortalitást is negatívan befolyásoló alacsony vérnyomás mértékének fokozása potenciálisan jelentősen ronthatja az Abelcet infúzióval kezelt betegek állapotát. (69) A vizsgálatunkban patkányok esetében ez az átmeneti vérnyomáscsökkenés 5 percen belül elérte a mélypontot, amely jelzi a jelenség gyors megjelenését, rapid lefolyását. Azonban az eredmények arra is felhívták a figyelmet, hogy ez az infúziós reakció csak átmeneti volt a vizsgált állatokban, hiszen a kezelés után 20 percen belül a vérnyomásuk normalizálódott. A folyamat megértése szempontjából fontos eredményként értékelhető a patkánykísérleteink során, gyorsabb infúziós sebesség esetén észlelt szignifikánsan nagyobb mértékű komplement (C3a) koncentráció emelkedés, ami rávilágíthat a komplement rendszer mellékhatásokban betöltött szerepére, amely potenciálisan súlyos pszeudoallergiás CARPA reakció formájában is megnyilvánulhat. A hipotenzió mellett kiemelkedő jelentőségű lehet a patkányok esetében az Abelcet gyorsabb beadását követően megfigyelt thrombocytopaenia. A gyermekonkológiai betegek egy részében az alapbetegség, többek között akut leukémia esetében, megfigyelhető, valamint a

csontvelőt deprimáló kezelés következményeként potenciálisan jelentkező thrombocytopaeniát az infúziós reakció tovább súlyosbíthatja, ami átmenetileg akár nagyobb vérzékenységhez, vérzéshez is vezethet. (70, 71) A gyorsabb Abelcet infúzió esetén észlelt tromboxán B2koncentráció emelkedés is megfigyelhető volt. Az Abelcet különböző sebességű beadását követően a fehérvérsejtszámban észlelt változások tekintetében a gyorsabb beadás következményes leukocytosist, a lassabb infúzió leukopeniát okozott, amelynek jelentősége kérdéses, azonban az Abelcet infúziót követően végzett vérkép vizsgálatok értelmezését potenciálisan befolyásolhatja.

Az általunk elvégzett patkánykísérletekben az Abelcet amphotericin B hatóanyagtartalmának megfelelő mennyiségű szabad gyógyszer lassú beadása is letális eredménnyel járt a vizsgált állatokban, ami megerősíti a korábbi ismereteinket, miszerint az amphotericin B foszfolipidekkel készített formulációja jelentősen csökkenti a gyógyszer toxicitást a szabad formában beadott hatóanyaghoz képest. Emiatt az Abelcet hatóanyagtartalmához képest 100-szor kevesebb szabad amphotericin B beadásával analizáltuk az Abelcet esetében is vizsgált paramétereket és mellékhatásokat. A lipid-mentes szabad amphotericin B beadása a patkánykísérleteinkben már kis dózisban is következményes vérnyomáscsökkenéshez vezetett, azonban ez nem járt együtt komplement aktivációval, ami arra hívhatja fel a figyelmet, hogy a lipid komplex formulációval ellentétben a komplement aktiváció a szabad gyógyszer esetében kisebb szerepet játszik, vagy nincs jelentősége a mellékhatások kialakulásában.

A tény, hogy a lipid-mentes amphotericin B alacsony dózisban is hemodinamikai és a fehérvérsejtszám változásokat okozhat, hasonló a klinikai megfigyelésekhez, miszerint a Fungizone (szabad amphotericin B-t tartalmazó infúziós készítmény) is okozhat lázzal és hidegrázással járó infúziós reakciókat. Utóbbi megfigyelés képezi az alapját annak a javaslatnak is, hogy érdemes egy teszt dózist beadni a teljes terápiás dózis beadását megelőzően, a túlérzékenységi reakció rizikójának felmérése céljából.

Bár a lipid-mentes amphotericin B az elvégzett kísérletek és a korábbi klinikai vizsgálatok alapján is magasabb toxicitást mutat az Abelcethez képest, utóbbi kapcsán is hasonló jelentőséggel bír az infúziós reakciók vizsgálata, különösen tekintettel a lipid alapú nanohordozók által okozott gyakran megfigyelhető CARPA reakcióra, ill. mechanizmusra. Az általunk elvégzett állatkísérletekben a vizsgált patkányokban

megfigyelhetőek voltak hasonlóságok is a két gyógyszerforma között, ilyen volt a vérnyomást és fehérvérsejtszámot csökkentő hatás, valamint különbségek is láthatóak voltak: az Abelcet adását követően észlelt trombocitopénia és C3a koncentráció emelkedés nem volt megfigyelhető szabad amphotericin B adását követően, ami komplementrendszerrel független mechanizmusra utal. Ezek mellett kvantitatív különbségeket is észleltünk: a lipid-mentes amphotericin B után észlelt reakció később jelentkezett az Abelcethez kapcsolódóhoz képest. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a komplement aktiváció felgyorsítja és (dózistól függően) felerősítheti az amphotericin B által okozott mellékhatásokat, valamint, hogy a két útvonalon létrejövő reakciók elkülöníthetők lehetnek a változások spektruma, időbeli lefolyása és intenzitása alapján.

Az elvégzett patkánykísérletek alapján megállapítható, hogy a vizsgált állatokban észlelt infúziós reakciók előfordulása és intenzitása negatív korrelációt mutatott az infúziós sebességgel, amely megfelelt a klinikai vizsgálat során észlelteknél. Az általunk végzett klinikai vizsgálat és az állatmodell kísérletek felvetik annak lehetőségét, hogy az Abelcet gyógyszerleírásában foglalt 2 órás javasolt beadási időhöz képest növelt infúziós idő alkalmazásával csökkenthetők lehetnek az Abelcethez kapcsolt infúziós reakciók prevalenciája vagy akár intenzitása. Továbbá kijelenthető, hogy egyes infúziós reakciók patomechanizmusában felmerül a komplement aktiváció és a CARPA szerepe a részletesen vizsgált, egyéb lipid-alapú nanogyógyszerekhez, például a Doxilhoz hasonlóan. A CARPA háttérfolyamatainak megértése mellett a prevenciójának, valamint kialakulása esetén annak gátlására is kiemelt figyelem irányul, hiszen ennek a fontos problémának a megoldására eddig tudományos konszenzus még nem született.

Az elvégzett vizsgálatok ilyen feltételezéseket lehetővé tesznek, azonban a további konklúzió levonásához szükséges lehet az emberi szervezet biológiáját, szerveinek struktúráját és működését a patkányoknál vitathatatlanul jobban modellező sertésben elvégezni a kísérletek, valamint a prospektív klinikai vizsgálatok folytatása az egyes ellátó helyeken alkalmazott protokollok befolyásolása nélkül, de minden esetben a komplement koncentrációk vizsgálatával.

Ezek a fontos további lépések több fényt deríthetnek az infúziós sebességen kívüli egyéb tényezők szerepére is, valamint tovább mélyíthetik a komplement rendszer infúziós

reakciók kialakulásában betöltött szerepéről megszerzett eddigi ismereteinket az Abelcettel, valamint egyéb lipid-alapú nanogyógyszerekkel kapcsolatban.

### **3. A CARPA gátlásának potenciális lehetőségei elvégzett vizsgálatok és irodalmi áttekintés alapján, exoszómák potenciális szerepe**

A CARPA háttérfolyamatainak megértése mellett a prevenciójának, valamint kialakulása esetén annak gátlására is kiemelt figyelem irányul, hiszen ennek a fontos problémának a megoldására eddig tudományos konszenzus még nem született. A megelőzésben a bevezetésben tárgyalt, korábbi vizsgálatok során észlelt molekulák (5. ábra) használata nem rutinszerű jelenleg a klinikai gyakorlatba sem gyermekgyógyászati esetekben, sem a felnőtt betegek ellátásában. Emiatt különösen fontos kérdés a jelenleg klinikai gyakorlatban lévő, lipid alapú nanohordozó gyógyszerek fejlesztésében az immunogenitás csökkentése.

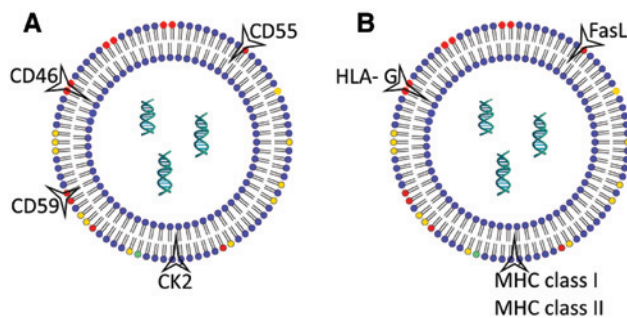
A Doxil estén Barenholz és munkatársai által levont következtetések arra utalnak, hogy a klinikai gyakorlatban hosszú ideje használt liposzómális doxorubicin az előnyei mellett hátrányokkal is rendelkezik, amelyek a háttérben olyan fiziko-kémiai jellemzők is állhatnak, amelyeknek megváltoztatása mérlegelendő a továbbiakban a mellékhatások csökkentése érdekében. Ezek közé tartozik a liposzómák töltése során használt szulfát ionok alkalmazása, amely a liposzómán belüli hatóanyag kristályosodásához vezetve befolyásolhatja a nanohordozó részecske formáját, aggregátumok kialakulásához vezethet. Ebben a vizsgálatban(8) bemutatták a DOXG tulajdonságait, aminek a kialakításában egy másik ionos komponenst alkalmaztak, hogy a korábban említett strukturális instabilitást, és ezzel potenciálisan a mellékhatások előfordulásának rizikóját csökkentsék.

A lipid-alapú nanohordók fontos alkotóelemei közé tartozik a polietilén-glikol, amely lehetővé teszi a kóros immunválasz csökkentését, „lopakodó” liposzómák kialakítását, azonban ez a komponens is szerepet játszhat a komplementrendszer aktiválásában, így más stratégia és molekula alkalmazása is felmerül a jelenleg alkalmazottakhoz képest, a kevesebb mellékhatást kiváltó újabb nanohordozók



fejlesztésében. (11, 72)

A szervezetben természetesen is jelen lévő nanohordozók, az exoszómák az immunrendszer egészséges működése mellett nem okoznak a szervezetben kóros immunreakciókat, így a fejlesztés során az exoszómák szerkezeti és felszíni molekula mintázata olyan tervezési alap lehet, ami segítheti a klinikumban alkalmazott gyógyszerek beadását követően jelentkező infúziós reakció rizikójának csökkentését. (56, 73-75)



**22. ábra:** Exoszómák szerkezetében található komplement modulátor (A) és más immuntoleranciát elősegítő molekulák (B). (63)

Az exoszómák szerkezetében számos olyan molekula fordulhat elő, amik szerepet játszhatnak az immunogenitás csökkentésében (22. ábra). Ezek beépítése lipid-alapú nanohordozók szerkezetébe potenciálisan hozzájárulhat a komplement aktiváció, valamint egyéb immunfolyamatokhoz köthető mellékhatások rizikójának csökkentéséhez, ami eddig számos lezárt vizsgálat tárgyát képezte. (76)

A lipid alapú nanogyógyszerek strukturális változtatásainak, valamint az exoszómák modellezésének gyakorlati megvalósítása még elméleti lehetőségnek tekinthető a klinikai alkalmazás szempontjából, azonban a vizsgálataink is megerősítik, hogy a kezelési stratégiák megváltoztatása, elsősorban az infúziós sebesség jelenleg javasolt idejének jelentős mértékű csökkentése potenciálisan közelebbi és realisabb megoldást jelenthet a kóros infúziós reakciók csökkentése szempontjából. Természetesen ez további vizsgálatok elvégzését teszi szükségessé, azonban erre a fontos lehetőségre hívhatják fel a figyelmet az általunk elvégzett vizsgálatok.

## VI. Következtetések

A vizsgálatainkat megelőzően megfogalmazott célkitűzéseinkkel kapcsolatban megállapítható, hogy több kérdésben is olyan következtetésekről számolhatunk be, amelyek a további *in vitro*-, valamint *in vivo* klinikai vizsgálatok szükségességének egyértelmű igénye mellett is potenciálisan hozzájárulhatnak az érintett kérdéskör tisztázásához, a kapcsolódó folyamatok megértéséhez a vizsgált lipid-alapú nanohordozók esetében.

1. Bizonyos esetekben a DLS vizsgálat önmagában nem, csak egyéb módszerekkel kombinálva alkalmas liposzómák oldatában jelen lévő, egyéb vizsgálati módszerrel kimutatható, kisszámú, de a liposzómáknál jelentősen nagyobb méretű (> 500 nm) részecskék kimutatására.
2. A klinikai vizsgálatunk alapján megállapítható, hogy a vizsgálatba bevont 22 beteg közül 7 gyermeknél megfigyelt infúziós reakció nagyobb incidenciát (32%) mutat a felnőttek bevonásával készült korábbi tanulmányok eredményeihez (3-18%) képest. Továbbá megállapítható, hogy a vizsgált betegek körében a relatíve lassabb infúziós sebességek alkalmazása esetén kisebb incidenciával fordultak elő infúziós reakciók.
3. A patkányokon végzett kísérletek során megállapítottuk, hogy gyorsabb infúziós sebesség fokozott mértékű mellékhatások kialakulásához vezet. Ezek közé tartozik a következményes, tranzienst vérnyomásesés, amelynek mértéke és időtartama is nagyobb a gyorsabb infúziós sebesség alkalmazása esetén.

## VII. Összefoglalás

A lipid-alapú nanogyógyszerek közé tartoznak a liposzómák, és a lipid-komplex gyógyszerek. Ezek vizsgálatára számos lehetőség áll rendelkezésre, ilyen például az áromlási citometria, valamint a DLS. A nanogyógyszerek alkalmazása a komplement rendszer aktiválásán keresztül túlérzékenység kialakulásához vezethet, amelynek vizsgálata emberekben és állatmodellekben is lehetséges. Vizsgálataink során a liposzomális doxorubicinben (Caelyx) potenciálisan megtalálható szerkezeti anomáliákat *in vitro* tanulmányoztuk az általunk alkalmazott vizsgálati módszerek korlátjainak értékelésével párhuzamosan. Vizsgálataink során a lipid komplex Abelcet által okozott mellékhatásokat vizsgáltuk gyermekonkológiai betegek körében, valamint állatkísérletekben. Irodalmi áttekintés során az exoszómák potenciális szerepét vizsgáltuk a lipid-alapú nanohordozók fejlesztésében. A vizsgálatink alapján megállapítottuk, hogy a DLS módszer bizonyos esetekben csak más vizsgálati módszerrel kiegészítve alkalmas a Caelyx oldatában észlelt anomáliák kimutatására. A klinikai vizsgálataink rávilágítottak arra, hogy gyermekgyógyászati onkológiai betegek esetében is előfordulnak Abelcet beadását követően infúziós reakciók, amelyek meghaladták a felnőttek esetében leírt gyakoriságot a vizsgált 22 betegben. A gyógyszerbeadás körülményeit vizsgálva megállapítottuk, hogy inverz összefüggés volt megfigyelhető a beadási idő és a kóros infúziós reakciók kialakulásának esélye között. Annak érdekében, hogy a komplement aktiválódás Abelcet beadását követően jelentkező mellékhatások kialakulásában betöltött szerepét, valamint az infúziós idő jelentőségét tovább vizsgáljuk, állatkísérletek során különböző infúziós sebességek alkalmazása esetén vizsgáltuk a jelentkező infúziós reakciókat, valamint a komplement aktiváció mértékét. Gyorsabb infúziós sebesség esetén a gyógyszer beadásával kapcsolatban észlelt következményes hipotenzio nagyobb mértékű volt és hosszabb ideig tartott, valamint a komplement aktiváció mértéke is jelentősebbnek bizonyult ezekben az esetekben. *In vitro* kísérleteink megerősítik, hogy kiemelt jelentőségű a jelenleg is klinikai gyakorlatban alkalmazott liposzomális gyógyszerek esetében alkalmazott vizsgálati módszerek korlátjainak figyelembevétele, azok kiegészítése egyéb vizsgálati módszerekkel. *In vivo* vizsgálataink felhívják a figyelmet a komplement aktiváció szerepére az Abelcet alkalmazása kapcsán megfigyelhető mellékhatások kialakulásában, valamint az infúziós sebesség jelentőségére.

## VIII. Summary

Lipid based nanodrugs include liposomes and lipid complex formulations. Several methods are available for characterizing these formulations, such as flow cytometry and dynamic light scattering (DLS). Administration of nanodrugs can lead to hypersensitivity reactions through the activation of the complement system, which can be investigated in humans or animal models. In our *in vitro* experiments we examined anomalies potentially found in liposomal doxorubicin (Caelyx), and also evaluated the limits of the test methods used. During our *in vivo* studies, we investigated infusion reactions caused by the lipid-complex Abelcet in pediatric oncology patients and in an animal model. In a literature overview, we also reviewed the potential usefulness of immunogenic characteristics of exosomes in the development of lipid based nanodrugs. During our studies we concluded that in some cases the DLS method is adequate for finding anomalies in suspensions of Caelyx only if it is complemented by another type of test method. Our clinical studies showed that Abelcet therapy can result in infusion reactions in pediatric oncology patients, which showed higher incidence in the included 22 patients compared to previous studies including adult patients. During the evaluation of the circumstances of the infusions, we concluded an inverse relation between infusion time and the incidence of infusion reactions. In order to further examine the role of complement activation in the development of side effects caused by Abelcet therapy and the significance of infusion speed we created an animal model, in which we observed infusion reactions and measured complement activation after various infusion speeds. Faster infusion speeds resulted in more pronounced and prolonged hypotension connected the administration of Abelcet and also a significant complement activation. Our *in vitro* experiments confirm the paramount importance of taking into account the limits of testing methods in the case of nanodrugs, like DLS in the examination of liposomes, and their supplementation with other methods. The clinical study and the conducted animal experiments may call our attention to the importance of further studies exploring pathomechanisms that play roles in infusion reactions and side effects even in the case of drugs already approved for clinical use, such as Abelcet, to improve the administration strategies including parameters such as infusion rate.

**IX. Irodalomjegyzék**

1. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, Khorasani S, Mozafari M. (2018) Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics*, 10: 57.
2. Agnieszka Z. Wilczewska KN, Karolina H. Markiewicz, Halina Car. (2012) Nanoparticles as drug delivery systems. *Nanoparticles as drug delivery systems*, Volume 64: Pages 1020-1103.
3. Gregoriadis G. *The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine* Vol. 2951976.
4. Bangham AD, Standish MM, Miller N. (1965) Cation permeability of phospholipid model membranes: Effect of narcotics. *Nature*, 208: 1295–1297.
5. Colley CM, Ryman BE. (1976) The liposome: From membrane model to therapeutic agent. *Trends in Biochemical Sciences*, 1: 203-205.
6. Zhang YFQ. English: Doxil (pegylated liposomal doxorubicin) morphology by cryo-TEM. 2013.
7. Rivankar S. (2014) An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10: 853-858.
8. Barenholz Y, Peer D, Barenholz YC. (2012) Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *Journal of Controlled Release*, 160: 117–134.
9. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, Blumenthal R. (2009) Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 26: 523-580.
10. Ding C, Li Z. (2017) A review of drug release mechanisms from nanocarrier systems. *Materials Science & Engineering. C, Materials for Biological Applications*, 76: 1440-1453.
11. Gabizon A, Szebeni J. (2020) Complement Activation: A Potential Threat on the Safety of Poly(ethylene glycol)-Coated Nanomedicines. *ACS nano*, 14: 7682-7688.
12. Oerlemans C, Bult W, Bos M, Storm G, Nijsen JF, Hennink WE. (2010) Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res*, 27: 2569-2589.
13. Che J, Okeke CI, Hu Z-B, Xu J. (2015) DSPE-PEG: a distinctive component in drug delivery system. *Current Pharmaceutical Design*, 21: 1598-1605.

14. Wang R, Xiao R, Zeng Z, Xu L, Wang J. (2012) Application of poly(ethylene glycol)-distearoylphosphatidylethanolamine (PEG-DSPE) block copolymers and their derivatives as nanomaterials in drug delivery. *Int J Nanomedicine*, 7: 4185-4198.
15. Sahib MN, Darwis Y, Peh KK, Abdulameer SA, Tan YT. (2011) Rehydrated sterically stabilized phospholipid nanomicelles of budesonide for nebulization: physicochemical characterization and in vitro, in vivo evaluations. *Int J Nanomedicine*, 6: 2351-2366.
16. Hadinoto K, Sundaresan A, Cheow WS. (2013) Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics: Official Journal of Arbeitsgemeinschaft Fur Pharmazeutische Verfahrenstechnik e.V.*, 85: 427-443.
17. Adedoyin A, Bernardo JF, Swenson CE, Bolsack LE, Horwith G, DeWit S, Kelly E, Klasterksy J, Sculier JP, DeValeriola D, Anaissie E, Lopez-Berestein G, Llanos-Cuentas A, Boyle A, Branch RA. (1997) Pharmacokinetic profile of ABELCET (amphotericin B lipid complex injection): combined experience from phase I and phase II studies. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 2201-2208.
18. Liu M, Chen M, Yang Z. (2017) Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *Drug Delivery*, 24: 1-9.
19. Larabi M, Pages N, Pons F, Appel M, Gulik A, Schlatter J, Bouvet S, Barratt G. (2004) Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother*, 53: 81-88.
20. Mishra VK, Palgunachari MN, McPherson DT, Anantharamaiah GM. (2013) Lipid complex of apolipoprotein A-I mimetic peptide 4F is a novel platform for paraoxonase-1 binding and enhancing its activity and stability. *Biochem Biophys Res Commun*, 430: 975-980.
21. Steimbach LM, Tonin FS, Virtuoso S, Borba HHL, Sanches ACC, Wiens A, Fernandez-Llimós F, Pontarolo R. (2017) Efficacy and safety of amphotericin B lipid-based formulations-A systematic review and meta-analysis. *Mycoses*, 60: 146-154.
22. Adedoyin A, Swenson CE, Bolcsak LE, Hellmann A, Radowska D, Horwith G, Janoff AS, Branch RA. (2000) A pharmacokinetic study of amphotericin B lipid complex injection (Abelcet) in patients with definite or probable systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 44: 2900-2902.

23. Sidhu R, Lash DB, Heidari A, Natarajan P, Johnson RH. (2018) Evaluation of Amphotericin B Lipid Formulations for Treatment of Severe Coccidioidomycosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 62.
24. Hachem RY, Boktour MR, Hanna HA, Husni RN, Torres HA, Afif C, Kontoyiannis DP, Raad II. (2008) Amphotericin B lipid complex versus liposomal amphotericin B monotherapy for invasive aspergillosis in patients with hematologic malignancy. *Cancer*, 112: 1282-1287.
25. Johansen HK, Gotzsche PC. (2014) Amphotericin B lipid soluble formulations versus amphotericin B in cancer patients with neutropenia. *Cochrane Database Syst Rev*, doi:10.1002/14651858.CD000969.pub2: CD000969.
26. Wiley JM, Seibel NL, Walsh TJ. (2005) Efficacy and safety of amphotericin B lipid complex in 548 children and adolescents with invasive fungal infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24: 167-174.
27. ABELCET®. Leadiant Biosciences, Inc., Gaithersburg, MD 20878.
28. Clemons KV, Schwartz JA, Stevens DA. (2011) Therapeutic and toxicologic studies in a murine model of invasive pulmonary aspergillosis. *Med Mycol*, 49: 834-847.
29. Imai J, Singh G, Fernandez B, Clemons KV, Stevens DA. (2005) Efficacy of Abelcet and caspofungin, alone or in combination, against CNS aspergillosis in a murine model. *J Antimicrob Chemother*, 56: 166-171.
30. Zhang Z, Lipman JM, Diener RM, Thomas P. (2006) Comparative immunotoxicity evaluation of amphotericin B and ABELCET, an amphotericin B lipid complex (ABLC). *International Journal of Toxicology*, 25: 487-492.
31. Orfi E, Meszaros T, Hennies M, Fulop T, Dezsi L, Nardocci A, Rosivall L, Hamar P, Neun BW, Dobrovolskaia MA, Szebeni J, Szenasi G. (2019) Acute physiological changes caused by complement activators and amphotericin B-containing liposomes in mice. *Int J Nanomedicine*, 14: 1563-1573.
32. Bhamra R, Sa'ad A, Bolcsak LE, Janoff AS, Swenson CE. (1997) Behavior of amphotericin B lipid complex in plasma in vitro and in the circulation of rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 41: 886-892.
33. McGuire TR, Trickler WJ, Smith L, Hoie EB, Miller DW. (2005) Release of TNF-alpha and IL-1beta from porcine brain endothelium corresponds to the pyrogenic potential of

three marketed formulations of amphotericin. *Inflammation Research: Official Journal of the European Histamine Research Society ... [et Al.]*, 54: 375-379.

34. Brown-mozgás. In: Wikipédia, 2020. <https://hu.wikipedia.org/wiki/Brown-mozg%C3%A1s>
35. Malvern. Malvern Zetasizer ZS DLS user manual.
36. Hussain B. English: Diagram showing the basic structure of a flow cytometer. 2017.
37. Kowalczyk B, Lagzi I, Grzybowski BA. (2011) Nanoseparations: Strategies for size and/or shape-selective purification of nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 16: 135-148.
38. Fan Y, Marioli M, Zhang K. (2021) Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 192: 113642.
39. Lainé A-L, Gravier J, Henry M, Sancey L, Béjaud J, Pancani E, Wiber M, Texier I, Coll J-LJ-L, Benoit J-PJ-P, Passirani C, Laine A-L, Gravier J, Henry M, Sancey L, Béjaud J, Pancani E, Wiber M, Texier I, Coll J-LJ-L, Benoit J-PJ-P, Passirani C. (2014) Conventional versus stealth lipid nanoparticles: Formulation and in vivo fate prediction through FRET monitoring. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 188: 1–8.
40. Holers VM. (2014) Complement and its receptors: new insights into human disease. *Annu Rev Immunol*, 32: 433-459.
41. Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Ross OA, Todd EW, Wardlaw AC. (1954) The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science (New York, N.Y.)*, 120: 279-285.
42. Thurman JM, Holers VM. (2006) The central role of the alternative complement pathway in human disease. *J Immunol*, 176: 1305-1310.
43. Matsushita M, Thiel S, Jensenius JC, Terai I, Fujita T. (2000) Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease. *J Immunol*, 165: 2637-2642.
44. Szebeni J, Muggia F, Gabizon A, Barenholz Y. Activation of complement by therapeutic liposomes and other lipid excipient-based therapeutic products: Prediction and prevention Vol. 63. *Adv Drug Deliv Rev* 2011.
45. Kulkarni PA, Afshar-Kharghan V. (2008) Anticomplement therapy. *Biologics*, 2: 671-685.



46. 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: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 12: 1023-1031.
47. Gabizon AA, Muggia FM. Initial Clinical Evaluation of Pegylated-Liposomal Doxorubicin in Solid Tumors. In: Woodle MC, Storm G (szerk.), *Long Circulating Liposomes: Old Drugs, New Therapeutics*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1998: 165-174.
48. Soloman R, Gabizon AA. (2008) Clinical pharmacology of liposomal anthracyclines: focus on pegylated liposomal Doxorubicin. *Clinical Lymphoma & Myeloma*, 8: 21-32.
49. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Bodo M, Morse DS, Basta M, Stahl GL, Bünger R, Alving CR. (2000) Liposome-induced pulmonary hypertension: properties and mechanism of a complement-mediated pseudoallergic reaction. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 279: H1319-1328.
50. Calogiuri G, Ventura MT, Mason L, Valacca A, Buquicchio R, Cassano N, Vena GA. (2008) Hypersensitivity reactions to last generation chimeric, humanized [correction of umanized] and human recombinant monoclonal antibodies for therapeutic use. *Current Pharmaceutical Design*, 14: 2883-2891.
51. Fulop T, Kozma GT, Vashegyi I, Meszaros T, Rosivall L, Urbanics R, Storm G, Metselaar JM, Szebeni J. (2019) Liposome-induced hypersensitivity reactions: Risk reduction by design of safe infusion protocols in pigs. *J Control Release*, 309: 333-338.
52. Inglut CT, Sorrin AJ, Kuruppu T, Vig S, Cicalo J, Ahmad H, Huang HC. (2020) Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomaterials (Basel)*, 10.
53. Zhou H, Fan Z, Lemons PK, Cheng H. (2016) A Facile Approach to Functionalize Cell Membrane-Coated Nanoparticles. *Theranostics*, 6: 1012–1022.
54. Chen E, Chen B-M, Su Y-C, Chang Y-C, Cheng T-L, Barenholz Y, Roffler SR. (2020) Premature Drug Release from Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomal Doxorubicin via Formation of the Membrane Attack Complex. *ACS nano*, 14: 7808-7822.
55. Hamad AR, Arcara K, Uddin S, Donner T. (2012) The potential of Fas ligand (apoptosis-inducing molecule) as an unconventional therapeutic target in type 1 diabetes. *Front Immunol*, 3: 196.

56. Whiteside TL. (2013) Immune modulation of T-cell and NK (natural killer) cell activities by TEXs (tumour-derived exosomes). *Biochem Soc Trans*, 41: 245-251.
57. Green DR, Ferguson TA. (2001) The role of Fas ligand in immune privilege. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2: 917-924.
58. Motz GT, Santoro SP, Wang LP, Garrabrant T, Lastra RR, Hagemann IS, Lal P, Feldman MD, Benencia F, Coukos G. (2014) Tumor endothelium FasL establishes a selective immune barrier promoting tolerance in tumors. *Nat Med*, 20: 607-615.
59. Zhang HG, Su X, Liu D, Liu W, Yang P, Wang Z, Edwards CK, Bluethmann H, Mountz JD, Zhou T. (1999) Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 162: 1423-1430.
60. Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E. (2001) "Tolerosomes" are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol*, 31: 2892-2900.
61. Mahmoodzadeh Hosseini H, Ali Imani Fooladi A, Soleimanirad J, Reza Nourani M, Mahdavi M. (2014) Exosome/staphylococcal enterotoxin B, an anti tumor compound against pancreatic cancer. *Journal of B.U.ON.: official journal of the Balkan Union of Oncology*, 19: 440-448.
62. Li K, Chang S, Wang Z, Zhao X, Chen D. (2015) A novel micro-emulsion and micelle assembling method to prepare DEC205 monoclonal antibody coupled cationic nanoliposomes for simulating exosomes to target dendritic cells. *Int J Pharm*, 491: 105-112.
63. Milosevits G SJ, Krol S (2015) Exosomes: potential model for complement-stealth delivery systems. *European Journal of Nanomedicine*, 7: 207-218.
64. Milosevits G, Rozsnyay Z, Kozma GT, Milosevits J, Tömöry G, Robotka H, Rosivall L, Szebeni J. Flow cytometric analysis of supraventricular structures in doxorubicin-containing pegylated liposomes. Vol. 165. *Chem Phys Lipids*, 2012: 482–487.
65. Durand RE. (1981) Calibration of flow cytometry detector systems. *Cytometry*, 2: 192-193.
66. Matviyukiv S, Buscema M, Mészáros T, Gerganova G, Pfohl T, Zumbühl A, Szebeni J, Müller B. Liposomes: bio-inspired nano-containers for physically triggered targeted drug delivery. (Knez M, Lakhtakia A, Martín-Palma RJ szerk.) Vol. 10162. *International Society for Optics and Photonics*, 2017: 101620A.

67. 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. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 14: 1430-1437.
68. Milosevits G, Mészáros T, Órfi E, Bakos T, Garami M, Kovács G, Dézsi L, Hamar P, Gyórfy B, Szabó A, Szénási G, Szebeni J. (2021) Complement-mediated hypersensitivity reactions to an amphotericin B-containing lipid complex (Abelcet) in pediatric patients and anesthetized rats: Benefits of slow infusion. *Nanomedicine*, 34: 102366.
69. Chang T-H, Wu E-T, Lu C-Y, Huang S-C, Yang T-I, Wang C-C, Chen J-M, Lee P-I, Huang L-M, Chang L-Y. (2018) Pathogens and outcomes in pediatric septic shock patients supported by extracorporeal membrane oxygenation. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection = Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi*, 51: 385-391.
70. Zhang A-L, Chen X-J, Zou Y, Yang W-Y, Guo Y, Wang S-C, Zhang L, Liu X-M, Ruan M, Liu T-F, Qi B-Q, Zhu X-F. (2019) [Clinical features and prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia and different platelet levels]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi = Chinese Journal of Contemporary Pediatrics*, 21: 766-771.
71. Mandal P, Samaddar S, Chandra J, Parakh N, Goel M. (2020) Adverse effects with intravenous methotrexate in children with acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a retrospective study. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, 36: 498-504.
72. Moghimi SM, Hamad I, Bünger R, Andresen TL, Jørgensen K, Hunter AC, Baranji L, Rosivall L, Szebeni J. Activation of the human complement system by cholesterol-rich and PEGylated liposomes - Modulation of cholesterol-rich liposome-mediated complement activation by elevated serum LDL and HDL levels. Vol. 16. *J Liposome Res*, 2006: 167–174.
73. Alvarez-Erviti L, Seow Y, Yin H, Betts C, Lakhani S, Wood MJA. (2011) Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29: 341–345.
74. Batrakova EV, Kim MS. (2015) Using exosomes, naturally-equipped nanocarriers, for drug delivery. *J Control Release*, 219: 396-405.

75. Bell BM, Kirk ID, Hiltbrunner S, Gabrielsson S, Bultema JJ. Designer exosomes as next-generation cancer immunotherapy Vol. 122016.
76. Ren J, He W, Zheng L, Duan H. (2016) From structures to functions: insights into exosomes as promising drug delivery vehicles. *Biomaterials Science*, 4: 910–921.

## **X. Saját publikációk jegyzéke**

### **1. A disszertációhoz kapcsolódó közlemények**

1. Milosevits G, Rozsnyay Z, Kozma GT, Milosevits J, Tomory G, Robotka H, Rosivall L, Szebeni J. (2012) Flow cytometric analysis of supraventricular structures in doxorubicin-containing pegylated liposomes. *Chem Phys Lipids*, 165(4):482-487
2. Milosevits Gergely, Mészáros Tamás, Órfi Erik, Bakos Tamás, Garami Miklós, Kovács Gábor, Dézsi László, Hamar Péter, Gyórfy Balázs, Szabó András, Szénási Gábor, Szebeni János. (2021) Complement-mediated hypersensitivity reactions to an amphotericin B-containing lipid complex (Abelcet) in pediatric patients and anesthetized rats: Benefits of slow infusion. *Nanomedicine* 34:102366
3. Milosevits G, Szebeni J, Krol S. (2015) Exosomes: Potential model for complement-stealth delivery systems. *European J Nanomedicine* 7:207-218

### **2. A disszertációtól független közlemények**

1. Ablonczy Mária, Milosevits Gergely. (2014) Tanácsok az orrspray-k használatához. *Medicus Anonymus* 22:10-12
2. Ablonczy Mária, Milosevits Gergely, Dalos Judit. (2013) Heveny felsőlégúti betegségek tünettana és terápiája. *Medicus Anonymus* 21:7-10

## **XI. Köszönetnyilvánítás**

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Juhász Gábornak, aki gimnáziumi, majd egyetemi hallgatóként végzett tudományos diákköri munkám során megismertetett a tudományos kutatás alapjaival.

Köszönöm témavezetőmnek, Prof. Dr. Szebeni Jánosnak, hogy az egyetem során tudományos diákköri tevékenységem, majd a doktori iskola keretein belül végzett tudományos munkám során mindvégig támogatott, és lehetőséget teremtett a dolgozatomban szereplő kísérletek elvégzésére, külföldi klinikai nanomedicina konferenciákon (CLINAM, Basel) való rendszeres részvételre, és a tudományos munkám bemutatására, valamint a Prof. Dr. Patrik Hunziker által vezetett baseli munkacsoporttal végzett közös munkára.

Köszönöm az II. Sz. Gyermekgyógyászati Klinika korábbi és jelenlegi intézetvető egyetemi tanárainak, Prof. Dr. Szabó Andrásnak és Prof. Dr. Kovács Gábornak tudományos munkám támogatását a klinikai munkám mellett végzett kutatásaim, valamint a doktori értekezésemben bemutatott klinikai vizsgálat megvalósításában nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Szénási Gábornak, hogy az állatmodell kísérletek elvégzésére lehetőséget biztosított és azokban elengedhetetlen segítséget nyújtott.

Köszönöm Prof. Dr. Rosivall Lászlónak, hogy lehetővé tette a Kóréletteni, későbbi nevén Transzlációs Medicina Intézetben végzett TDK munkámat, valamint ugyanitt a doktori programban való részvételemet.

Köszönöm a Nanomedicina Kutató és Oktató Központ minden munkatársának, hogy a doktori értekezésem szempontjából fontos kísérletek elvégzésében segítettek és hozzájárultak az elvégzett tudományos munka részfolyamatihoz.

Köszönöm a szüleimnek, hogy a tudományos munkám elvégzésében mindvégig támogattak, valamint édesapámnak, hogy fontos észrevételekkel és revízióval segítette a doktori értekezésem megírását.

Köszönöm a családom és barátaim támogatását, amit a dolgozatom megírása során nyújtottak.