

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

I. Bevezetés

A klinikai gyakorlatban alkalmazott lipid-alapú nanohordozók fontos szerepet játszanak a nanomedicinában. Ezek közé tartoznak a liposzómák, lipid-polimer nanorészecskék és a lipid-komplex gyógyszerek. A nanogyógyszerek vizsgálatára számos lehetőség áll rendelkezésre, ilyen például az FDA 2018-ban kiadott, lipid alapú nanogyógyszerek fejlesztéséről szóló ajánlásban is szereplő áramlási citometria, valamint a dinamikus lézerefényszórás (DLS). A nanogyógyszerek megalkotásának célja többek között a hatóanyag tekintetében kedvezőbb farmakokinetika elérése, valamint a mellékhatások csökkentése, azonban maga a nanohordozó részecske is hozzájárulhat mellékhatások kialakulásához. A nanogyógyszerek egy részét az immunrendszer idegenként ismerheti fel, ami a komplement rendszer aktiválásán keresztül egy túlérzékenységi szindróma kialakulásához, az ún. komplement aktivációval összefüggő pszeudoallergiához (CARPA) 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 jelentkezhet. A kialakulásához több tényező is hozzájárulhat, ilyen például a liposzómák aggregációja vagy formájuk megváltozása, melyben szerepet játszhat a szabad hatóanyag jelenléte az oldatban. A CARPA vizsgálata *in vitro* és *in vivo*, emberekben és állatmodellekben is lehetséges.

II. Célkitűzések

1. Annak tisztázása, hogy áramlási citometria, dinamikus fényszórás (DLS) valamint elektronmikroszkópos módszerekkel észlelhetőek 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, valamint a komplement aktiváció mérése a kezelés során levett vérmintákban.
3. Az Abelcet által okozott mellékhatások és az infúziós sebesség kapcsolatának, valamint a komplement aktiváció szerepének további tisztázása egy állatmodell formájában.

III. Eszközök és módszerek

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

A vizsgálatunkban Caelyx került felhasználásra, amit 4 C-on tároltuk felhasználásig.

A Caelyxben található részecskék méretének, méreteloszlásának vizsgálata Zetasizer Nano-S eszközzel történt. A méréseket 70 másodpercig folytattuk, melyet 15 alkalommal futtattunk. Ezeket a mérési ciklusokat 3 alkalommal megismételtük, az eredményeket méreteloszlási görbék formájában prezentáltuk.

A FACS mérésekhez az eredeti gyári, 4 C-on tárolt, percekkel a mérés előtt felbontott Caelyx ampullákat 0,2 μm pórusú (Millipore) filteren átszűrte, steril foszfáttal pufferolt sóoldattal (PBS) hígítottuk 250-, 500-, 1000- és 2000-szeres hígításban külön eldobható küvettákban. Ezt követően az oldatokat további 10-szeres hígítás után, 1 percig vortexeltük közvetlenül a FACS méréseket megelőzően, amelyeket a Becton Dickinson

FACScan készüléken végeztünk el. A kalibrációt a méretanalízishez a Fluoresbrite® Carboxylated polystyrene Size Range kit 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, SSC) szobahőmérsékleten került rögzítésre. A Caelyxben található nagyobb méretű részecskék szűrése ún. „sorting” funkcióval ellátott, Becton Dickinson FACSAria áramlási citométeren történt a fényszórási ábrán megjelenő, 500 nm feletti részecskék kapuzásával.

A liposzómákat uranil-acetáttal, negatív festés formájában kezeltük standard technológiát használva. A mintákról 200kV-on, FEI Tecnai G2 elektronmikroszkóppal készítettünk felvételeket.

2. Gyermekegyógyászati onko-hematológiai betegek Abelcet kezelése során észlelt mellékhatások vizsgálata

Ez a tanulmány a Tudományos és Kutatásaitikai Bizottság által adott engedély (15576/2018/EKU) kiadását

követően, a Semmelweis Egyetem II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikáján történt. 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 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 irányelveivel és a Magyarország törvényeivel. A kísérleti protokollt jóváhagyta a Pest Megyei Kormányhivatal és a budapesti Semmelweis Egyetem Állat Etikai Bizottsága (PEI-001/3948-6/2014). A kísérleti állatok a Toxicoop Kft. cégtől vásárolt hím „Wistar” patkányok voltak, amelyeket pentobarbitállal elaltattunk, szükség esetén kis dózisban ismételtük. Az állatokat 10 mg/kg Abelcet dózissal kezeltük 1, 5, valamint 20 perces intravénás infúzió formájában. Két állat amphotericin B infúzióban 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 mérése a bal femorális artériában, BPR-02 nyomásmérő és HG-01D erősítő használatával mértük. Az adatok rögzítése PowerLab rendszerrel, LabChart analizáló programmal történt.

4. A komplement aktiváció és vérkép eltérések vizsgálata

ELISA módszerrel történt a vérplazma C3a koncentrációjának, valamint a tromboxán B2 szintjének mérése. A humán vérplazmában az SC5b-9 szintekmeghatározása C5b-9 ELISA szett segítségével történt, mely a TecoMedical cégtől került beszerzésre. Vérkép vizsgálatok során az Abacus Vet5 hematology analyzer készüléket alkalmaztuk..

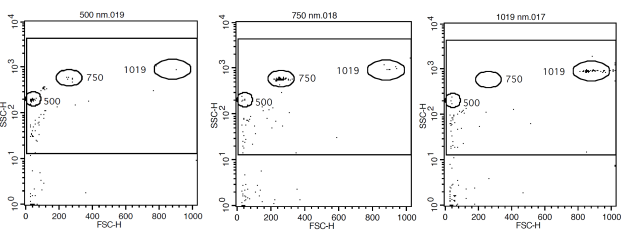
5. Statisztikai analízis

A bemutatott adatok az átlagokat \pm standard hibákat jelképezik. A statisztikai analízist T próba vagy ANOVA módszerrel végeztük a megismételt mérések esetében, melyet Sidak- vagy Dunett féle többszörös összehasonlítás követett.

IV. Eredmények

Caelyx vizsgálata áramlási citométerrel, dinamikus fényszórással és elektronmikroszkóppal

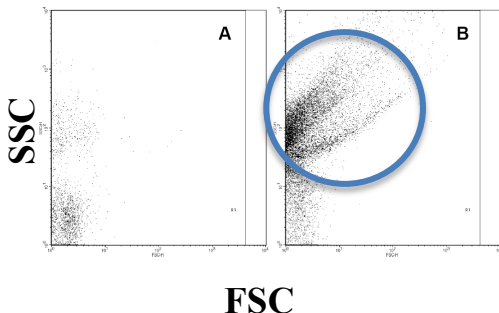
Kalibráció során az 500, 750 és 1019 nm átmérőjű latex gyöngyök részecskék emelkedő FSC vs. SSC értékeknek megfelelően ábrázolódtak a szórásdiagramon (1. ábra), de az oldatban jelen lévő 100 és 200 nm átmérőjű gyöngyök nem voltak láthatóak, ami az áramlási citométer detektálási mérethatárával magyarázható (500nm).



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

A 2. ábra a Caelyx FSC vs. SSC szórásdiagramját ábrázolja, amelyen látható részecskék a kalibráció alapján az 500 nm-nél nagyobb tartományba estek. A minták

szórásdiagramjai a vizualizált csóvákban hasonlóságot mutattak.

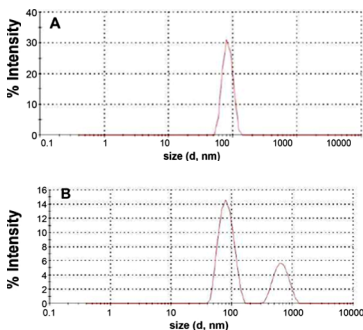


2. ábra: SSC vs. FSC szórásdiagram kontrollként használt PBS (A) és Caelyx (B) FACS mérése esetén.

A BD FACScan készülékkel korábban mért Caelyx mintában található, 500nm feletti részecskéket azok kapuzásával, BD FACSAria készülékkel szortíroztuk.

A gyári Caelyx mintákat elektronmikroszkópos ábrázolás és méretanalízis segítségével összehasonlítottuk a szortírozott mintákkal. Az 3. 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

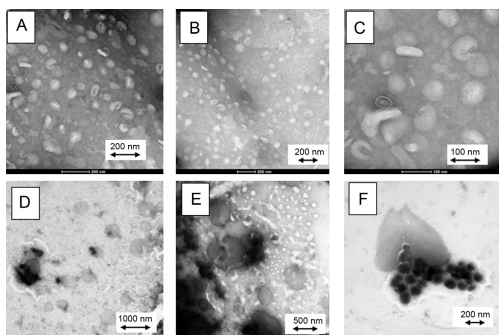
készítményében várt értékeknek (Caelyx/Doxil). Az 3. ábra B részén a szortírozott, nagyobb részecskéket tartalmazó minták láthatóak, amelyek a szortírozás nélküli teljes mintában is látható csúcson kívül egy széles mérettartományú (400-1010nm) 600 nanométernél csúcsosodó görbe volt látható, amely megfeleltethető a FACS-on kapuzott és szortírozott részecskék méretének, ezzel alátámasztva a Caelyxben található, stabil szupravezikuláris struktúrák létezését.



3. ábra: Caelyx DLS vizsgálata (A: szortírozás előtti minta, B: szortírozás utáni minta)

A szortírozás nélküli Caelyx mintáról készített elektronmikroszkópos felvételeken (4. ábra A-C) döntően különálló liposzómák láthatóak. A 4. ábra D-F része a

szortírozott Caelyx frakciót ábrázolja, amelyeken nagyobb számban 300-1000 nm-es szupravezikuláris struktúrák láthatóak.



4. ábra: Caelyx liposzómák elektronmikroszkópos felvételei az 500 nm feletti részecskék szortírozása előtt (A-C) és azt követően (D-F).

2. Klinikai vizsgálat: mellékhatások vizsgálata

A klinikai vizsgálatba bevont 22 gyermek közül 6 betegnél figyeltünk meg mérsékelt fokú és egy esetben súlyos fokú túlérzékenységi reakciót. Összességében a kezelések 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. A vizsgálat során bevont betegek életkora, amelyek tartománya 9 hónap és 17 év között volt, szintén nem mutatott szignifikáns összefüggést az Abelsecthez köthetően kialakult tünetek előfordulásával vagy súlyosságával kapcsolatban. A megfigyelt infúziós reakció az esetek döntő többségében az első kezeléskor 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.

A vizsgálat során 10-ből 6 esetről észleltünk infúziós reakciókat abban a csoportban, amelyikben 2-4

óra volt az infúziós idő, de csak 14-ből 1 esetben volt hasonló reakció 5-6 órás infúziós idő esetén.

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 ami nagyobb gyakoriságot (32%) mutat a felnőttek bevonásával készült korábbi tanulmányok eredményeihez (3-18%) képest. 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.

A komplement rendszer szerepe az Abelcet által okozott infúziós reakciós kialakulásában

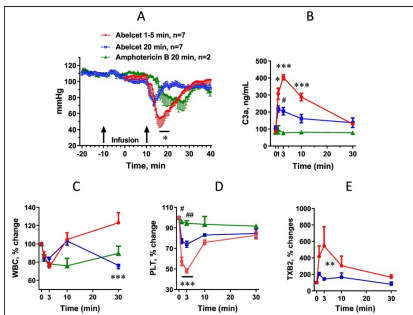
In vitro vizsgálatok során 3 egészséges humán szérumban inkubáltunk Abelcetet, és megmértük az sC5b-9 koncentráció emelkedését, mint a komplement aktiválódás végpontját. A 0, 10, 30 és 60 perc után a mért

mintákban következetes és szignifikáns sC5b-9 emelkedést észleltünk mind a 3 szérumban, ami bizonyítékkal szolgál arra, hogy az Abelcet képes aktiválni a komplement rendszert emberben is.

A klinikai vizsgálatunk prospektív szakaszában 6 betegől levett vérmintákon végzett komplement méréseink során az sC5b-9 koncentrációt vizsgáltuk. A betegektől 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 (5. A ábra), azonban a 60 percnél levett mintákban az sC5b-9 koncentráció kismértékű, de szignifikáns emelkedését észleltük. Az utóbbi eredmény megfelel a kismértékű (10-60%-os), korlátozott komplement aktiválódásnak. Ezekben az esetekben mellékhatás kialakulása sem volt megfigyelhető.

3. Az Abelcettel okozott CARPA patkány modellje

A patkányokon elvégzett vizsgálatok során szignifikáns összefüggés volt megállapítható az infúziós sebesség és a következményes hemodinamikai és laboreltérések között (5. ábra). Gyorsabb infúziós sebesség esetén a gyógyszer beadásával kapcsolatban észlelt következményes hipotenzió nagyobb mértékű volt és hosszabb ideig tartott, valamint a komplement aktiváció mértéke is jelentősebbnek bizonyult ezekben az esetekben. A vizsgálataink felhívják a figyelmet a komplement aktiváció szerepére az Abelcet alkalmazása kapcsán megfigyelhető mellékhatások kialakulásában, valamint az infúziós sebesség jelentőségére.



5.ábra: Infúziós sebesség hatása az Abelcet beadását követően észlelt mellékhatásokra patkányokban.

VI. Következtetések

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 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.

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

1. 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