

Válasz Juhászné Dr. Csapó Edit bírálataira

Szeretném megköszönni Juhászné Dr. Csapó Editnek a dolgozatom bírálatába fektetett idejét és energiáját. A munkahelyi vita megjegyzései és szakmai kérdései nagymértékben hozzájárultak dolgozatom jobbá tételéhez. Köszönöm a bírálatában feltett kérdéseket és észrevételeket, melyekre az alábbi válaszokat adom:

1. A dolgozat 12. oldalán említi, hogy a „sorafenib magas lipofilitása miatt, mely rossz biológiai hozzáférhetőséget eredményez, nagy dózisok szükségesek a kezelések során”. Ennek kiküszöbölésére a „nanohordozóba csomagolt hatóanyag célzott bejuttatását és szabályozott felszabadulását kiemelt helyen kezelik”. A formuláció kialakítása révén sikerült-e oldhatóság növekedést elérni? Ha igen, ez hányszoros? Milyen kapcsolatban áll egymással a kezelés során alkalmazott jelenlegi (nagy) dózis és a Jelölt által formulázott mennyiség (drug loading)?

A dolgozathoz oldhatóság vizsgálatokat nem végeztem, a szakirodalmi tapasztalatokat emeltem ki az említett részben. Jelenleg a sorafenib terápia során alkalmazott napi dózis 800 mg, orálisan bevitt tabletták formájában. A hivatkozott irodalmak megállapítják, hogy a hagyományos formulációk nem előnyösek, mivel szűk terápiás index, magas toxicitás és magas betegek közötti farmakokinetikai változatosság jellemzi azokat. A hatóanyag nagy része rögtön eliminálódik, így magas dózis szükséges a terápiás szint elérése érdekében, súlyos mellékhatásokat okozva. A különböző beviteli módok mindegyikét úgy dozírozzák, hogy az bizonyos ideig bizonyos plazma hatóanyag-koncentrációt biztosítson. Sok esetben a beadási módok változtatása szükségessé teszi az alkalmazott dózisok változtatását. Például egy orálisan alkalmazott gyógyszernek át kell jutnia a gasztrointesztinális rendszeren, kitéve a bélből történő felszívódásnak és a máj első szintű metabolizmusának. Ezzel szemben az intravénás gyógyszerekről azt feltételezik, hogy azonnal bejutnak a szisztémás keringésbe, mivel nincsenek kitéve a felszívódásnak vagy az első szintű metabolizmusnak a megfelelő dózis meghatározásához.

Az általam előállított formuláció intravénás alkalmazásra készült, amely már rögtön a véráramba kerülhet, ugyanakkor a feltételezett célzással lokális terápia is valósítható meg, csökkentve a szervezetben okozott további károkat. Ezen hordozórendszerek lényege, hogy méretük csökkentésével, lényegesen kisebb dózis alkalmazásával hasonló vagy akár még jobb terápiás hatást képesek elérni.

2. Az értekezés 44. oldalán a Jelölt írja, hogy annak eldöntésére, hogy a hatóanyag a részecskékben kapszulázott formában található vagy éppen a polimer részecskék felületén, elektronmikroszkópos felvétel elkészítése szükséges. Be is mutat egy felvételt a 18. ábrán, de a fenti kérdésre nem válaszol. Mi állapítható meg tehát a felvételtől? Hogyan lehetne egy fényszórásméréssel (amit szintén említi a Jelölt) igazolni, hogy a hatóanyag formulázva van-e?

Egyfelől az elektronmikroszkópos vizsgálatokat EDX felvétellel (a hatóanyag F tartalma miatt) kiegészítve lehetett volna megvizsgálni, hogy a hatóanyag dúsul-e a felületen. Dinamikus fényszórás mérés során, amikor szabad hatóanyag van a szuszpenzióban, akkor az eloszlásgörbén az 1 μm feletti mérettartományban is megjelenének szemcsék, ugyanis a sorafenib 1 μm -nél nagyobb kristályok formájában csapódik ki. Az említett minta esetében a dinamikus fényszórásmérés szűk méreteloszlású nanorészecskéket jelzett, amely tükrözi az elektronmikroszkópos felvételen látható homogén részecskeméretet. Ellenben volt példa, amikor a kapszulázatlan hatóanyag akkora kristályokat alkotott, ami már fénymikroszkóppal is vizsgálható volt. Túl nagy kristályok keletkezése esetén azok ülepedése miatt dinamikus fényszórás módszerével nem kimutatható részecskék keletkezhetnek, ezért fontos a fényszórás mérés kiegészítése elektronmikroszkópos felvételekkel, ahol ezek a kristályok láthatóvá válnak.

3. A dolgozat 44. oldalán olvasható az alábbi kijelentés a SOR felszabadulás tanulmányozása kapcsán: „Ebben a kezdeti lemosódás mértéke 62% volt, melyet egy tartós hatóanyag-felszabadulás követett (20. ábra). Kérem a védésen adjon magyarázatot a fentebbi mondatra, hogy mit ért „le mosódáson” (ez a szó többször is előfordul a dolgozatban), ha a hatóanyag formulázva van és mit ért „tartós hatóanyag-felszabaduláson”, ha a 20. ábra alapján 1-70 órás időintervallumban közel konstans a hatóanyagtartalom (a hiba mértékét figyelembe véve).

A kezdeti lemosódás kifejezés valójában az „initial burst” effektust, azaz a kezdeti gyors hatóanyagfelszabadulás folyamatát takarja. Kezdeti kioldódás során a részecske felületén adszorbeált hatóanyag szabadul fel vagy „mosódik le”. A nagy kezdeti hatóanyagfelszabadulás nem mindig jelent rossz rendszert, mivel egyes kezelések során fontos egy kezdeti nagyobb koncentráció bejuttatása a megfelelő terápiás szint és a hatóanyag-akkumuláció elérése érdekében, amely hatást a nyújtott felszabadulás tartana fent. A hiba mértéke valóban nem kicsi, és a koncentráció hullámzó tendenciája sem segít annak láttatásában, hogy a 2-72 órában az átlagos hatóanyagfelszabadulás a kiindulási koncentráció hozzávetőleg 10 %-a.

4. Mi volt a mérési elgondolás a 38. oldalon a 3.5.4. Hatóanyagleadás fejezetben említett SOR-tartalom meghatározására vonatkozóan? A centrifugálás/mosás után feltételezte, hogy a meghatározott SOR-tartalom a polimer mátrixban még kötött formában van? Feltételezte, hogy ami nincs a részecskékben az mind felszabadult? Ezt nem ellenőrizte?

A 3.5.4-es fejezetben a sorafenib tartalmat valóban a nanorészecskékben mértem, meghatározva az azokban maradt hatóanyag mennyiségét, majd a kezdeti koncentrációhoz viszonyítva kiszámoltam a közegben levő, felszabadult hatóanyagtartalmat. A mosás/centrifugálás szakasza az emulgeálószer, valamint a vérplazma zavaró komponenseinek eltávolítására szolgált, amely fontos lépés volt a fotometriás mérés kivitelezése érdekében. A vérplazma fehérjéi mellett a felszabadult sorafenib UV-vis spektrofotometriával nem kimutatható az elnyelési sávok átfedése miatt, ezért választottuk az indirekt meghatározást. Ezekben a tesztekben nem mértem anyagmérleget, de korábbi vizsgálatok során igen, és azt tapasztaltuk, hogy a hatóanyag bomlása gyakorlatilag elhanyagolható volt. Így feltételeztem, hogy ami nincs a részecskékben, az a kioldási közegben található.

5. A rákos sejtek mikrokozonyezetének modellezésére a pH = 5,5 biztosítása ugyan megfelelő, de a kb. 100 mM Cl⁻ ion koncentráció beállítása is kellett volna. Ha a sejten belüli állapotot modellezték, ott a sókoncentráció valóban lényegesen kisebb. Melyik környezet modellezése történt meg itt?

A tumor mikrokozonyezet egy összetett többsejtű környezet, amelyben a daganat található és elsősorban immunsejtekből, sztróma sejtekből, extracelluláris mátrixból, szekretált kis molekulákból, valamint vér- és nyirokérhálózatokból áll, és rendkívül heterogén és dinamikus. Bár a fejlődő és folyamatosan változó mikrokozonyezet összetétele különböző típusú daganatok között változhat, a közös jellemzőik közé tartozik a tumor extracelluláris környezetére jellemző enyhén savas jelleg (pH 6,5–pH 6,9), míg a sejteken belüli állapot inkább a semleges felé tolódik el. Ez fordított a normál sejtek esetében, melyek fiziológiás pH-ja (7,2-7,5). Ez a savasság a rákos sejtek megnövekedett glikolíziséből adódik, amely a glükózt tejsavvá alakítja, hogy kielégítsék energiaigényüket. Így a pH-t tartottam egy fontos és viszonylag közös paraméternek, melyet alapul vettem a hatóanyagleadási tesztekben. A vizsgálat során a rákos sejtek extracelluláris mikrokozonyezetét modelleztem, azaz igaza van a Bírálónak, hogy a megfelelő ionkoncentráció beállítása is szükséges lett volna. Ennek hiányát még egy ténnyel tudom magyarázni: sajnos az általam olvasott szakirodalom egyikében sem találkoztam ezzel,

többségében csak pH függést vizsgáltak, pedig jobban átgondolva, fontos paraméter lett volna, hogy a tumor mikrokörnyezetét relevánsabban imitáljam. Feltételeztem, hogy mivel az *in vitro* kísérletek önmagukban nem hordoznak elégséges információt a tényleges hatóanyagfelszabadulásról, hanem egymáshoz viszonyítva mutatják, hogy az egyik rendszer feltehetőleg *in vivo* is gyorsabban vagy lassabban fogja a hatóanyagot felszabadítani, mint a másik, ezért gondolom, hogy nem tartották fontosnak a Cl⁻-ion koncentráció beállítását.

6. A hatóanyagleadási vizsgálatokhoz kapcsolódva megjegyezném, hogy a dolgozat egészében bemutatott méréstípus inkább a formulációk stabilitásvizsgálatának felel meg. Természetesen ilyen módon is vizsgálható, hogy adott kísérleti körülmények mellett (pl. pH= 5,5 vagy 7,4) a formulációból a hatóanyag felszabadulása időben hogyan történik. Ha a 4. kérdésre adott válasz az, hogy a sejten kívüli mikrokörnyezet modellezése volt a cél, akkor kérdésként merül fel, hogy a felszabadult hatóanyag képes-e a sejtbe bejutni? Erősen hiányoltam membrán penetrációs méréseket (pl. Hanson-cella), ahol a tiszta hatóanyag és a formulázott membrán penetrációs folyamata is tanulmányozható, ezáltal összehasonlítható.

Membrán penetrációs tesztek nem végeztünk. Egy sejtfevételi vizsgálat készült áramlási citométerrel a tiszta sorafenib tartalmú hatóanyag-rendszerről. A 24 órás inkubálás után az élő sejtek 24%-a vette fel a vak részecskéket és 6% a hatóanyagot tartalmazó részecskéket. Feltehetőleg a sejtek nagyrésze már elhalt a 24 órás teszt során és a mérés csak az élő sejteket vette alapul. Bár a vak nanorészecskék felvétele is lényegesen alacsonyabb volt, mint amit a citotoxicitási eredmények sugallnak, feltehetőleg a vizsgálat során felszabaduló hatóanyag is jelentős szerepet játszik a rákos sejtek eltávolításában. Mivel a többi, általam előállított rendszerről nem sikerült sejtfevételi vizsgálatokat végezni, így viszonyítási alap hiányában nem akartam kitérni erre a dolgozatomban.

A tumoros környezet nagyon heterogén és tumorspecifikus lehet. A szilárd daganatok sajátos mikrokörnyezetet mutatnak, beleértve a savas pH-t, a redukáló környezetet, bizonyos enzimek túlzott expresszióját, a hipoxiát, a reaktív oxigénfajtákat és a megnövekedett adenozin-5'-trifoszfát (ATP) szintet. Ezeket a daganatokat gyengén fejlett erek és az érfalon levő réseket tartalmazó hipervaszakularizáció jellemzi. A hagyományos tumor-célzott gyógyszercélzó rendszerek olyan kihívásokkal néznek szembe, mint a gátolt szisztémás keringés, az alacsony célzási hatékonyság, a rossz tumorpenetráció és az ellenőrizetlen gyógyszerfelszabadulás. A hatóanyag bejutásának lehetősége passzív módon, kihasználva a fokozott permeabilitási és

retenciós hatásokat (EPR), egyre kisebb a szövetekre jellemző rossz kondíciók miatt. Ugyanakkor az EPR hatások megkövetelik, hogy a nanohordozók átmérője 100 nm-nél nagyobb legyen, de a tumor penetrációjához a 30 nm körüli méretek kedveznek, ami azt jelenti, hogy a kívánt EPR hatást kihasználó nanohordozók nem mutathatnak kedvező tumorpenetrációt. A bejutás nagy valószínűséggel sikeresebb aktív módon, azaz különböző sejtspecifikus célzók alkalmazásával, amelyek a rákos sejtekre jellemző túlexpresszált fehérjékhez kötődnek (pl. integrin receptorok és az iRGD tumor penetrációs peptid), megnyitva a sejtekbe jutást a nanorészecskék számára.

7. A Jelölt a célkitűzésekben azt fogalmazta meg, hogy a formulációk kialakítása révén irányított és szabályozott hatóanyag leadás valósítható meg, kiegészítve a hatóanyagok kioldódását. Látva a dolgozatban bemutatott hatóanyagleadási profilokat mennyire gondolja, hogy a kitűzött célok teljesültek?

A kitűzött célok részben teljesültek, mivel az új típusú polimerek működő hatóanyag-hordozó rendszereknek bizonyultak, melyekbe sikeresen mikrokapszuláztam a hatóanyagokat egy optimalizált előállítási módszerrel. A mikrokapszulák hatékony citotoxikus hatást mutattak bizonyos sejtvonalakkal szemben, ellenben a tapasztalt leadási profilok nem tekinthetők ideálisnak. A gyors kezdeti kioldódás kiegészítése végett még egyéb kiegészítő eljárásokat lehetett volna alkalmazni (pl. más bevonó anyagok, keresztkötő ágensek, esetleg célzó molekulák), de mivel minden egyes új rendszerre szükséges lett volna elvégezni minden egyes vizsgálatot, az idő szűke miatt sajnos ezek már nem voltak kivitelezhetőek.

8. A 26. és 31. ábrán az látszik, hogy a kialakított formuláció éppen savasabb környezetben „stabilisabb”, hiszen pH= 7,4 esetén a hatóanyag szinte teljes egésze visszamérhető. Mennyire tartja relevánsnak így a formulációkat? Ez a tapasztalat arra enged következtetni, hogy a hatóanyag formulázva el sem tud jutni a célhelyre, mert azonnal szétesik (Figyelembe véve a Jelölt által javasolt lokális beadást is).

Talán a legnagyobb kihívás, olyan részecskerendszert előállítani a vizsgált alapanyagokból, amelyek valamilyen szinten ellenállnak a véráram hatásainak. Jelen vizsgálatunk fontos információt szolgáltatott a rendszerünk alkalmazhatóságáról és arról, hogy hol szükséges további fejlesztéseket végezni (lásd még az előző kérdésre adott választ).

Észrevételek:

2. Az előbírálathoz már említettem, hogy nem célszerű a nanorészecske kifejezést a 200-400 nm átmérőjű részecskékre használni. A Jelölt ezen javaslatomra reflektálva megjegyezte, hogy a „mikrokapszulázás szakirodalmában ez elfogadott és gyakorta használt kifejezés”, amit természetesen elfogadok. Ennek a válasznak kicsit azért ellentmond a 2. ábra, ahol szintén az 1-100 nm-t jelöli meg a nanorészecskék mérettartományának. Megjegyzem viszont, hogy a dolgozat 1. oldalán említett „nanorészecskékre a < 100 nm alatti mérettartomány” nem kizárólag kolloidkémiai definíció, ahogyan a Jelölt írta, hanem IUPAC és más szervezetek által is elfogadott definíció.

A IUPAC definíció valóban azt mondja, hogy nanorészecske bármely dimenziójában 10^9 - 10^7 m tartományba tartozó részecske. Azonban 3. megjegyzésben az szerepel, hogy mivel alkalmanként más jelenségeket (fényáteresztőképesség, turbiditás, ultraszűrés, stabil diszperzió, stb.) is figyelembe vesznek, a „nano” előtag elfogadott az 500 nm-nél kisebb dimenziókra is. (Vert, Michel, Doi, Yoshiharu, Hellwich, Karl-Heinz, Hess, Michael, Hodge, Philip, Kubisa, Przemyslaw, Rinaudo, Marguerite and Schué, François. "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)" Pure and Applied Chemistry, vol. 84, no. 2, 2012, pp. 377-410. <https://doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>)

A konstruktív és pozitív bírálatot, és a bele fektetett időt és energiát még egyszer köszönöm!

Tisztelettel,

Kántor Izolda



Budapest, 2024. 04. 05.