

Válaszok Prof. Dr. Pongrácz Judit egyetemi tanár opponensi véleményére

Hálásan köszönöm Dr. Pongrácz Judit Professzor Asszonynak, hogy vállalta doktori értekezésem bírálatát. Elismerő szavai megtisztelőek, kritikai észrevételei, tanácsai jelentős segítséget és bátorítást jelentenek munkám folytatásához. Külön köszönöm a megfogalmazásra, ill. a szerkesztésre vonatkozó pozitív megjegyzéseit.

Az értekezéssel kapcsolatos észrevételekre és kérdésekre az alábbiakban szeretnék válaszolni.

1. *„... a szövegben és az ábra aláírásban rendszeresen hivatkozott sejtes morfológia változásai, melyet fluoreszcens mikroszkópiás eljárással vizsgáltak, legtöbbször értékelhetetlenek maradnak az olvasó számára. ...”*

Egyetértek azzal a kritikai megjegyzéssel, miszerint az izogravakridon-klorin (**12a**) és a négy szeszkviterpén (**14a–d**) sejtmorfológiára gyakorolt hatásait illusztráló 41. és 48. ábra minősége elmarad a kívánatostól. Körültekintőbb szerkesztéssel és fotóra optimalizált nyomtatással minden bizonnyal elkerülhető lett volna a jelzett probléma. Munkánk során előfordult, hogy a Hoechst 33258 – propidium-jodid festés után rögzített képek alkalmasak voltak a monitoron történő megjelenítésre és kvantitatív kiértékelésre, ugyanakkor nyomtatásban kevésbé voltak meggyőzőek.

2. 1. kérdés: *„A drog transzporter vizsgálatok az ABCB1 molekulára fókuszáltak. Találtak-e a vizsgált hatóanyagok között olyat, amely esetleg számos drog transzporter egyidejű gátlásában vehetne részt?”*

Kísérleteink során csak ABCB1 (P-glikoprotein) transzporterre gyakorolt hatásokat vizsgáltuk transzfektált limfóma sejtek segítségével. Az ABC proteincsalád mintegy 20 tagja részt vesz multidrog rezisztencia kialakításában és fenntartásában, az esetek döntő részéért három transzportert tartunk felelősnek: ABCB1, ABCC1 és ABCG2. Ezek közül is legnagyobb jelentőséggel – legszélesebb szubsztrát-spektrummal és legnagyobb gyakorisággal – az elsőként felismert ABCB1 protein vesz részt rezisztencia kialakításában. Ezért fordult érdeklődésünk ebbe az irányba, a további két transzporterre nem vizsgáltunk. Tekintettel arra, hogy az egyes transzporterek szubsztrát-spektruma kellően széles és jelentős átfedést mutat, a többszörös transzporter gátlás stratégiája nagyon is kézenfekvő. Ismert ugyanakkor, hogy ezen transzporterek jelentős élettani szerepet játszanak a xenobiotikumokkal szembeni védelemben, így gátlásuk alapvetően változtatja meg az együtt adott hatóanyagok farmakokinetikai viselkedését. Ilyenkor a citosztatikum olyan kompartmentekben is megjelenik, ahol monoterápiában nem ér el jelentős koncentrációt. Ilyenkor a barrierek (pl. vér-agy gát) átlépése miatt új mellékhatások jelennek meg, romlik a tumorelles szer tolerálhatósága. Részben ezért okoztak csalódást az ABC transzporter inhibitorok (pl. valpsodar, tariquidar). (Leonard *et al.*, 2003, Szakács *et al.*, 2006, Kartal-Yandim *et al.*, 2016, Gameiro *et al.*, 2017).

3. 2. kérdés: „Az értekezésben részletezett és akár további gyógyszerfejlesztésben is tovább vizsgálható molekulák közül véleménye szerint milyen módszerrel lehetne daganatsejt-specifikusan a szervezetbe juttatni a hatóanyagokat, az általános toxicitási hatás csökkentése érdekében?”

A tumorellenes szerek fejlesztésének egyik iránya a tumor szelektív elérését célozza, azzal a céllal, hogy csökkenjenek a szisztémás expozícióból adódó mellékhatások, az ún. „off-tumor” és „off-target” hatások. Ennek elérésére számos stratégia ismert, egy részükhöz imponáló eredmények rendelhetők, ám az onkológiai protokollokban még kevésbé jelennek meg. A tumor szelektív elérésének legfőbb módjai a következők:

- A legelőrehaladottabb állapotban lévő tagetálási stratégia új hatóanyagokat hoz létre, melyek állnak egy ismert hatóanyagból és egy szelektív célba juttatást biztosító ellenanyagból. Több ilyen hatóanyagot már törzskönyveztek: brentuximab-vedotin (Adcetris), trasztuzumab-emtanzin (Kadcyla), ibritumomab tiuxetan (Zevalin) (Lambert and Berkenblit, 2018).
- Intenzíven fejlesztik a nanomedicina eredményeit felhasználó hatóanyagrendszereket. Ekkor a toxikus hatóanyag tiszta oldat helyett nanorészecskéhez kötött, ill. abba inkorporált formában kerül a keringésbe. Ez a stratégia a legjelentősebb előrelépést a hatóanyag farmakokinetikai viselkedésében eredményezi, stabilabb lesz a plazmakoncentráció, ill. javul a barriereken történő átjutás. Részben a lassúbb elimináció, részben a tumor sajátos – fenesztráltabb, permeábilisabb – vaszkulaturájának következtében több hatóanyag kumulálódik a tumorban. Összességében javul a hatóanyag tolerálhatósága, ami az indikációk bővüléséhez is vezethet. Ilyen készítmények már elterjedtek a klinikai praxisban. Az Abraxane albuminhoz nanorészecskés formulában kötött paklitaxelt tartalmaz és az oldatos készítményekkel szemben metasztatikus pancreas adenokarcinómában is alkalmazható (Li *et al.*, 2014, Marcazzan *et al.*, 2018).
- A nanohordozó rendszerek második generációja azokat a stratégiákat foglalja magába, melyek aktív módon koncentrálnak a megcélzott tumorban, vagy programozottan ott adják le hatóanyagtartalmukat. Az aktív targetálás legkiforrottabb módja az antigén-ellenanyag, vagy receptor ligand kapcsolat szelektivitását hasznosítja. A nanohordozó rendszer tartalmaz egy olyan monoklonális ellenanyagot, ami a tumor egy jellegzetes sejtfelszíni proteinjét ismeri fel. Gyakran alkalmazott ellenanyagok a növekedési faktorok receptorait ismerik fel (pl. anti-HER2, anti-EGFR, anti-VEGFR) (Wicki *et al.*, 2012). Egy liposzóma tartalmazhat olyan ligandot is, amire a tumor fokozottan expresszál receptort. A fokozott vasszükséglet fedezésére a tumorsejt transzferrin receptort expresszál, így a transzferrint is hordozó liposzóma felhalmozódik a tumorban, majd dezintegrálódva leadja hatóanyagát (Derycke *et al.*, 2004). Ebbe a generációba sorolhatók azok a hordozórendszerek, amik a célszövet által generált stimulusra dezintegrálódnak. Ilyen lehet a tumor alacsonyabb szöveti pH értéke, vagy a tumorban nagymértékben expresszálódó enzim (pl. mátrix metalloproteináz), melyek előidézhetik a liposzóma szétesését (Jhaveri *et al.*, 2014).

- A nanohordozók harmadik generációját összetett multifunkciós rendszerek alkotják. Jellemzőjük, hogy több hatóanyagot is képesek célzottan leadni, így pl. tumorellenes és rezisztenciára ható szert, vagy tumorellenes szert és képkötő eljárásához használt diagnosztikumot (Rizzo *et al.*, 2013).
4. 3. kérdés: *„Gondolta-e arra, hogy háromdimenziós (3D) szövettanában folytassák a további fejlesztésekre érdemesített molekulák további vizsgálatát, ugyanis egyre szélesebb körben kimutatásra került, hogy a daganatok sokkal ellenállóbbak 3D szerkezetben és a 3D szerkezetben még sejtfelszíni molekulák, pl. drog transzporterek expressziós mintázata is más.”*

Az eddig tapasztalt antiproliferatív hatások vizsgálata során nem merült fel a 3D sejtkultúra meghonosítása. Ugyanakkor egyértelmű, hogy az ígéretesebb hatóanyag-jelöltek további vizsgálataira szofisztikáltabb, az élő környezetet jobban modellező módszerekkel is meg kell kísérelnünk. Ennek megfelelően tervezzük egy 3D ko-kultúra módszer meghonosítását Intézetünkben, ami elsősorban a tesztvegyületek antimetasztatikus hatásának jellemzésére alkalmas. Az eljárás során adherens tumorsejtek metilcellulóz tartalmú médiumban, mikrotitráló lemezen néhány nap alatt szferoidot képeznek, ami átvihető egy előzetesen létrehozott konfluens endotél rétegre. A tumor ilyenkor kemorepellens hatást fejt, csökkenti az endotél réteg integritását, ami fényképezés után szoftveresen értékelhető. Ezek mellett a módszer biztosan alkalmas a tumorellenes hatás részletgazdagabb leírására (Nguyen *et al.*, 2017).

5. 4. kérdés: *„Mivel a kemoterápia mellett gyorsan fejlődik az immunmodulátor molekulák fejlesztése, (pl. PD1-PDL1) ezért vizsgálták-e, illetve tervezik-e vizsgálni a vezérmolekulák hatásának vizsgálatát az immunterápiákban szerepet játszó molekulákkal szemben?”*

Egyetértek Bírálóval; az immunterápiák egyre meghatározóbb szerepet játszanak az innovatív és célzott tumorellenes terápiás lehetőségek között. Az elmúlt év minden bizonnyal mérföldkőnek tekinthető a CAR-terápia és a pembrolizumab bevezetése miatt. Munkáink során jellemzően kismolekulák szűrővizsgálatából indultunk ki, az immunrendszer, mint lehetséges támadáspont eddig nem merült fel, így azon hatószerekkel sem hasonlítottuk össze leghatékonyabb molekuláinkat. Tervezzük ugyanakkor az összetettebb kísérleti rendszerek beállítását, a már említett ko-kultúra mellett terveink között szerepel egy *in vivo* tumormodell beállítása, ami alkalmas lehet az immunrendszeren keresztüli hatás megközelítésére is.

Végezetül ismételten szeretném megköszönni Professzor Asszony gondos értékelését, elismerő szavait, ill. kritikai észrevételeit.

Tisztelettel kérem az opponensi bírálatra adott válaszaim elfogadását.

Szeged, 2018. május 22.

Dr. Zupkó István
egyetemi docens

Hivatkozások

- Derycke AS, Kamuhabwa A, Gijssens A, Roskams T, De Vos D, Kasran A, Huwyler J, Missiaen L, de Witte PA: Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer ALPcS4 to rat bladder carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* **96**: 1620-30 (2004)
- Gameiro M, Silva R, Rocha-Pereira C, Carmo H, Carvalho F, Bastos ML, Remiao F: Cellular Models and In Vitro Assays for the Screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP. *Molecules* **22** (2017)
- Jhaveri A, Deshpande P, Torchilin V: Stimuli-sensitive nanopreparations for combination cancer therapy. *J Control Release* **190**: 352-70 (2014)
- Kartal-Yandim M, Adan-Gokbulut A, Baran Y: Molecular mechanisms of drug resistance and its reversal in cancer. *Crit Rev Biotechnol* **36**: 716-26 (2016)
- Lambert JM, Berkenblit A: Antibody-Drug Conjugates for Cancer Treatment. *Annu Rev Med* **69**: 191-207 (2018)
- Leonard GD, Fojo T, Bates SE: The role of ABC transporters in clinical practice. *Oncologist* **8**: 411-24 (2003)
- Li C, Li Y, Gao Y, Wei N, Zhao X, Wang C, Xiu X, Cui J: Direct comparison of two albumin-based paclitaxel-loaded nanoparticle formulations: is the crosslinked version more advantageous? *Int J Pharm* **468**: 15-25 (2014)
- Marcazzan S, Varoni EM, Blanco E, Lodi G, Ferrari M: Nanomedicine, an emerging therapeutic strategy for oral cancer therapy. *Oral Oncol* **76**: 1-7 (2018)
- Nguyen CH, Huttary N, Atanasov AG, Chatuphonprasert W, Brenner S, Fristiohady A, Hong J, Stadler S, Holzner S, Milovanovic D, Dirsch VM, Kopp B, Saiko P, Krenn L, Jager W, Krupitza G: Fenofibrate inhibits tumour intravasation by several independent mechanisms in a 3-dimensional co-culture model. *Int J Oncol* **50**: 1879-88 (2017)
- Rizzo LY, Theek B, Storm G, Kiessling F, Lammers T: Recent progress in nanomedicine: therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Curr Opin Biotechnol* **24**: 1159-66 (2013)
- Szakács G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Gentle C, Gottesman MM: Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov* **5**: 219-34 (2006)
- Wicki A, Rochlitz C, Orleth A, Ritschard R, Albrecht I, Herrmann R, Christofori G, Mamot C: Targeting tumor-associated endothelial cells: anti-VEGFR2 immunoliposomes mediate tumor vessel disruption and inhibit tumor growth. *Clin Cancer Res* **18**: 454-64 (2012)