

Válaszok Dr Zupkó István bírálataira

Szeretném megköszönni Professzor Úrnak, hogy elvállalta MTA doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm a bírálatban megfogalmazott pozitív, támogató véleményét, kritikai észrevételeit, kiigazításait és nagyon hasznos kérdéseit.

Köszönöm, hogy felhívta a figyelmemet két gyógyszer-hatóanyag írásmódjának hibájára. Helyesen 'mianszerin' és 'monenzin' írásmódot kellett volna használnom. A vegyületek szerkezeti képleteinél az aromás gyűrű kétféle megjelenítése helyett szintén szerencsésebb lett volna egyféle ábrázolást alkalmazni.

Az értekezésben a rövidítések használatát amennyire lehetett kerültem azért, hogy a rövidítések ne nehezítsék meg az olvashatóságot. A dolgozat elejére illesztett rövidítésjegyzékben azokat a rövidítéseket és értelmezésüket soroltam fel, amelyeket a dolgozat szövegében az első megjelenést követően folyamatosan használtam. A metabolizáló fenotípusok PM, IM és EM rövidítéseinek használatát kerültem a szöveges részen, az ábrákon és táblázatokban ugyan alkalmaztam a helyszűke miatt, de minden alkalommal az ábraalírásban vagy a táblázat lábjegyzetében megadtam a rövidítés értelmezését. Hasonlóan jártam el a MC (3-metilolantrén) és a DHEA (dehidroepiandroszteron) vegyületek esetén is.

A hepatocita „egy-sejt-réteg” kultúra fotója (9. ábra) valóban nem tartozik az eredmények közé, eredetileg illusztrációnak szántam. Azt szándékoztam bemutatni, hogy a májból izolált gömbszerű sejtek a kollagén felszínre történő letapadás után az *in vivo* állapothoz hasonló morfológiát mutatnak (szögletes sejtforma, két-sejtmagvas állapot, epe-kanalikusok).

Az értekezéssel kapcsolatban Professzor Úr hat pontban fogalmazta meg kérdéseit és kritikai észrevételeit.

1. A $t_{1/2}$ értékek *in vitro* meghatározása során az alkalmazott 16 pszichofarmakon kinetikai adatai alapján a patkány májsejtek tekinthetők a legmegbízhatóbb *in vitro* modellnek. Ez a megállapítás mennyire alkalmazható más terápiás terület hatóanyagaira, vagy általában a gyógyszerkincsre? A májsejteken meghatározott kinetikai állandók (Cl_H , biohasznosulás, $t_{1/2}$) milyen reprodukálhatósággal mérhetők ki? Az ide vonatkozó ábrák (10. ábra, A és C panel) nem tartalmaznak SD vagy SEM adatokat.

Nagyon köszönöm Professzor Úrnak ezt a kérdést.

A kutya és a nyúl májsejtekkel végzett inkubálások során a 16 pszichofarmakon farmakokinetikai paraméterei ($t_{1/2}$, Cl_{int} , Cl_H) jelentős eltéréseket mutattak a humán hepatocitákhoz képest (a korreációs vizsgálatokban az $r^2 \leq 0,2$), míg a farmakokinetikai paraméterek patkány és humán májsejtek közötti korrelációja szembetűnő volt ($r^2 > 0,75$). Ugyanakkor szeretném megjegyezni, hogy a patkány és humán hepatocitákon nyert adatokból kalkulált paramétereknél nagyságrendnyi különbséget találtunk (1. táblázat). Ezt tükrözi a máj becsült extrakciós hatásfoka (E) alapján megállapított minősítés is; a 16 hatóanyag közül patkánynál 9 minősült magas extrakciójú vegyületnek, míg embernél csak egy, a kvetiapin.

1. táblázat: A humán és patkány hepatocitákon nyert farmakokinetikai paraméterek korrelációja

Farmakokinetikai paraméter	Merekség	r ²
Felezési idő, t _{1/2}	0,1856	0,893
„Intrinsic clearance”, Cl _{int}	26,68	0,952
Hepatikus „clearance”, Cl	3,57	0,790

A preklinikai fejlesztés fázisában az *in vitro* farmakokinetikai vizsgálatoknak egyik nagyon fontos célja, hogy becsüljük a máj extrakciós hatásfokát (E), azaz a máj milyen mértékben képes megtisztítani a szervezetet az adott vegyülettől, valamint hogy farmakokinetikai szempontból összehasonlítsuk a biztonsági vizsgálatokban alkalmazott állatokat az emberrel. Egyrészt hogy értelmezni tudjuk a toxikológiai vizsgálatok eredményeit, másrészt hogy becsüljük az adott hatóanyag embernél várható farmakokinetikai viselkedését még mielőtt az első egészséges önkéntesnek beadnák a vegyületet.

Professzor Úr kérdésére válaszolva, a 16 pszichofarmakon alapján megállapított viszonylagos patkány – humán hasonlóság más hatóanyagoknál nem feltétlenül érvényes, minden vegyületnél külön vizsgálatot igényel. Az értekezésben bemutatott, az EGIS Gyógyszergyár által fejlesztett panomifen például egyáltalán nem erősítette a patkány – humán hasonlóságot, amelyet az eltérő metabolikus útvonalakkal magyaráztunk. A kizárólag a humán májmodellben képződő metabolit pedig külön problémát jelenthet, hiszen a laboratóriumi állatfajokon végzett toxikológiai vizsgálatok eredményei nem tükrözik a humán-specifikus panomifen metabolit hatását.

A reprodukálhatóságra, illetve a szórásra vonatkozó kérdéssel kapcsolatban a következőket válaszolnám. A gyakorlatban az *in vitro* kinetikai vizsgálatokat kétféle módon végezzük; 1) az adott faj több egyedéből izolált májsejteken egyedileg külön-külön, ekkor van lehetőség szórás számításra, 2) vagy ún. májsejt „pool”-on, több egyedből összekevert májsejteken, ilyenkor értelemszerűen csak az átlagértékeket tudjuk megállapítani. Többnyire ez utóbbit alkalmazzuk, hiszen a máj extrakciós hatásfoka alapján a vegyületek minősítése viszonylag tág kategória határokkal történik (alacsony extrakciójú $E < 0,3$; közepes extrakciójú $0,3 < E < 0,7$; magas extrakciójú vegyület $E > 0,7$). Másrészt igazán nagy egyedi eltérésekre inkább az embernél számíthatunk (genetikai és nem-genetikai okok miatt), azonban az embernél várható eltérésekre az enzim-térképezés és a gyógyszer-interakciós (CYP gátlás és indukciós) vizsgálatok során külön is kitérünk. A 16 pszichofarmakon esetén 3 egyedből összekevert májsejteken végeztük a farmakokinetikai vizsgálatokat (a technikai párhuzamosok alapján megállapított SD-t, ami általában <5%, pedig nem ábrázoltuk). Szeretném még megemlíteni, hogy gyakran alkalmazunk a vizsgált vegyülethez hasonló szerkezetű, ugyanazon vegyületcsaládba tartozó, már ismert hatóanyagot referenciaként. A panomifen esetén így használtuk referenciavegyületként a tamoxifent, amelynek *in vivo* farmakokinetikai viselkedése, metabolizmusa már jól ismert volt.

2. A 2. oldalon az ADME magyarázatok az E jelentésére az eliminációt írja a szerző. Ez zavaró, ugyanis az általánosan elfogadott definíció szerint az elimináció magába foglalja a

metabolizmust, a betűszóban az E az exkréciót – kiválasztást – jelenti (pl. Balani SK et al.: Strategy of utilizing *in vitro* and *in vivo* ADME tools for lead optimization and drug candidate selection. Curr Top Med Chem (2005), doi: 10.2174/156802605774297038).

Nagyon köszönöm Professzor Úrnak a kiigazítást. Helytelenül definiáltam az ADME rövidítésben az 'E' jelentését, amely helyesen az exkréciót, azaz a kiválasztást takarja.

3. A szerző az 5. oldalon arról ír, hogy hatóanyagok sokszor veszélyes interakciós profil miatt kerülnek visszavonásra. Az egyik példaként említett cerivasztatint nem a feltárt interakciói miatt vonták vissza, jóllehet más hatóanyaggal együtt adva – gemfibrozillal kapcsolatban van a legtöbb adat – fokozott toxicitásról számoltak be. A cerivasztatin monoterápiában is egy nagyságrenddel gyakrabban okozott rhabdmiolízist, mint a csoport többi alkalmazott tagja. Ezért vonták ki a cerivasztatint.

Köszönöm a kiigazítást, kiegészítést a koleszterinszint csökkentő cerivasztatin visszavonásával kapcsolatban. A visszavonás háttérében 52 cerivasztatinhoz köthető, rhabdmiolízis miatt bekövetkező haláleset volt. Ebből az Egyesült Államokban történt 31 halálesetnél a betegek vagy magas cerivasztatin dózist (0,8 mg/kg) kaptak, vagy 12 esetben az alacsony dózisu cerivasztatint lipidcsökkentő gemfibrozillal alkalmazták együtt. A gemfibrozil glukuronid metabolitja erős CYP2C8 gátlószer, és mivel a cerivasztatin metabolizmusát elsősorban a CYP2C8 enzim katalizálja, a 12 betegnél a cerivasztatin gemfibrozil együttes alkalmazása valószínűleg hozzájárult a súlyos mellékhatás kialakulásához és a fatális kimenetelhez.

Egyetértek Professzor Úrral, hogy a cerivasztatin mellékhatás képe önmagában is elegendő volt a gyógyszerengedélyező hatóságnak ahhoz, hogy visszavonja a forgalomból a cerivasztatint, a gemfibrozillal való gyógyszer-kölcsönhatás csak külön súlyosbító tényező volt a folyamatban.

4. A jelölt a disszertáció módszertani részének 3.10 fejezetében immunesszéként adja meg egyes hatóanyagok (ciklosporin, takrolimus, valproát) meghatározásának módját. A kifejezés gyűjtőfogalom, nem definiálja pontosan az alkalmazott technikát.

A kalcineurin inhibitorok vérszintjét ACMIA (ellenanyag-konjugált mágneses immunesszé) technikával határozták meg a Semmelweis Egyetem központi laboratóriumában. A beteg vérmintájában lévő ciklosporint vagy takrolimust a specifikus ellenanyag köti meg, az inkubációs elegyben a szabadon maradt felesleges ellenanyag pedig mágneses gyöngyökhöz kapcsolt ciklosporinnal, illetve takrolimusszal távolítható el. A vérminta ciklosporint vagy takrolimust kötött ellenanyag mennyisége az ellenanyag-konjugált β -galaktozidáz aktivitás alapján mérhető a felülúszóban (klórfenol vörös- β -D-galaktopiranozid \rightarrow klórfenol vörös), és a képződő klórfenol vörös metabolit mennyisége egyenesen arányos a vérminta ciklosporin, illetve takrolimus tartalmával.

A valproát vérszinteket a Heim Pál Gyermekgyógyászati Intézetben, valamint a Semmelweis Egyetem központi laboratóriumában FPIA (fluoreszcencia polarizációs immunesszé) technikával mérték. A technika egy kis fluoreszcens molekulát (fluoreszcein) alkalmaz, amely képes a valproáthoz kötődni. A szabad valproáthoz kötött fluoreszcens molekula szabadon tud rotálni, míg az ellenanyag-valproát komplexhez kapcsolódó fluoreszcens jelölő molekula nem képes rotálni a nagyobb molekulaméret miatt. Polarizált fényel megvilágítva ezért csak az

ellenanyag-kötött jelölt valproát fog polarizált fényt emittálni. A valproát-specifikus ellenanyaggal való inkubáció során a beteg vérmintájában lévő jelöletlen valproát verseng a hozzáadott fluoreszein-jelölt valproáttal az ellenanyag kötőhelyeiért, és az emittált fény intenzitása így fordítottan arányos lesz a beteg vérmintájában lévő valproáttal.

(Dasgupta A, in: Biotin and Other Interferences in Immunoassays, 2019, 1–15. doi:10.1016/b978-0-12-816429-7.00001-0).

5. A szerző a 4.1.3 fejezetben leírt enzim térképezés során az LK-935 vegyület vizsgálatakor ketokonazol alkalmazott a CYP3A4 szelektív bénítására, míg a deramciklan vizsgálata során ugyanerre a célra troleandomicint alkalmazott. Mi indokolta a több szelektív inhibitor alkalmazását?

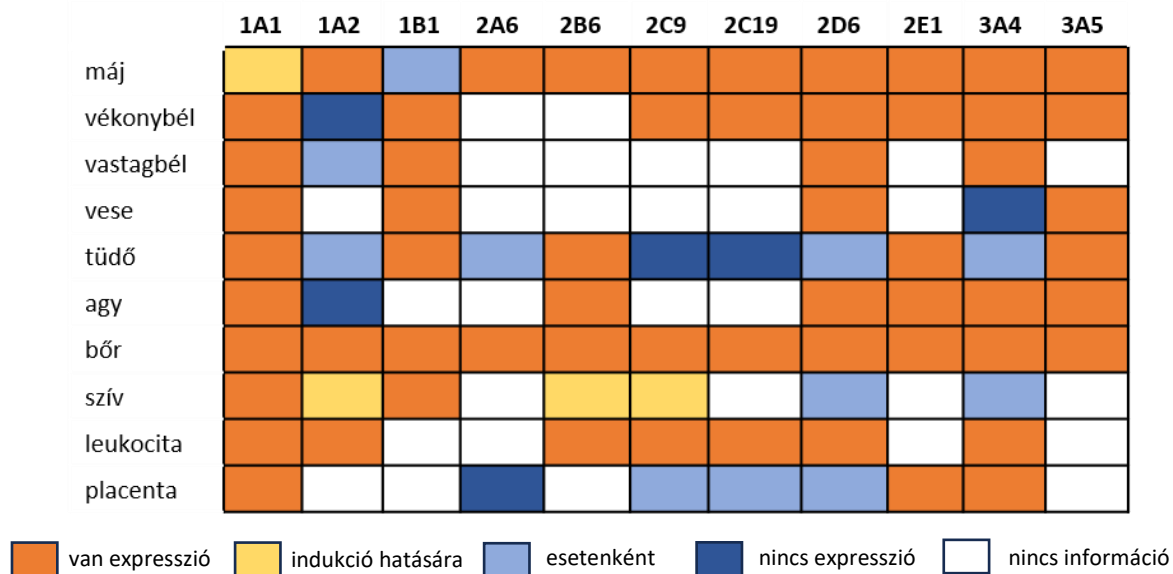
A fejlesztés alatt álló gyógyszerjelölt vegyületek metabolizmusát katalizáló CYP enzimek azonosítása során számos CYP-szelektív gátlószert alkalmazhatunk. A CYP3A4 enzim gátlására is széles gátlószer kínálatból választhatunk. Az FDA, az Amerikai Élelmiszer és Gyógyszer Engedélyezési Hivatal (US Food & Drug Administration) és az EMA, az Európai Gyógyszer Ügynökség (European Medicines Agency) ajánlása szerint a CYP3A4 azonosítására alkalmazható a troleandomicin és a ketokonazol mellett még az azamulin, itraconazol és a verapamil is.

A laboratóriumunkban beállított vizsgálatok során eleinte a troleandomicint használtuk (pl. a deramciklán enzim-térképezése során), később a ketokonazol is beemeltük a választható CYP3A gátlószer közé (pl. a LK-935 enzim-térképezése). A troleandomicin egy ún. mechanizmus alapú gátlószer, a metabolizmus során képződő termék nem disszociál az enzimről és a képződő metabolikus intermedier komplex irreverzibilisen gátolja az enzimet. Ebből következően a gyakorlatban a máj mikroszóma preparátummal és a troleandomicinnel egy 20-perces előinkubálást végzünk mielőtt a vizsgálandó gyógyszerjelöltet a reakcióelegyhez adnánk. Ez az idő elegendő ahhoz, hogy kialakuljon a metabolikus intermedier komplex a CYP3A4 enzimmel. A ketokonazol kompetitív CYP3A gátlószer, alkalmazásakor nincs szükség előinkubálásra, ami leegyszerűsíti a vizsgálatot a gyakorlatban. Ezért is használjuk szívesebben a ketokonazol a CYP3A enzimek gátlására. Természetesen ha az a cél, hogy egy gyógyszerjelölt vegyület metabolikus intermedier komplex képző hajlamát tárjuk fel, akkor referencia vegyületként mindenképp a troleandomicint használjuk.

6. Van-e magyarázat vagy elképzelés arra az eredményre, miszerint a leukocitákból mérhető citokróm mRNS expressziója a legtöbb lényeges izoenzimre nézve tükrözi a májban mérhető enzimaktivitást, a CYP2B6 és CYP2D6 esetében azonban nincs ilyen korreláció?

A leukocita CYP mRNS expresszió alapján becsülhető hepatikus CYP aktivitás korlátozott volta, illetve annak oka sokszor felmerül kérdésként. A CYP enzimek eltérő szöveti megjelenése jól ismert, amelyet egy áttekintő ábrán foglaltam össze (1. ábra).

A *CYP2D6* gén transzkripcióját, ellentétben más, a gyógyszer-metabolizmusban szerepet játszó CYP enzimmel, kémiai anyagok nem befolyásolják, azaz a jelenlegi ismereteink szerint gyógyszer vagy egyéb testidegen anyag hatására a *CYP2D6* expresszió nem indukálódik. A *CYP2D6* konstitutív expresszióját ugyanakkor számos transzkripciós faktor szabályozza.



1. ábra: A xenobiotikumok metabolizmusát katalizáló leglényegesebb CYP enzimek szöveti expressziója (Raunio 1999; Hukkanen 2002, Baron 2008, Shimada 1996, Guengerich 2015, He 2015)

A máj-specifikus HNF4 α (hepatocita nukleáris faktor 4 α) a CYP2D6 expresszió meghatározó regulátora a májban, amely azonban hiányzik más szövetekben. A CYP2D6 májtól eltérő kifejeződését figyelték meg az agyban, ahol is a lokális CYP2D6 metabolizmus számos pszichoaktív hatóanyag hatékonyságát módosíthatja (pl. kodein). Hátterében több mechanizmus is állhat, amely egyes transzkripciós faktorok, nukleáris receptorok eltérő szöveti expressziójára vezethető vissza [pl. cAMP-response element-binding protein 1 (CRE-BP1), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)] (Turman et al. Expert Opin Drug Metab Toxicol 2006, Zhang et al Neurosci 2018). Egy tavaly megjelent közleményben leírták, hogy egereknél az agy Cyp2d aktivitása hormonális hatásra (ösztadiol, progeszteron) megváltozik, és a ciklikusan változó hormonszintek folyamatosan változó Cyp2d metabolizmust eredményeznek az agyban (Arguelles et al. Biochem Pharmacol 2022). A leukocitákban tapasztalt eltérő CYP2D6 expressziót is magyarázhatjuk szövetspecifikus regulációval, ahogy azt a hepatikus és az agyi expresszió esetén leírták, azonban a leukocita CYP2D6 expresszió ilyen típusú szabályzására vonatkozó konkrét ismeretet az irodalomban nem találtam.

A CYP2B6 expressziója jellemzően a májra korlátozódik, és csak kisebb mennyiségben mutatták ki az agyban, a tüdőben, a bőrben, valamint a leukocitákban, mint extrahepatikus szövetekben. A CYP2B6 májszövet-specifikus konstitutív expressziójának szabályzásában szintén nagy szerepe van a máj-specifikus HNF4 α transzkripciós faktornak, amely transzkripciós ko-aktivátorok [pl. specificity protein 1 (Sp1), steroid receptor co-activator 1 (SRC-1)] kötődését is elősegíti. Ugyanakkor a CYP2B6 transzkripcióját nukleáris receptorok is szabályozzák, elsősorban a CAR (konstitutív androsztán receptor). Az aktivált CAR a CYP2B6 gén promoter régiójában a PBREM-hez („phenobarbital responsive enhancer modul”) kötődve szabályozza a gén átíródását. A májban a HNF4 α elősegíti a transzkripciót fokozó komplex kialakulását azzal, hogy a PBREM-et kihurkolódással a transzkripciós kezdőpont közelébe juttatja. Az extrahepatikus szövetekben a HNF4 α nem szabályozza a CYP2B6 gén

átíródását, ennél fogva a CYP2B6 expresszió eltér a májban lévő regulációtól, és nem követi a máj CYP2B6 aktivitását. Hozzá kell tenni azonban, hogy az irodalomban a leukociták eltérő CYP2B6 expressziójára vonatkozó magyarázatot nem találtam.



Monostory Katalin