

Válaszok Prof. Dr. Pongrácz Judit Erzsébet opponensi véleményére

Köszönöm Professzor Asszony munkáját és méltató szavait. Neki is, és másik két opponensemnek is hálás vagyok, hogy mindannyian felismerték kutatócsoportunk munkájának értékét, és pozitívan értékelték erőfeszítéseinket, amiket az Alzheimer-kórral kapcsolatos gyógyszerkutatás eddig sikereiben egyáltalán nem bővelkedő területén tettünk. Kérdéseire a következő válaszokat adom.

Kérdések

Mivel az értekezés igen jól dokumentált és áttekinthető, a kérdéseim is néhány, a dolgozat fő témaköreire lefedő területre koncentrálnak és elsősorban érdeklődő jellegűek:

1. A sejtenyészetekben és agyszeleteken végzett in vitro elektrofiziológiai vizsgálatokban sejtvonalakat és vad típusú egerekből származó agyszeleteket alkalmaztak aggregátumokkal történő közvetlen kezelést követően, az elektrofiziológiai gerjeszthetőség vizsgálatára.

1/1 A modellezés kapcsán merült fel az a kérdés, hogy nem volna-e hasznosítható emberi sejtekkel összeállított agyszövet aggregátumokon történő vizsgálatok beállítása?

1/2 Mostanában megjelent kutatásokban mikrofluidikai rendszerek alkalmazását helyezték előtérbe, mivel a mikrofluidikai rendszerek ökonomikusak, kevés sejtet igényelnek, miközben a betegség patológiája nyomon követhető, a multicelluláris sejt-sejt közötti kommunikáció kivitelezhető és alacsony a befertőződés kockázata, miközben a rendszer hosszú távon fenntartható. Esetleg további kutatásaiban gondolt-e mikrofluidikai rendszerek alkalmazására?

Válasz:

A kérdésre az irodalomban található kutatások egyértelmű pozitív választ adnak. Az utóbbi évtizedben komoly kutatási irányba fejlődött az organoidokon és mikrofluidikai rendszerek alkalmazásán alapuló kísérleti modellfejlesztés. Az eddigi eredmények rendkívül biztatóak, ám felfedték ezeknek a modelleknek a nyilvánvaló hátrányait is.

Az agyi organoidok előállítása etikai okok miatt főleg indukált pluripontens őssejtek felhasználásával történik. Ezek származhatnak az AK-ra jellemző genetikai mutációkkal rendelkező emberi alanyok sejtjeiből (fibroblasztokból), de van már olyan modell is, mely egészséges alanyok sejtjeit használja, amiken külső indukcióval érhető el az AK-ra jellemző sejtszintű változások megjelenése. Ezért elképzelhető, hogy egy megfelelő organoidon ki tudnánk fejleszteni olyan modellt, melyben különféle aggregációs állapotú A β peptidet alkalmaznánk a vizsgálatokhoz. 2013-2016 között együttműködtünk európai és magyar kutatócsoportokkal (Prof. Paul Hyttel csoportja a Koppenhágai Egyetemen és Prof. Dinnyés András csoportja a Szent István Egyetemen) a betegekben nyert sejtekből fejlesztett iPSC-k fejlesztésében, és elektrofiziológiai vizsgálatában. A projekt során szerzett tapasztalataimat megerősíti egy egészen friss, 2025-ös összefoglaló munka [1],

amely kritikai szempontból elemzi az eddig az AK kutatásában alkalmazott organoidok és mikrofluidikai rendszerek alkalmazásával kapott eredményeket. Eszerint a következő problémák jelentik jelenleg a korlátját a módszer széles körű elterjedésének:

1. Az alap organoid modellek egyik fő problémája az egységes struktúra hiánya. A sejtek önszerveződése spontán módon történik, ami korlátozza a modellek reprodukálhatóságát és a specifikus agyterületek vizsgálhatóságát. Ezt a problémát a kutatók irányított differenciáltatás alkalmazásával, illetve polimer vázszerkezetek alkalmazásával próbálják kiküszöbölni.
2. Másik komoly korlát a belső sejtrétegek oxigén- és tápanyagellátásának hiánya, mivel az organoid modell nem tartalmaz véredényeket. Ez a sejtek elhalásához és az organoid élettartamának csökkenéséhez vezet. Erre megoldást jelenthet a mikrofluidikus rendszerek alkalmazása, amellyel a kontrollált folyadékáramlás révén biztosítható lehet a sejtek zavartalan anyagcseréje, illetve olyan vaszkularizált organoidok létrehozása, amik esetében az organoidokba endotélsejteket integrálnak, melyek elősegíthetik kapilláris struktúrák kialakulását.
3. Az AK esetén külön problémaként jelentkezik, hogy az organoid szervezettsége mindenképpen egy kezdeti, fejlődő stádiumnak felel meg, az öregedéssel járó neurobiológiai elváltozásokat a modell nem tudja biztosítani. Ezen kívül a neuroinflammáció és az immunrendszer aktivációja is helyet kell kapjon a modellben, mely kombinált, mikrogliát és asztrocitákat is tartalmazó organoid kifejlesztését teszi szükségessé.

A fentiekből látszik tehát, hogy bár az emlős modell számos hátránnyal jár (transzlálhatósága kérdéses), mégis rendelkezik előnyökkel is a humán sejtalapú organoidokhoz képest. Az olyan organoidok reprodukálható előállítása, melyek mutatják az AK-patológiát jellemző szerkezeti és funkcionális tulajdonságokat, jelenleg még mindig költség- és időigényes feladat. Azonban a területen már eredményeket elért, kidolgozott rendszerrel rendelkező kutatócsoporttal való kooperáció révén valószínűleg alkalmazni tudnánk egy ilyen modellt gyógyszervizsgálati platformként. Ebben az esetben az említett problémák miatt mindenképpen mikrofluidikai rendszerrel kombinált organoidot részesítenék előnyben.

2. Az aggregátumok biológiai modellrendszerekben történt vizsgálata során in vivo tesztek is végeztek, ahol az állatok tanulási képessége az oligomerek injektálását követő 4-5 napon jelentősen leromlott. Itt jegyzi meg a szerző, hogy az injektálásos modellek kialakításánál kulcsfontosságú a bejuttatás módjának gondos megtervezése, mert már a 4,5 kDa-os A β 1-42 monomer diffúziója az injektálás helyétől a célsejtek felszínére is problémás lehet, ami hatványozottan jelentkezik a nagyobb méretű oligomerek és fibrilláris aggregátumok esetében.

2/1 Lehetséges lenne-e a hasonló kísérletek elvégzéséhez lipid nanopartikulumok alkalmazása, melyek hatékonyságának előtesztelése akár a fent említett mikrofluidikai rendszerekben is lehetséges lenne?

2/2 Elképzelhető-e célzott lipid nanopartikulumok bejuttatása, ahol a lipid nanopartikulumok felszínére a target sejtekhez kapcsolódó, akár jelzett és nyomon követhető molekulák biztosítanák az oligomerek és fibrilláris aggregátumok célba jutásának tényét?

Válasz:

Lipid nanopartikulumokkal A β aggregátumok célzott bejuttatására nem találtam még publikált eredményeket. Ennek ellenére nem elképzelhetetlen egy ilyen kísérleti rendszer összeállítása. A feladat azonos az AK kezelésére alkalmazható terápiás szerek célzott bejuttatásával, melyre számos kísérlet megoldás található az irodalomban. Egy ilyen rendszer feladata kettős: egyrészt az adminisztráció helyétől függően át kell jutnia a vér-agy-gáton. Ezt az LNP felületén elhelyezett specifikus BBB-átjutást segítő molekulákkal oldhatjuk meg, mely témában kutatócsoportunk Prof. Dr. Deli Mária csoportjával kooperálva is végzett kutatásokat. A glutationnal, illetve SLC- („solute carrier”) ligandumként funkcionáló alaninnal és glükopiránózzal módosított nioszómák eredményeink szerint jó hatásfokkal jutottak át a BBB-n [2]. Másik lehetséges adminisztrációs út az ornyálkahártyán keresztül történő bejuttatás, mellyel kikerülhető a BBB. Ilyen irányban is végeztünk kutatásokat, igaz, nem nanopartikulumos formulálással, hanem egy, az intranazális bejutást elősegítő mátrix alkalmazásával [3].

A BBB-n való átjutást követően megoldandó a megfelelő agyi targetálás kérdése. Ez ügyben az AK diagnosztikájával, illetve a hatóanyagok célzott bejuttatásával kapcsolatos eredményekre támaszkodhatunk. MRI-diagnosztikumként alkalmazott ferromágneses részecskéket pl. szialinsavval, A β antitest-kurkumin kombinációjú felületmódosítással, vagy egy ET6-21 jelű A β -targetáló ligandummal tudtak célzottan az A β aggregátumokhoz eljuttatni [4-6]. A BBB-n történő átjutást követő hatékony neuronális targetálást nemrég sikerrel oldották meg egy fúziós stratégiával [7], melyben egy BBB-átjutást elősegítő peptidet (TGN) kapcsoltak össze egy tetraglicin-linkeren keresztül egy neuron-targetáló peptiddel (Tet1). Az eredmények alapján ez a stratégia alkalmas lehet akár LNP-be csomagolt A β oligomerek célzott bejuttatására is.

3. Kétségtelen, hogy viselkedésvizsgálatok kivitelezése csak élő állaton lehetségesek, és az eredmények humán AK-ra történő translációja korlátozott. Viszont a célterületre történő biztos bejuttatás emberi agyra hasonlító szöveti összetételű mini-szöveti rendszerekben lehetséges.

3/1 Terveznek-e, avagy lehetségesnek tartja-e, hogy a terápiára tervezett monoklonális ellenanyagok hatását első lépésben emberi agysejt típusok szöveti hálózatából előállított mikrofluidikai kísérleti rendszerekben végezzék el, amely esetleg a patkány agysejtekben végbemenő változások „mimikrije” alapján felelvorsíthatná az ígéretesnek tűnő gyógyszerek engedélyeztetési eljárásait?

Speciálisan makromolekulás terápia, antitest, nanobody, vagy a foldamer-dendrimer konjugátumok hatásának vizsgálata is természetesen lehetséges mikrofluidikai rendszerben létrehozott organoidokon. Azt gondolom, hogy ebben az esetben mindenképpen az endothéllal kombinált agyi organoid modellt kellene alkalmazni. Mikrofluidikai chipen Nashimoto és csoportja hozott létre humán köldökvénás endothél sejtek és humán fibroblasztok együtt-tenyésztésével vaszkularizációt mutató organoidot [8], ezt tovább fejlesztve megfelelő neuronális irányú differenciáltatással létrehozható lenne a kívánt rendszer. Azt gondolom, preklinikai kutatási fázisban mindenképpen hasznos lehet egy ilyen modell, ha nem is feltétlenül időnyereség céljából, hanem inkább az eredmények translálhatósága érdekében.

4. Az agyban fellépő gyulladások, stresszfolyamatok hatására az S1R működése megváltozik.

Emellett megfigyelhető a receptor mennyiségének változása is. Kifejti, hogy kíváncsi lenne nagyobb szelektivitással rendelkező molekulák azonosítása, és az eddigi S1R agonisták és antagonisták elkülönítése, mely jelenleg még pontosan nem definiált, és a vegyületek karaktere sem egyértelmű a

terápiás hatás kifejtésénél. Vizsgálataiban a 12 legjobb *in silico* affinitással rendelkező molekula szerkezetét azonosította.

4/1 Az eddigi vizsgálatai alapján mely molekulaszervezetek terápiás hatékonyságában bízik a leginkább, melyeket látná legvalószínűbbnek klinikai alkalmazásban a közeljövőben?

Köszönöm a kérdést, amire nem egyszerű a jelenlegi kutatási környezetben válaszolni. Az elmúlt évek során kiderült, hogy az AK terápiájában leginkább a passzív immunizáláson alapuló eljárások nyertek teret. Emiatt azt gondolom, hogy a kismolekulás gyógyszerfejlesztési törekvések nehezített pályán mozognak, nehéz gyógyszeripari partnert találni ezen vegyületek klinikai vizsgálatainak megindításához. Ezért külön kell választani a hatásosságon alapuló sikerességet a tényleges gyógyszerre fejlesztés sikerességétől; utóbbira sajnos egyik általunk leírt vegyület esetében sincs túl nagy esély. Az S1R-modulátorok közül további kutatásokat végeztünk és végzünk az L1, L2, L4 és L5 vegyületekkel, ezekből viszont szabadalmi okok miatt nem lehetséges a további gyógyszerfejlesztés. Az *in silico* szűrést és a kötésvizsgálatokat a dolgozatban közölt molekulakönyvtáron túl további könyvtárakra is kiterjesztettük, az eredmények alapján

jelenleg még egy ígéretes vegyületünk van, amelynek 4 sztereoizomerét vizsgáljuk hatásosság, illetve gyulladáscsökkentő hatás szempontjából, ezek reményeink szerint szabadalmaztathatóak lesznek gyógyszerjelölt vegyületekként.

Ezen kívül a P33 vegyület esetében érzek még potenciált a további gyógyszerfejlesztésre, mert az a vegyület biológiai vizsgálatokban minden esetben nagyon eredményes volt, hatásmechanizmusát tekintve pedig a dolgozatomban említett AICD-Fe65 kölcsönhatás modulálása mellett egy másik folyamat is szerepet játszhat. Az utóbbi években felerősödött az AK-ban tapasztalható szinaptikus károsodás visszafordításán alapuló terápiák kutatása. A szinaptikus működés javításában fontos szerepe van egy fehérjének, a KIBRA-nak („kindey and brain protein”). Az eddigi kutatási eredmények szerint a KIBRA gátolja az A β által kiváltott neuronális apoptózist az Akt-útvonallal aktiválásával [8], javítja a szinaptikus plaszticitást, ellensúlyozza a taupátia következtében fellépő memóriavesztést [9], illetve részt vesz az A β szekréciójának és az APP sejten belüli transzportjának szabályozásában is azáltal, hogy befolyásolja az extracelluláris vezikulumok képződését a lizoszomális fehérjerendszer egyes elemein keresztül. A KIBRA számunkra azért került előtérbe, mert egy II-es típusú WW-domainnel rendelkezik, mely szintén alkalmas arra, hogy az Fe65-höz hasonlóan kölcsönhatást tudjon kialakítani a P33 molekulával, illetve társvegyületeivel. Jelenleg ebben a témában is szeretnénk további kutatásokat végezni.

Hivatkozott irodalom

1. Sainz, A., et al., *Pros and Cons of Human Brain Organoids to Study Alzheimer's Disease*. Aging Dis, 2025.
2. Mészáros, M., et al., *Niosomes Decorated with Dual Ligands Targeting Brain Endothelial Transporters Increase Cargo Penetration across the Blood-Brain Barrier*. Eur J Pharm Sci, 2018. **123**: p. 228.
3. Sipos, E., et al., *Intranasal Delivery of Human Beta-Amyloid Peptide in Rats: Effective Brain Targeting*. Cell Mol Neurobiol, 2010. **30**(3): p. 405.
4. Viola, K.L., et al., *Towards Non-Invasive Diagnostic Imaging of Early-Stage Alzheimer's Disease*. Nat Nanotechnol, 2015. **10**(1): p. 91.
5. Kouyoumdjian, H., et al., *Glyconanoparticle Aided Detection of B-Amyloid by Magnetic Resonance Imaging and Attenuation of B-Amyloid Induced Cytotoxicity*. ACS Chem Neurosci, 2013. **4**(4): p. 575.
6. Tanifum, E.A., et al., *A Novel Liposomal Nanoparticle for the Imaging of Amyloid Plaque by Magnetic Resonance Imaging*. J Alzheimers Dis, 2016. **52**(2): p. 731.
7. Guo, Q., et al., *A Dual-Ligand Fusion Peptide Improves the Brain-Neuron Targeting of Nanocarriers in Alzheimer's Disease Mice*. J Control Release, 2020. **320**: p. 347.
8. Nashimoto, Y., et al., *Integrating Perfusable Vascular Networks with a Three-Dimensional Tissue in a Microfluidic Device*. Integr Biol (Camb), 2017. **9**(6): p. 506.
9. Kauwe, G., et al., *Kibra Repairs Synaptic Plasticity and Promotes Resilience to Tauopathy-Related Memory Loss*. J Clin Invest, 2024. **134**(3).

Szeged, 2025. március 7.


Dr. Fülöp Livia