

**MDR — ABC transzporter aktivitás normál populációban
és reumatoid artritiszben szenvedő betegeknél.
Eszköz a biológiai terápiára adott válasz előrejelzésére.**

Doktori (PhD) értekezés tézisei

Szerémy Péter Gábor

Témavezető: Dr. Krajcsi Péter

Biokémia Intézet
Általános Orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem

Szeged

2021

1. Bevezető

Az elmúlt 10 évben paradigmaváltás történt a multidrog rezisztencia (MDR) transzporter hatásmechanizmus klinikai jelentőségének és potenciális biomarkerként való működésének megértésében.

Korábban azt feltételezték, hogy a multidrog rezisztencia - ATP-kötő kazetta (MDR—ABC) transzporterek aktivitásnak kizárólag a gyógyszer molekulák sejtből történő kipumpálásában van szerepe és egyes gyógyszerek terápiás hatékonyságának csökkenése is csak ezzel a funkciójával függ össze. Újabban egyre több bizonyíték mutat arra, hogy a transzportereknek fontos szerepük van a gyógyszer molekulák kipumpálása mellett, az immun- és a gyulladásos folyamatok szabályozásában. Számos gyulladásos jelzőmolekula sejtből történő kijutásának legfontosabb útvonalának bizonyultak. Ide tartoznak például a thrombocyta-aktiváló faktor (PAF), a sphingosine-1- foszfát (S1P) és eikozanoidok (prosztanoidok és leukotriének), amelyek a krónikus gyulladás fontos mediátorai közé tartoznak. Az MDR—ABC transzporterek modulálhatják a sejt redox homeosztázisát is. Ezenkívül számos tanulmány kimutatta az MDR—ABC transzporterek klinikai jelentőségét prognosztikus (adott betegség kórjóslatára utaló) és / vagy prediktív (egy adott terápiára való válaszkészséget jelző)

markerként az aktív reumatoid arthritisz (RA) immunszuppresszív terápiájban, melynek során metotrexátot, egyéb szintetikus betegség lefolyást módosító szereket (sDMARD) vagy biológiai DMARD-okat alkalmaztak.

Az új koncepció szerint az MDR—ABC transzporterek biomarkerek. Az immunfolyamatokban és a multidrog rezisztenciában betöltött szerepük gyorsan fejlődő kutatási terület. Feltételezhetően egy komplex, biomarkerekből álló panel részeként lesznek felhasználva a prognosztikai értékeléshez, betegség aktivitás monitorozásához vagy bizonyos gyógyszerek hatásának előrejelzéséhez (pl. immunszuppresszív kezelések vagy kemoterápia rosszindulatú daganatok esetén). Az MDR—ABC transzporter aktivitás klinikai döntésekbe és kezelési rendbe történő átültetéséhez azonban jól meghatározott normál referencia és kóros aktivitási értékekre van szükség.

Ez az értekezés azt vizsgálja, hogy az új tudományos eredmények fényében hogyan alkalmazhatóak az MDR—ABC transzporterek prediktív biomarkerekként a reumatoid arthritiszben (RA).

A multidrog-rezisztencia-fehérje 1 (MDR1), a multidrog rezisztencia-asszociált fehérje 1 (MRP1) és az emlőrák-

rezisztencia fehérje (BCRP) transzporterek szerepére összpontosítottunk reumatoid artritiszben.

1.1. Reumatoid artritisz

Az RA az egyik leggyakoribb krónikus gyulladással autoimmun betegség, amely a világ népességének körülbelül 0,5–1% -át érinti. Az RA a nők körében gyakoribb, és gyakran az élet 5. évtizedében alakul ki. A betegséget az immunrendszer túlaktiválása és időben előrehaladó ízületi roncsolódás jellemzi. A tartós ízületi gyulladás végül ízületi és csontfejlődési torzulásokat eredményez, amely mozgáskorlátozottsághoz vezet, ezáltal drasztikusan rontva a beteg életminőségét. A széles körben fellépő gyulladás következtében más szervek és szövetek, például a szív, a tüdő és az erek is károsodnak.

Az elmúlt 20 évben drasztikus javulásokat sikerült elérni az RA kezelésében számos új szintetikus és biológiai DMARD alkalmazásával, például tumor nekrosis faktor (TNF) ellenes antitestek (pl. adalimumab, certolizumab pegol, etanercept) és T-sejt gátlók alkalmazásával (pl. abatacept). Fontos, hogy a DMARD-okkal történő korai beavatkozás fenntartja az érintett ízületek hosszú távú funkcionális aktivitását, megakadályozva a szövetkárosodást.

Számos tanulmány vizsgálta az MDR fehérjék lehetséges szerepét az autoimmun rendellenességekben, mint az RA, a betegség aktivitása, a terápiás válaszreakció és a progresszió (kimenetel) közti összefüggésre koncentrálva. Az MDR fehérje expresszió korrelálhat az RA betegség aktivitásával, valamint a metotrexátra és más DMARD kezelésre adott válaszokkal. Nagyon kevés adat állt rendelkezésre az MDR–ABC transzporterek aktivitása és a biológiai terápiára adott válaszok közti lehetséges összefüggésekről.

1.2. A biomarkerek iránti igény az RA betegség kezelésében

Az RA kezelése nagyon költséges és komoly kihívást jelentő folyamat a betegek jelentős részénél.

2018-ban az Egyesült Államokban a RA átlagos közvetlen kezelési költsége szintetikus DMARD-ok esetében 12,509 USD / év, biológiai DMARD-ok esetében pedig 36,503 USD / év volt. A metotrexátot, más szintetikus DMARD-okat és számos új biológiai DMARD-ot alkalmaznak monoterápiában vagy kombinációban. Az újgenerációs gyógyszerek ellenére továbbra is komoly kielégítetlen terápiás igénnyel kell számolni az RA kezelésében.

Az RA prognózisa nagyon változó lehet, sok esetben gyors mozgáskorlátozottsághoz vezet.

Az RA kezelésének közelmúltbeli fejlődés ellenére, valamennyi jelenlegi terápia alacsony sikerrátával (metotrexát: 50%, sDMARDS: 75%, bDMARDS: 50%) és súlyos mellékhatásokkal jár, különösen akkor, ha az első kezelés megkezdése késlekedik. A gyógyszerek hatékonyságának előrejelzésére és a terápia közötti választáshoz nem áll rendelkezésre prediktív biomarker. Szintén nem érhető el olyan jó betegségaktivitási marker, amely a gyógyszeres kezelésre adott válaszreakciót kimutatná és korai támpontot adna a terápia esetleges megváltoztatásához.

2. Célkitűzések

Az MDR—ABC transzporterek fontosságáról az RA-ban széleskörű irodalom érhető el. Azonban, az hogy az MDR—ABC transzporterek aktivitása prediktív értéket képviselhet a biológiai terápia esetében, még nem került megállapításra. A projekt célja az MDR—ABC transzporter aktivitás vizsgálata volt normál populációban és RA betegeknel valamit prediktív biomarkerként történő bevezetése a biológiai terápiaiban.

Vizsgáltuk:

1. Három klinikailag releváns transzporter, az MDR1, az MRP1 és a BCRP aktivitását egészséges önkéntesek

CD3+limfocitáiban a normál referenciaértékek meghatározása érdekében.

2. A nem és az életkor hatását a referenciaként meghatározott transzporter aktivitási értékekre.
3. Változik-e az RA-betegek CD3+ és CD19+ limfocitáin mért MDR1, MRP1 és BCRP aktivitás a biológiai terápia során?
4. Hogyan alkalmazható a transzporter aktivitás a terápiás válasz prediktív eszközeként a biológiai terápia megkezdése előtt, valamint 4–6 és 12 hét után?

3. Anyagok és módszerek

A tézis két klinikai vizsgálatot tárgyal.

Az első, normál referencia tartomány vizsgálatba 120 egészséges önkéntest vontunk be az MDR–ABC transzporterek CD3+ perifériás vér mononukleáris sejteken (PBMC) mért aktivitásának normál referenciaértékeinek leírására. Meghatároztuk a nem és az életkor hatásait is.

A normál referenciaértékek felhasználásával, egy második vizsgálatban, 39 RA betegnél meghatároztuk az MDR1, MRP1 és BCRP aktivitás prediktív értékét a terápiára adott válaszra. CD3+ és CD19+ PBMC-n mérve a biológiai terápia

megkezdése előtt, valamint 4–6 és 12 héttel azután. Kontrollként bevontunk 35 egészséges önkéntest.

A mérésekhez a MultidrugQuant™ Kitet használtuk. Ebben az áramlási citometriás vizsgálatban a fluoreszcens riporter szubsztrátok (calcein-AM az MDR1 és MRP1, illetve a mitoxantron a BCRP esetében) a citoplazmába jutnak, és az MDR fehérjék pumpálják ki őket, specifikus inhibitorok jelenlététől vagy hiányától függően (verapamil MDR1 és MRP1 esetén), indometacin az MRP1-hez és a KO134 a BCRP-hez), lehetővé téve az MDR aktivitási faktor (MAF) kvantitatív, standardizált meghatározását. A multidrug transzporterek aktivitását tükrözi a szelektív inhibitor (ok) jelenlétében vagy hiányában felhalmozódott calcein / mitoxantron mennyisége közötti különbség. A MAF értékek kiszámításakor ezt a felhalmozódási különbséget normalizáljuk az inhibitor jelenlétében mért festékfelvételhez. Így a teszt eredménye független lesz a calcein sejtfelhalmozódását befolyásoló tényezőktől, kivéve a multidrug transzporterek aktivitását. A MAFC az MDR1 és MRP1 transzporterek összetett aktivitási értéke.

A megfelelő tájékoztatás után minden résztvevő beleegyezett a vizsgálatok elvégzésébe. Vizsgálatainkat az intézmények független etikai bizottsága hagyta jóvá.

4. Eredmények

A normál referenciaérték-vizsgálat eredményeink azt mutatják, hogy az MRP1 MAF értéke 2,5 [0,0 - 12,5] (medián [2,5 - 97,5 percentilis]), és független az életkortól. A BCRP MAF értéke 3,4 [0,0 - 22,0], és szintén az életkortól független. Másrészt a MAFC és MDR1 MAF negatív összefüggést mutat a vizsgált alanyok életkorával. Az MDR1 MAF értéke 12,9 [0,0 - 25,7], a MAFC értéke 16,5 [0,0 - 32,0]. Az MDR1 aktivitás nagymértékben hozzájárul a MAFC értékéhez, és ezért valószínűleg komoly szerepet játszik az életkorral való hasonló összefüggésért.

A négy MAF-érték egyikében sem észleltünk különbséget a férfiak és a nők között. A betegek neme nem befolyásolja a MAF értékek és az életkor közötti összefüggés jelenlétét vagy hiányát.

A prediktív biomarker értékelési vizsgálatban a 28 ízületen vizsgált betegség aktivitási pontszám (DAS28) értéke csökkent

a kezelést követően a terápiára reagáló, szemben a terápiarezisztens csoporttal. Megjegyzendő, hogy a kezdeti DAS28 értékek magasabbak voltak a terápiára reagáló csoportban, mint a rezisztens csoportban. A C-reaktív fehérje (CRP) kezdeti értékében nem volt észlelhető különbség a két csoport között, és a kezelés során sem volt kimutatható változás a CRP értékekben. A CD3+ sejtekben az MRP1 MAF-értéke magasabb volt a 12. héten a terápiarezisztens csoportban a kontrollokhoz képest. A kontroll és az RA betegek között más statisztikailag szignifikáns különbség nem volt megfigyelhető a MAF-értékekben. A kontrollértékek a korábbi tanulmányunkban megállapított referencia tartományon belül voltak. A terápia kezdetén a CD3+ sejtek MAFC és MAFMDR értékei magasabbak voltak a rezisztens, mint a terápiára reagáló csoportban. A 6. héten a CD3+ sejtek MAFC, MAFMRP és MAFMDR értékei, valamint a CD19+ sejtek MAFMRP értékei magasabbak voltak a rezisztens, mint a terápiára reagáló csoportban. A kezelés előrehaladtával a RA betegcsoportokban nem volt szignifikáns változást a MAF értékekben. CD3+ vagy CD19+ sejtekben a MAFBCRP értékek nem mutattak különbséget a rezisztens és a terápiára reagáló csoport között. Vevőegység operációs karakterisztikus görbe (receiver operating characteristics, ROC) elemzéssel

határoztuk meg a MAF aktivitás prediktív értékét a kezelésre adott válaszra. Az elemzést a biológiai terápia kezdetén és 6 hét után végeztük el. A MAF aktivitás küszöbértékeit szintén ROC elemzéssel határoztuk meg, megfelelő szignifikancia szint (p) és görbe alatti terület (AUC) értékek mellett. Azok a betegek, akiknek MAF-értéke meghaladja a megfelelő küszöbértéket, feltételezhetően terápia rezisztensek lesznek.

CD3+ küszöbértékek:

0. hétnél MAFC = 21,3 ($p = 0,043$, AUC = 0,68)

6. héten MAFC = 20,3 ($p = 0,033$, AUC = 0,72)

6. héten MAFMRP = 6,0 ($p = 0,049$, AUC = 0,69)

6. héten MAFMDR = 13,9 ($p = 0,048$, AUC = 0,70)

5. A dolgozat új eredményei

- I. Meghatároztuk a referencia MAF értékeket CD3+ limfocitákon normál populációban. Ezáltal alapot szolgáltatva a különböző betegségekben tapasztalható kóros transzporter aktivitás összehasonlításához.
- II. A MAFMDR és származéka, a MAFC az életkor előrehaladtával csökken. Ezt az MDR1 szubsztrát gyógyszerek alkalmazásakor figyelembe kell venni.
- III. Nincs összefüggés a nem és a MAF érték között.

IV. A terápia megkezdése előtt a CD3+ sejteken a MAFC és a MAFMDR értékek magasabbak voltak az antireumatikus biológiai terápiára rezisztens betegeknél, mint a terápiára reagáló betegeknél. Így prediktív értékkel bír a biológiai kezelés indításakor.

V. A biológiai kezelés 4. és 6. hetében a CD3+ sejteken mért MAFC, MAFMRP és MAFMDR értékek, valamint a CD19+ sejteken mért MAFMRP értékek magasabbak voltak az antireumatikus biológiai terápiára rezisztens betegeknél, mint a terápiára reagáló betegeknél. Így prediktív értékkel bír a biológiai kezelés során.

6. Összefoglalás

Eredményeinket összefoglalva azt láthatjuk, hogy az RA betegek CD3+ sejtjein mért MAFC érték prediktív erővel bír a biológiai terápia megkezdése előtt annak megállapítására, hogy a beteg megfelelő terápiás választ fog-e mutatni. A kezelés megkezdése utáni 4. és 6. héten, CD3+ sejteken mért MAFC, MAFMRP és MAFMDR értékek tovább javítják az előrejelzés pontosságát, hogy várható-e megfelelő terápiás válasz.

Az MDR-ABC transzporterek standardizált, funkcionális aktivitásának meghatározása áramlási citometriás módszerrel

megvalósítható. Meghatároztuk az egészséges populáció MAF értékeinek normál tartományát, és meghatároztuk a küszöbértékeket a biológiai terápiára reagáló és rezisztens csoportok között.

Eredményeink lehetővé teszik új áramlási citometrián alapuló prediktív eszközök kifejlesztését rheumatoid arthritisben.

7. Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények

- I. Szerémy P, Tauberné Jakab K, Baráth S, Apjok A, Filkor K, Holló Z, Márki- Zay J, Kappelmayer J, Sipka S, Krajcsi P, Toldi G. Determination of Reference Values of MDR-ABC Transporter Activities in CD3+ Lymphocytes of Healthy Volunteers Using a Flow Cytometry Based Method. *Cytometry B Clin Cytom.* 2019 Nov;96(6):469-474. doi: 10.1002/cyto.b.21729.

- II. Toldi G, Batel P, Baráth S, Szerémy P, Apjok A, Filkor K, Szántó S, Szűcs G, Szamosi S, Häupl T, Grützkau A, Szekanecz Z. Peripheral Lymphocyte Multidrug Resistance Activity as a Predictive Tool of Biological Therapeutic Response in Rheumatoid Arthritis. *J*

Rheumatol. 2019 Jun;46(6):572-578. doi:
10.3899/jrheum.180793.

Az értekezés témájához kapcsolódó szabadalom:

III. Toldi G, Filkor K, Szerémy P, Apjok A, Szekanecz Z
Assessing Responsiveness of Rheumatoid Arthritis
Patients to Biological Treatment. Patent No:
EP3570028A1

Elsőbbségi dátum: 2018.05.15

8. Finanszírozás

- A kutatást a Magyar Nemzeti Kutatási és Technológiai Hivatal támogatta: TECH08-A1- IVDMDQ08
Időszak: 60 hónap (2008.09.01.-2013.08.31.)
Projektvezető: Dr. Hollo Zsolt / Dr. Apjok András
- Szerémy Péter 2013-ban az SZTE Orvostudományi Egyetemen predoktori ösztöndíjban részesült.
- Szerémy Péter a Solvo Biotechnológiai Zrt. és az MDQuest Kft. alkalmazottja volt.

9. Köszönetnyilvánítás

Mindenek előtt szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Krajcsi Péternek az elmúlt 16 évben, a transzporteres tanulmányaim során nyújtott, útmutatásáért és tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani Tauberné Jakab Katalinnak, Márki-Zay Jánosnak, Apjok Andrásnak, Kecskeméti Boros Szilviának és Toldi Gergelynek a rengeteg munkáért, amelynek eredményeit én használhattam fel ebben a disszertációban.

Köszönet a Solvo és az MDQuest csapatának a sok segítségért amit kaptam és a jó hangulatért.

Végül szeretném megköszönni a családomnak, hogy kitartottak, amíg elkészült ez a dolgozat.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Toldi Gergely** (felelős társszerző) kijelentem, hogy

Szerémy Péter Gábor (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott -
közösön publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak
meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat
megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja
felhasználni.

2021. 02. 08.

dátum



.....
szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösön publikált közlemények:

Toldi G, Batel P, Baráth S, Szerémy P, Apjok A, Filkor K, Szántó S, Szűcs G, Szamosi S, Häupl T, Grützkau A, Szekanecz Z. Peripheral Lymphocyte Multidrug Resistance Activity as a Predictive Tool of Biological Therapeutic Response in Rheumatoid Arthritis. *J Rheumatol.* 2019 Jun;46(6):572-578. doi: 10.3899/jrheum.180793. Epub 2019 Feb 1. PMID: 30709954.

Szabadalom:

Toldi G, Filkor K, Szerémy P, Apjok A, Szekanecz Z Assessing Responsiveness of Rheumatoid Arthritis Patients to Biological Treatment.

Patent No: EP3570028A1 Priority Data: 15.05.2018