

# Kis molekulás NADPH-oxidáz 4 inhibitorok azonosítása és karakterizálása az oxidatív stressz kivédésére

Doktori tézisek

**Borbély Gábor**

Semmelweis Egyetem  
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Dr. Kéri György egyetemi tanár, az MTA doktora

Hivatalos bírálók:

Dr. Tretter László, egyetemi tanár, az MTA doktora

Dr. Venekei István, egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Török Tamás egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Kecskeméti Valéria egyetemi tanár, M.D., Ph.D.

Tömösköziné dr. Farkas Rita, Ph.D.

Budapest  
2012

## 1. Bevezetés

Nagyon sokáig úgy gondolták, hogy a reaktív oxigén származékok (ROS), fiziológiás körülmények között kizárólag a normál aerob metabolizmus melléktermékeiként jelennek meg a mitokondrium, a mikroszómális elektron-transzport láncok, a fagocita sejtek és enzimszisztemek biológiai reakciói során. Reaktivitásuknak megfelelően olyan káros molekulákként tartották számon őket, melyek a szervezetben található makromolekulák irreverzibilis oxidatív sérülését okozzák, és felelőssé tehetőek többek között az öregedésért.

A nikotinamid-dinukleotid-foszfát-oxidázok (NADPH-oxidáz, NOX) voltak az elsőként azonosított olyan enzimek, melyeknek elsődleges funkciója a ROS termelése. Működésük során elektronokat transzportálnak biológiai membránokon keresztül. Az elektron akceptor az  $O_2$ , az elektron transzfer végterméke pedig szuperoxid. Jelenleg a NOX enzimszisztem hét tagot számlál: NOX1-5 valamint DUOX1 és DUOX2. Habár a NOX enzimszisztem minden tagja a molekuláris oxigén redukcióját katalizálja, az egyes izoenzimek különböznek szöveti megoszlásukban, alegység igényükben, domén struktúrájukban és aktiválódási mechanizmusukban.

A NOX4 enzim legnagyobb mennyiségben az endotél sejtekben, simaizom sejtekben, hematopoetikus őssejtekben, fibroblasztokban és a vesesejtekben expresszálódik. Míg a NOX enzimek többségének működéséhez a  $p22^{phox}$ , valamint aktiváló és szervező alegységek ( $p40^{phox}$  ill.  $p47^{phox}$  és  $p67^{phox}$  vagy azok homológjai NOXO1 és NOXA1) jelenléte szükséges, a NOX4 olyan sejtekben is aktív, melyek

nem expresszálják az utóbbi faktorokat. Jelenlegi ismereteink szerint a NOX4 kizárólag egy alegység (p22<sup>phox</sup>) jelenlétét igényli, és azzal komplexet alkotva minden további aktiváló mechanizmus nélkül konstitutívan aktív.

A NOX enzimek felfedezésével, az utóbbi évtizedek kutatásai rávilágítottak, hogy a ROS-nak olyan alapvető sejtfunciók biztosításában van kiemelkedő szerepe, mint a normális sejt működés szabályozása, a sejten belüli jelzések továbbítása és a sejtek osztódása vagy apoptózisa.

Aktivitásuk folytán a NOX enzimek egy „kétélű kardot” jelentenek a szervezet homeosztázisa szempontjából. Egyrészt olyan fiziológiás folyamatokban játszanak szerepet, mint az endotél funkció fenntartása és a vaszkuláris tónus szabályozása, a szervezet védelme, hormon bioszintézis, fertilizáció és a celluláris jelátvitel. Másrészt, a ROS relatív fölöslege (oxidatív stressz) számos a vesét, valamint szív- és érrendszert érintő patológiás folyamatban szerepel, beleértve az endotél diszfunkciót, magas vérnyomást, érlemezésedést, angiogenezist, fibrózist, extracelluláris mátrix depozíciót, gyulladást, hipertrofiát, kardiovaszkuláris és vese remodelinget és szívelégtelenséget.

A különböző NOX izoformák komplex expressziót mutatnak az érrendszer különböző sejtjeiben és régióiban. Habár a NOX1, NOX2 és a NOX5 egyaránt megtalálható az érrendotél sejtekben a NOX4 tűnik a leggyakoribb izoformának, és ennek expressziója korrelál leginkább a szív- és érrendszer teljes NADPH-oxidáz aktivitásával.

A NOX4 enzim szív- és érrendszeri megbetegedésekben betöltött szerepe iránt hatalmas az érdeklődés. Az antioxidánsok hatásfoka

arányosan csökken a ROS koncentráció növekedésével, ezért alkalmazásuk kevésbé eredményes olyan patológiás folyamatok esetében, ahol a NOX4 enzim túlműködése figyelhető meg. A tudományos irodalom, különösen a NOX4 deficiens egereken végzett tanulmányok alapján egyre világosabb, hogy a NOX4 enzim gátlása, egy ígéretes farmakológiai koncepció az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek kezelésére. Mindezek eredményeként, az elmúlt évtized során, egyre inkább megnőtt az igény a specifikus NOX inhibitorok azonosítására, egyrészt a lehetséges terápiás alkalmazásuk miatt, másrészt mert egy tökéletes eszközt jelentené az enzimfunkció pontosabb megismerésében.

Az eddig leírt inhibitorok vagy nem közvetlenül az enzimet blokkolják (az aktivitáshoz vezető jelátvitellel interferálnak valamilyen módon), vagy mint antioxidánsok, gyökfogók hatnak, mint a szuperoxid dizmutáz (SOD) és a peroxidáz mimetikumok vagy az N-acetil cisztein. Más molekulák ugyan direkt módon az oxidáz komplexre hatnak, de blokkolják mindazon enzimrendszerek működését is, melyek azonos struktúrájú kötőhelyekkel rendelkeznek (többek között citokróm P-450, mitokondriális elektron-transzport lánc, nitrogén-monoxid szintáz). Az elektrononorként szereplő NADPH mennyiségét csökkentő vegyületek, pl. a pentóz-foszfát útvonal gátlói, végső soron szintén NOX gátlást eredményeznek.

A nem specifikus NOX inhibitorok alkalmazása esetén a szervezet összes NOX izoformájának gátlásával, nem kívánt események egész sorával kell számolnunk. Aggodalomra adhat okot a NOX inhibitorok használata emberekben, hisz a NOX2 funkciójának teljes elvesztése

krónikus granulomatózis betegségben (CGD) az immunrendszer alulműködése révén, a kórokozók fertőzésével szembeni ellenállás csökkenésével jár. Azoknál a CGD-ben szenvedő betegeknél, akiknél a neutrofil sejtek 5-10%-a képes a ROS termelésre, nem figyelhetőek meg súlyos tünetek. Mindez azt sugallja, hogy megfelelő mozgástér áll rendelkezésre a NOX enzimek által megnövekedett ROS termelés gátlására.

Jelenleg egyetlen specifikus NOX4 inhibitor sem áll készen a biokémiai és/vagy klinikai felhasználásra. Az *in vitro* kísérletekben legelterjedtebben használt difenil-jodónium (DPI) ugyan hatékony, de nem specifikus és toxikus. A növényi eredetű apocynin, mely állati modellekben szintén hatékonyan bizonyult olyan oxidatív stressz eredetű tünetek csökkentésében, mint a hipertenzió, atheroszklerózis és stroke, ugyan nem toxikus, de a NOX enzimekre gyakorolt gátló hatása eddig még nem bizonyított megfelelő módon. Mivel az enzim működésének megismerése szempontjából az elmúlt évtizedek kutatásainak eredményeként a kialakult kép komplexitása csak nőtt, talán még sürgetőbb az új, szelektív NOX4 inhibitorok felfedezése és kifejlesztése.

## 2. Célkitűzések

Munkánk során a kémikus partnerekkel együttműködve, kis-molekulás NOX4 gátló hatóanyagok oxidatív stressz eredetű megbetegedések ellen történő kifejlesztését, és hatástani karakterizálását tűztük ki célul. A fentieknek megfelelően, a következő stratégiát állítottuk össze:

- A NOX4 gátló vegyületek azonosítására egy egyszerű, de hatékony sejtes alapú rendszer beállítása, majd a ROS termelés dóziszfüggő gátlásának mérése alapján történő vezérmolekula optimalizáció.
- A sejtes rendszerben hatékony NOX4 inhibitorok dózis-függő gátlásának tesztelése biokémiai assay-ben.
- A hibásan azonosított vezérmolekulák kiszűrése és a NOX4 gátlás specifikitásának ellenőrzése.
- Szerkezet-aktivitás összefüggés felállítása.
- Az ígéretes molekulák korai ADME(T) paramétereinek vizsgálata.

### 3. Módszerek

- *Vizsgált vegyületek*: a vegyülettár 108 alapváz köré tervezett, összesen több mint 1000 molekulából állt. Tisztasági kritériumuk nagyobb, mint 98%, melyet NMR, LC-MS és analitikai HPLC módszerekkel igazoltak.

- *Sejtvonalak*: 293 FS (vese sejtek), EA.hy926 (érendotél sejtek).

- *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Tyr/LPO sejttes assay*: a NOX4 enzimet overexpresszáló 293 FS sejteket H-médiumban szuszpendáltuk ( $5 \times 10^5$  sejt/ml), majd 384 lukú mikrotálcán 30 percig inkubáltuk a tesztelendő vegyületek jelenlétében. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kimutatásához 1 mM tirozint és 1 µg/ml laktoperoxidázt (LPO) tartalmazó H-médium oldatot adtunk a lyukakba, és a fluoreszcenciát fél óras inkubációt követően határoztuk meg (excitáció: 330±40 nm, emisszió: 405±10 nm).

- *SDS-PAGE és Western blot*: a mintákat 10% akrilamid koncentrációjú gélen választottuk el, 90V-on. A fehérjéket a gélről PVDF vagy nitrocellulóz membránra blottoltuk 1 órán keresztül (400 mA). A membrán nem specifikus kötőhelyeinek blokkolására 5%-os BSA-t és 0,1% Tween 20-at tartalmazó TBS-t használtunk, majd anti-NOX4 vagy anti-p22<sup>phox</sup> antitesttel inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A tormaperoxidázhoz (HRP) kapcsolt anti-nyúl IgG-t az elsődleges antitesthez kötöttük, végül ECL Advanced Western Blotting Detection kit protokollja szerint detektáltuk a jelölt fehérjéket.

- *Amplex Red assay*: a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mennyiségének kimutatása 50 µM Amplex Red reagenst és 0,1 U/ml HRP-t tartalmazó H-médium vagy KRPG

oldat felhasználásával történt. A 30 perces inkubációs idő elteltével a rezofurin fluoreszcenciát 590 nm-en detektáltuk.

- *Immunhisztokémia:* 24 lyukú szövettenyésztő edényekben, fedőlemezekben tenyésztett sejteket ( $5 \times 10^4$  sejt/well) 10 percig fixáltuk, illetve permeabilizáltuk PETMF-ben, majd háromszori mosást követően elsődleges antitestekkel inkubáltuk 5% BSA tartalmú PBS-ben. Ismét háromszor mostuk PBS-sel, majd Cy3 konjugált másodlagos antitestekkel inkubáltuk 5% BSA tartalmú PBS-ben. Hoechst 33342-t használtunk az elsődleges antitestekkel a sejtmag festésére.

- *Konfokális lézer pásztázó mikroszkópos mérések:* a mintákról 'Zeiss LSM 510 META' konfokális lézer pásztázó mikroszkóppal készítettük a felvételeket. A Cy3 fluoreszcens festéket a He-Ne lézer 543 nm-es hullámhosszával gerjesztettük, emisszióját egy 560 nm-es longpass szűrőn keresztül detektáltuk. A Hoechst 33342 fluoreszcens festéket higanygőz lámpa UV emissziójával gerjesztettük 405 nm-en. Emisszióját egy 420-480 nm-es BP sávszűrőn keresztül detektáltuk. A gerjesztő és emittált fotonokat egy 405/488/543 nm háromszoros dikroikus szűrővel választottuk el.

- *EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának preparálása:* az EA.hy926 sejteket 260 g fordulaton centrifugáltuk és a pelletet tízszeres térfogatban, hipotóniás pufferben (NB) szuszpendáltuk, majd 20 percig inkubáltuk jégen. Ezt követően a sejteket Dounce homogenizátorral tártuk fel, mikroszkóppal ellenőrizve a folyamatot. A lizátumot 30%-os szacharóz oldatra rétegeztük, majd 800 g fordulaton centrifugáltuk. A



pelletet ismét NB-ben szuszpendáltuk fel és a nagyobb tisztaság érdekében az utolsó lépést megismételtük.

- *Biokémiai assay*: 384 lyukú mikrotiter lemez lyukaiba 10-10  $\mu\text{M}$  tesztelendő vegyületet mértünk, majd KRPG pufferben szuszpendált sejtmagokat adtunk hozzá ( $1,5 \times 10^4$  sejtmag/ well). A kimutatási reakcióhoz 25 mM NADPH, 20 mM FAD, 100  $\mu\text{M}$  Amplex Red és 0,2 U/ml HRP enzimet tartalmazó KRPG oldatot adtunk minden lyukba. Fél óra inkubációt követően, a fluoreszcenciát 590 nm-en határoztuk meg.

- *Lumineszcens sejt viabilitás vizsgálat és MTT vizsgálat*: a sejteket különböző inhibitorokkal kezeltük 10  $\mu\text{M}$  végkoncentrációban, 72 órán keresztül. Életképességüket a lumineszcens sejtviabilitás assay esetében, a 'CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay' kit segítségével határoztuk meg a gyártó leírásának megfelelően. Az MTT assay esetében a sejtekhez 5 mg/ml MTT oldatot adtunk, majd a 2 óra inkubációt követően a formazán kristályokat MTT oldószerben feloldva, 650 nm-en detektáltuk a jelet.

- *Áramlási citometria*: a sejteket az inhibitorok 1 és 10  $\mu\text{M}$  koncentrációjával kezeltük 72 órán keresztül, majd tripszines kezelést és centrifugálást követően a pelletet 70%-os etanolban szuszpendáltuk. A citometriás méréshez a sejteket lecentrifugáltuk, az alkoholt leöntöttük róluk, és 0,5 mg/ml ribonukleázzal kiegészített 200 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7,8) oldatban szuszpendáltuk. 20 perc inkubációt követően 50  $\mu\text{g/ml}$  propidium jodiddal festettük meg a DNS-t, majd áramlási citométerben vizsgáltuk a mintákat. Az eredményeket a WinList 32 szoftver segítségével értékeltük ki.

- *IMAP assay*: 384-lyukú mikrotiter lemez lyukaiba tesztelendő vegyületeket mértünk 14  $\mu\text{M}$  koncentrációban, majd kináz szubsztrátot (100 nM 5FAM-GRTGRRNSI-NH<sub>2</sub> vagy 400 nM 5FAM-IPTTPITTTYFFFK-NH<sub>2</sub>), ATP-t és 4 nM kinázt tartalmazó kináz puffert adtunk hozzá és 1 órán keresztül inkubáltuk. A kimutatást 'IMAP<sup>TM</sup> Evaluation' kit (Molecular Devices) felhasználásával végeztük, a gyártói leírásainak megfelelően. Az fluoreszcens jel detektálása fél óra inkubációs idő után történt (excitáció: 458 $\pm$ 30 nm, emisszió: 530 $\pm$ 25 nm).

- *NOX2 assay*: a humán neutrofil sejteket egészséges önkéntesek vénás keringéséből nyertük. A mintákat dextransz sedimentációval és Ficoll-Paque gradiens centrifugálásnak vetettük alá. Ezt követte a megmaradó eritrociták hipotóniás lízise. A sejteket szobahőmérsékleten tartottuk Ca<sup>2+</sup>- és Mg<sup>2+</sup>-mentes médiumban további felhasználásig, és 37°C-ra melegítettük az aktiváció előtt.

Immunkomplex-szel történő aktiválás esetében a mérések során a 384 lyukú mikrotiter lemez felületét 20  $\mu\text{g/ml}$  humán szérum albuminnal (HSA) kezeltük, blokkoltuk (10% FBS), majd HSA antitesttel inkubáltuk. A kezelést 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>-vel és 10 mM MgCl<sub>2</sub>-vel kiegészített HBSS oldatban végeztük.

Forbol-mirisztoil-acetát (PMA) aktiválás esetében, a mikrotiter lemez felületének 10% FBS-el történő blokkolását követően, a sejteket 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>-vel és 10 mM MgCl<sub>2</sub>-vel kiegészített, HBSS-ben oldott PMA-val (100 nM) aktiváltuk. A kísérletek során a neutrofil granulocitákat különböző inhibitorok 1 vagy 10  $\mu\text{M}$  koncentrációjú oldatával inkubáltuk 20 percen keresztül. A szuperoxid termelést citokróm c

(100  $\mu\text{M}$ ) redukciós teszttel detektáltuk, 550 nm és 540 nm hullámhosszokon mérve az abszorbanciát.

- *Permeabilitás vizsgálat:* a minták 5 mM-os, tömény DMSO-ban feloldott törzsoldatát PBS pufferben hígítottuk a kívánt 200  $\mu\text{M}$  eléréséig. Az így kapott oldatokkal végeztük a permeabilitási vizsgálatokat. A méréseket BD Gentest 96 lyukú PAMPA mikrotiter lemez felhasználásával végeztük a gyártó ajánlásainak figyelembevételével. Az akceptor lemez (200  $\mu\text{l}$  minta) donor mikrotiter lemezbe (300  $\mu\text{l}$  minta) való helyezését követően 5 órás inokubáció következett. Az oldatok abszorbanciájának detektálása UV/VIS spektrofotometriával történt.

#### **4. Eredmények**

Munkánk során a NOX4 enzim gátlására, új típusú kis-molekulás inhibitorokat azonosítottunk és fejlesztettünk a napjainkban már széles körben elfogadott racionális hatóanyag tervezés nyújtotta lehetőségeket felhasználva.

- Első lépésként egy sejtes alapú assay, közepes áteresztőképességű szűrés (MTS) kompatibilis rendszerré alakítását, és a kémiai partnercsoport által rendelkezésünkre bocsájtott vegyülettár hatástani vizsgálatát végeztük el. Az LPO által katalizált kimutatási reakcióban a ditirozin képzéssel közvetett módon detektálható a NOX4 enzim által termelt  $\text{H}_2\text{O}_2$  mennyisége. A megfelelően előkészített sejteket a kémiai partnercsoport által kifejlesztett szerves kismolekulákkal kezelve, a

NOX4 enzim működését mértük. Az egy pontos (10 $\mu$ M) tesztelések során, a vizsgált 1100 vegyületből 68 molekulát választottunk ki, melyeket kiemelkedő hatékonyságuk folytán tovább vizsgáltunk. Az IC<sub>50</sub> értékek meghatározását követően jutottunk el azokhoz a molekulákhoz, melyek az irodalom alapján is maximálisan elfogadható 2  $\mu$ M alatti IC<sub>50</sub> értékekkel rendelkeztek és a további vizsgálataink tárgyát képezték.

- Munkánk második felében szeretnénk volna további ún. keresztszűrésekkel validálni a kiválasztott vegyületek hatékonyságát. A hatékony molekulák sejtek életképességére gyakorolt hatásának vizsgálata egyrészt a korai ADME(T) karakterizálás szempontjából jelentős, mivel így képet kaphatunk arról, hogy mely molekulák képesek a sejtek metabolikus aktivitásának módosítására. Másrészt, a korábban elvégzett MTS vizsgálatban esetlegesen hibásan célmolekulaként azonosított vegyületek további felesleges vizsgálatát segít megelőzni. A vegyületek sejtes assay-ben történő tesztelésével párhuzamosan illetve azt követően, egy további szűrési lépést is beiktattunk a vegyületek életképességére, és proliferációra gyakorolt hatásának vizsgálatára. A hatékony molekulák mindegyikét MTT assay, lumineszcens viabilitás assay és FACS módszerekkel vizsgáltuk. A három életképességet vizsgáló módszerrel összesen 16 olyan molekulát azonosítottunk, melyek a NOX4 enzimen mért IC<sub>50</sub> értékeiknél jóval magasabb, egy nagyságrendet meghaladó koncentrációban mutattak csak életképesség gátlást. Arra a következtetésre jutottunk, hogy a hatékony vegyületek keresése során alkalmazott kísérleti paraméterek (40 perc inkubációs idő, 0,15  $\mu$ M - 10  $\mu$ M koncentráció) mellett a

vegyületek antiproliferatív, esetleg toxikus hatása nem érvényesülhetett, legalábbis olyan mértékben, hogy kétségbe kéne vonnunk a mérési eredményeket. Ugyanakkor a későbbi fejlesztéseknél mindenképpen érdemes figyelembe venni a molekuláknak ezen tulajdonságait is.

- Tudomásunk szerint nem ismert olyan jelátviteli mechanizmus, mely a NOX4 enzim működését „upstream” foszforiláció révén gátolná. A vizsgált vegyülettár egyes vegyületeinek bizonyított, és több helyen leírt kináz gátló tulajdonságai folytán azonban mindenképpen szeretnénk volna kizárni annak a lehetőségét, hogy az inhibitorok valamilyen más célmolekulán hatva okozzák a NOX4 enzim aktivitásának csökkenését. Erre a célra egy biokémiai assay beállítását találtuk a legmegfelelőbbnek. Hogy ez kivitelezhetővé váljon, megvizsgáltuk mind a sejtes assay-ben használt vese epitél (293 FS), mind a NOX4 enzimet endogén módon termelő érendotél (EA.hy926) sejtvonal esetében a NOX4 enzim sejten belüli lokalizációját. Míg a transzfektált 293 FS sejtekben a NOX4 enzim diffúz eloszlást mutatott, addig az érendotél sejtekben a sejtmagban koncentrált. Az EA.hy926 sejtek sejtmag frakciójának használatán alapuló biokémiai tesztekben vizsgálva az inhibitorokat, 14 molekula még 10  $\mu$ M koncentrációban sem mutatott semmilyen aktivitást, míg újabb 11 molekulát a biokémiai assay-ben végzett  $IC_{50}$  értékek meghatározása után találtunk alacsony aktivitásúnak a további vizsgálatokhoz.

- Az eddigi kutatási eredményeink alapján, a kémiai partnersocporttal együttműködve szeretnénk volna megállapítani valamilyen közös szerkezeti sajátosságot, ami a hatékony molekulákra egyaránt jellemző.

Sajnos az aktív vegyületek szerkezeti sokfélesége miatt, a pontos szerkezet-aktivitás összefüggés megállapítása igen nehéz feladatnak bizonyult. A leginkább feltűnő tulajdonsága az eddig leírt molekuláknak a kiterjedt konjugált kettőskötés-rendszer, mely képes az elektroncserére. Ez a redox reakciókban ugyanúgy fontos jellemző, mint a ROS termelésben. Tekintve, hogy a NOX4 enzim 3D szerkezete sem ismert, a gátló molekulák hatásmódjáról is csak feltételezések vonhatóak le. A hatásos molekulák strukturális diverzitása vagy egy nagy kötőzsebet feltételez, mely a molekulaszerkezetek széles spektrumával teszi lehetővé az interakciót, vagy diszkrét kötőhelyeket. Egy hasonlóan nagy kötőzsebet írtak le a citokróm P-450 enzimeknél is, amely szintén az aktivitáshoz elengedhetetlen hem csoportokat tartalmaz, és amellyel köztudottan nagyszámú molekula hat kölcsön, még távoli pozíciókból is.

- Neutrofil granulocitákon végzett sejtes vizsgálat keretében ellenőriztük a hatékony molekulák specifitását. A NOX4 enzimet hatékonyan gátló molekulák mindegyikét két koncentrációban (1  $\mu\text{M}$  és 10  $\mu\text{M}$ ) teszteltük, hogy megállapítsuk, gátolják-e a neutrofil granulociták NOX2 enzimének működését. Míg alacsony koncentrációban egyik sem, addig 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban, már 18 vegyület okozott 50%-ot meghaladó gátlást. A neutrofil granulocitákon végzett mérések eredményeként nem csupán arról szerettünk volna megbizonyosodni, hogy mennyire szelektívek az inhibitorok.

A ROS szintjének csökkentése a NOX enzimek gátlása nélkül is elérhető antioxidáns hatás révén. Mivel a NOX4 és NOX2 gátlás mérésének alapelve megegyezett, amennyiben egy vegyület mindkét

sejtes rendszerben aktívnak bizonyult, antioxidánsnak és/vagy nem szelektív vegyületnek tekintettük.

- A 11 legígéretesebb molekula esetében megvizsgáltunk két fontos korai ADME(T) paramétert, a lipofilitást és a permeabilitást. Míg a lipofilitás szempontjából a molekulák nagyobb része optimálisnak volt mondható, addig mindössze három molekula rendelkezett nagy permeabilitással. Mivel a PAMPA vizsgálat csak az anyagok passzív transzportjáról szolgáltat információkat, nem zárhatjuk ki annak a valószínűségét, hogy az alacsony permeabilitású molekulák is képesek bejutni a sejtbe valamilyen aktív transzport mechanizmussal. Sokkal valószínűbb azonban, hogy az enzim 293 FS sejtekben való diffúz megjelenése volt a meghatározó ebből a szempontból.

## **5. Következtetések**

➤ Egy korábban publikált sejtes alapú ROS detektálási módszer módosított változatát sikeresen alkalmaztuk a NOX4 enzimet gátló vegyületek azonosítására. Az szűrés során tesztelt vegyületek több mint 6%-a hatékonynak bizonyult. A NOX4 inhibitorok nagy száma tehát igazolta mind a kimutatási módszer megbízhatóságát, mind a közepes méretű, de diverz vegyülettárak tesztelésének koncepcióját.

➤ A sejtes vizsgálatokban aktív vegyületek nem a sejteken belül lejátszódó egyéb folyamatok, illetve célmolekulák gátlásán keresztül okozzák a ROS mennyiségének csökkenését. Ez a megállapítás arra alapozható, hogy a sejtfrakció alapú biokémiai tesztekben szintén jó

hatásfokú, egyértelműen NOX4 aktivitást gátló vegyületeket azonosítottunk.

➤ Az inhibitorok szelektívnek bizonyultak a NOX2 enzimmel szemben is, miközben nem mutattak jelentős életképesség csökkentő, illetve antioxidáns hatást. Mindezek alapján megállapíthatjuk, hogy alkalmasak a szelektív NOX4 gátlást igénylő kísérletekben való felhasználásra, és a jelenleg használt alacsony hatásfokú és/vagy nem szelektív NOX4 gátló vegyületek helyettesítésére.

➤ A rendelkezésre álló adatok alapján az egyes molekulacsaládok és a hatékony molekulák fiziko-kémiai sajátosságainak figyelembevételével felállítottunk egyfajta szerkezet-hatás összefüggést. Ezzel megadtuk a NOX4 enzimet gátló vegyületek szerkezet-keresésének lehetséges irányait.

➤ A korai ADME(T) paraméterek meghatározásával, akár gyógyszerfejlesztési szempontoknak is megfelelő vegyületeket szelektáltunk. Ennyi többszörösen tesztelt, és eltérő szerkezeti családokba tartozó hitmolekula közül jó eséllyel választható és fejleszthető szabadalomképes vegyület.

Mivel a különböző NOX izoformák és alegységek akár ugyanabban a sejtben is különböző szinten, és eltérő lokalizációval expresszálódnak, egyértelmű, hogy egyéni feladatuk van. Az ezirányú kutatások kapcsán egyre több alapvető kérdés merül fel. Az is tisztázásra vár többek között, hogy mi a NOX4 (vagy a többi NOX enzim) alapaktivitásának pontos funkciója, ill. hogy melyek azok a speciális molekuláris útvonalak, amelyeket az egyes izoformák céloznak. A szelektív NOX4 gátlók



alkalmazása segíthet ezek megválaszolásában, a NOX4 enzimfunkció, és a hidrogén-peroxid függő redox jelátvitel pontosabb megismerésén keresztül.

## 6. Közlemények

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- **Borbély G**, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, Baska F, Vántus T, Huszár M., Geiszt M, Hunyady L, Buday L, Örfi L and Kéri Gy. (2010) Small-Molecule Inhibitors of NADPH Oxidase 4, *J. Med. Chem.*, 53: 6758-6762. **IF: 5,207**

- Breza N, Pató J, Örfi L, Hegymegi-Barakonyi B, Bánhegyi P, Várkonyi E, **Borbély G**, Peták I and Kéri Gy. (2008) Synthesis and characterization of novel quinasoline type inhibitors for mutant and wild type EGFR and RICK kinases, *J. Rec. and Sign. Transd.*, 28: 361-373. **IF: 1,540**

- **Borbély G**, Huszár M., Varga A, Futosi K, Mócsai A, Örfi L, Idei M, Mandl J, Kéri Gy, Vántus T. (2012) Optimization of important early ADME(T) parameters of NADPH oxidase-4 inhibitor molecules. *Med. Chem.*, (megjelenés alatt), **IF: 1,603**

### Egyéb közlemények:

- Hegymegi-Barakonyi B, Székely R, Varga Z, Kiss R, **Borbély G**, Németh G, Bánhegyi P, Pató J, Greff Z, Horváth Z, Mészáros Gy, Marosfalvi J, Erős D, Szántai-Kis C, Garavaglia S, Perozzi S, Rizzi M,

Hafenbradl D, Ko M, Av-Gay M, Klebl BM, Órfi L, Kéri G. (2008) Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis*—early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Curr. Med. Chem.*, 15: 2760-2770. **IF: 4,823**

- Earle M, Seddon K, Gilea M, **Borbely G**, Gilmore B, Gorman S, McLaughlin M. (2010) Antimicrobial system, U.S. Patent Application Serial No. 12/937149.

## Összefoglalás

A tudományos irodalom, különösen a NOX4 deficiens egereken végzett tanulmányok alapján egyre világosabb, hogy a NOX4 enzim gátlása, egy ígéretes farmakológiai koncepció az oxidatív stresszel kapcsolatos betegségek kezelésére. Jelenleg egyetlen specifikus NOX4 inhibitor sem áll készen a biokémiai és/vagy klinikai felhasználásra. Munkánk során a NOX4 enzim gátlására, új típusú kis-molekulás inhibitorokat azonosítottunk és fejlesztettünk, a napjainkban már széles körben elfogadott racionális hatóanyag tervezés nyújtotta lehetőségeket felhasználva. Beállítottunk és több mérési paraméter figyelembevételével optimalizáltunk egy sejtes alapú mérési rendszert, melyben egy közepes átérésztőkéességű hatástani szűrés keretében közel 1100 molekulát vizsgáltunk a NOX4 enzim gátlás tekintetében. A NOX4 enzim érendotél (EA.hy926) sejtekben való kifejeződésének vizsgálatát követően a molekulák specifikitásának ellenőrzésére egy sejtfrakció alapú biokémiai assay-t állítottunk be, melyben meghatároztuk a hatékony vegyületek IC<sub>50</sub> értékeit, és kizártuk azokat, amelyek valószínűleg nem a NOX4 enzim gátlásán keresztül fejtik ki hatásukat. Hasonló céllal, a gátló vegyületek szelektivitását egy NOX2 enzim alapú sejtes rendszerben is vizsgáltuk. Ennek eredményeként nem csupán a NOX2 gátlókat (nem szelektív NOX4 gátlókat) azonosítottuk, de az antioxidáns vegyületeket is. Három életképességet vizsgáló módszerrel (lumineszcens sejtvitalitás-, MTT- és FACS assay), két sejtvonalon (293 FS és EA.hy926) teszteltük a vegyületek toxicitását és antiproliferatív hatását. A korai ADME(T) karakterizálás részeként megvizsgáltuk az egyes molekulák lipofilitását és penetrációs képességét. Végül, a rendelkezésre álló adatok alapján az egyes molekulacsaládok és a hatékony molekulák fiziko-kémiai sajátosságainak figyelembevételével felállítottunk egyfajta szerkezet-hatás összefüggést, mellyel megadtuk a NOX4 enzimet gátló vegyületek szerkezet-keresésének lehetséges irányait. Mindezek eredményeként olyan, alacsony (mikromoláris) koncentrációtartományban hatékony vegyületeket azonosítottunk, melyek segíthetnek a NOX4 enzim funkciójának, valamint oxidatív stressz eredetű betegségekben betöltött szerepének pontosabb megismerésében és kezelésében.

### Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

- **Borbély G.**, Szabadkai I, Horváth Z, Markó P, Varga Z, Breza N, Baska F, Vántus T, Huszár M., Geiszt M, Hunyady L, Buday L, Örfi L and Kéri Gy. (2010) Small-Molecule Inhibitors of NADPH Oxidase 4, *J. Med. Chem.*, 53: 6758-6762. **IF: 5,207**

- Breza N, Pató J, Örfi L, Hegymegi-Barakonyi B, Bánhegyi P, Várkonyi E, **Borbély G.**, Peták I and Kéri Gy. (2008) Synthesis and characterization of novel quinazoline type inhibitors for mutant and wild type EGFR and RICK kinases, *J. Rec. and Sign. Transd.*, 28: 361-373. **IF: 1,540**

- **Borbély G.**, Huszár M., Varga A, Futosi K, Mócsai A, Örfi L, Idei M, Mandl J, Kéri Gy, Vántus T, (2012) Optimization of important early ADME(T) parameters of NADPH oxidase-4 inhibitor molecules. *Med. Chem.*, (megjelenés alatt), **IF: 1,603**

