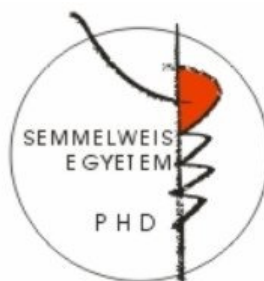


Mycobacterium tuberculosis jelátvitelt gátló hatóanyagok fejlesztése

Doktori tézisek

Székely Edina Rita

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Kéri György, egyetemi tanár, D.Sc.
- Hivatalos bírálók: Dr. Tóthfalusi László, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Bártfai Zoltán, egyetemi tanár, D.Sc.
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Török Tamás, egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Ádám Éva, egyetemi tanár, D.Sc.
Tömösköziné dr. Farkas Rita,
tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Budapest
2012

1 Bevezetés

A tuberkulózis (tbc) a világon az egyik legelterjedtebb betegség. A világ lakosságának megközelítőleg egyharmada fertőzött *Mycobacterium tuberculosis* patogén által és másodpercenként egy új egyénnel bővül ez a szám. Minden évben a Föld lakosságának kb. 1 %-a fertőződik meg tuberkulózis baktériummal és a fertőzöttek 10 %-ánál beszélhetünk aktív tuberkulózisról. Habár a fertőzött egyének jelentős része nem mutat betegsége utaló jeleket, az immunrendszer bármilyen okból bekövetkező legyengülése (fiziológiai stressz, HIV fertőzés, alultápláltság, terhesség) növeli az esélyt arra, hogy a mikobaktérium aktívvá váljon.

A tbc fertőzöttek számát 2010-ben 8,8 millióra becsülték és 1,45 millió halottat számoltak, nagy részüket Ázsiában és Afrikában. Ezen felül egyre több egyént regisztrálnak a fejlett országokban is, akiknél az immunrendszer legyengülésének köszönhetően következett be a fertőzés.

Magyarországon, az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet adatai szerint 1950-ben még több mint 45 000 új megbetegedésről számoltak be a tüdőbeteg-gondozók, ezzel szemben 2009-ben már csak 1448 új esetről. Míg akkor 490 új megbetegedés esett 100 000 lakosra, addig 2009-ben már csak 14,4. 2010-ben viszont 1811-re emelkedett a fertőzött egyének száma.

A normál tuberkulózis gyógyítható megbetegedés. A gyógyulás alapját a megfelelő kombinációban, megfelelő dózisban és a kellő ideig alkalmazott gyógyszeres kezelés jelenti.

A *M. tuberculosis* szövetekből történő eltávolítása a jelenleg alkalmazásban lévő négy első vonalbeli hatóanyag (rifampicin, izoniazid, pyrazinamid, ethambutol) kombinációjával elég hosszú és időigényes folyamat (min. 6 hónap), mely a beteg és a kezelést végző személyzet türelmét és szoros együttműködését igényli. A javasolttól eltérő, rendszertelen, a szükségesnél rövidebb ideig tartó és nem az előírt gyógyszereket alkalmazó kezelés a gyógyulás elmaradását, a betegség krónikussá válását, a betegség terjedését és gyógyszer-rezisztens törzsek kialakulását eredményezi. Mindezeknek a kiküszöbölésére a tuberkulózis kezelését a WHO ajánlása szerint úgynevezett ellenőrzött gyógyszerbevételi program (DOTS) keretében kell végezni. Ilyenkor a betegnek minden gyógyszeradagját egészségügyi dolgozó jelenlétében, annak közvetlen ellenőrzése alatt kell bevennie és ezt minden esetben dokumentálni kell.

1.1 *Mycobacterium tuberculosis* egyes célfehérjéi

1.1.1 Protein kinázok (PknA, PknB, PknG)

A protein kinázoknak kiemelt szerepük van a fertőző betegségek elleni küzdelemben. A *M. tuberculosis*-ban 11 Ser/Thr protein kináz (STPK) található. Ezek közül a PknA és PknB fehérjék transzmembrán receptor kinázok, melyek fontos szerepet töltenek be a baktérium sejtosztódásának szabályozásában és a morfológiában és szükségesek a baktérium túléléséhez. A PknB fiziológias szubsztrátja a GarA fehérje, mely a C-terminális végén FHA (forkhead-associated) doménnel rendelkezik. Az FHA domén elengedhetetlenül szükséges a szubsztrát N-terminális végén található Thr22 foszforilációjához.

A PknG oldható STPK fehérje és szerepet játszik a mikobaktérium glutamát metabolizmusában, valamint fertőzött makrofágok esetén gátolja a fagoszómalizozóma fúziót. A PknG nem nélkülözhetetlen a tuberkulózis mikobaktérium növekedéséhez, viszont elengedhetetlenül szükséges a baktérium gazdaszervezetben történő túléléséhez.

1.1.2 Nikotinamid-adenin-dinukleotid kináz (NADK) és Nikotinamid-adenin-dinukleotid szintetáz (NADS)

A NAD kináz ATP és magnézium jelenlétében a NAD poszforilációját katalizálja és egyben az egyetlen NADP forrást jelenti bármely élő szervezet számára. A NAD kináz fehérje fontos szerepet játszik a MDR tuberkulózis növekedésénél is, ebből kifolyólag fontos célpontnak bizonyul a hatóanyagtervezés során.

A NAD szintetáz az ATP-függő nikotinsav-adenin-dinukleotid (deamino-NAD) NAD-dá történő átalakulását katalizálja, ami a NAD *de novo* bioszintézis utolsó lépése.

2 Célkitűzések

Munkám során a *M. tuberculosis* patogén baktérium különböző, validált célmolekuláin (főleg kináz enzimek) ill. a baktériumon ható és a túlélését gátló új hatóanyagmolekulák beazonosítását valamint hatástani karakterizálását tekintetem legfőbb célnak. A munka nagy részét két nemzetközi pályázat, a New Medicines for Tuberculosis (NM4TB, LSHP-CT-2005-019923) és a SME-STREP for Tuberculosis Drug Development (TB-DRUG, FP6-CT-2006-037217) keretein belül végeztem el, (ez

utóbbinak témavezetőm Dr. Kéri György volt a koordinátora) ennek köszönhetően a doktori munkámban olyan adatok is szerepelnek, melyek a partnerekkel közösen végzett munka eredménye.

A mai modern molekuláris biológiai vizsgálatoknak köszönhetően számos olyan célfehérjét azonosítottak, mely szerepet játszik a tuberkulózis baktérium fiziológiás folyamataiban és gátlásával a patogén baktérium lefegyverezhető, ill. elpusztítható.

A gyógyszerkutatás kezdeti fázisában az a cél, hogy sikeres vezető (lead) molekulát fedezzünk fel, mely ezután preklinikai ill. klinikai fejlesztés alá kerülhet. Az egyre szigorodó előírások miatt a hatóanyagfejlesztés egyre komplexebb és költségesebb, melyet a hatékonyság növelésével és ezen keresztül a dózis függő mellékhatások csökkentésével lehet optimalizálni.

Ismert célfehérjén ható sikeres vezető molekula kiválasztására több ezer vegyület biokémia tesztelése után kerülhet sor. A gyors és hatékony tesztelést közepes vagy nagy átteresztőképességű (MTS/HTS) módszerekkel érik el, melyekhez többnyire fluoreszcencián alapuló mérési rendszert alkalmaznak.

Munkámban öt, a tuberkulózis fiziológiás folyamatában ill. túlélésében bizonyítottan meghatározó szerepet játszó PknA, PknB, PknG, NADK és NADS fehérjék aktivitásának mérésére állítottam be olyan biokémiai rendszereket, melyeket MTS/HTS tesztrendszerben lehet alkalmazni és elvégeztem több ezer vegyület tesztelését is.

A biokémiai módszereken alapuló, adott fehérje gátlását célzó tesztelésnek vannak azonban hátrányai is, mivel nem biztosított, hogy a biokémiai rendszerben hatékonyan bizonyuló vegyület valóban kifejti hatását *in vitro* sejtes vagy *in vivo* rendszerekben is.

Ezt elkerülendő létezik olyan kutatási útvonal, melyben a vegyületeket közvetlenül a sejtes rendszerben lehet letesztelni, és így gyorsabban lehet haladni a hatóanyagfejlesztésben, ugyanakkor a célmolekula beazonosítása későbbre marad.

3 Anyagok és módszerek

3.1 Vegyületek

A Vichem Kutató Kft. NCL (Nested Chemical Library) vegyülettára több mint 12 000 vegyületet foglal magába, melyek kb. 108 alapváz köré csoportosulnak. A vegyületek főként ATP kötőhelyen ható ill. allosztérikus kinázgátlók, melyek egy része ismert, másik része saját fejlesztésű, szabadalmaztatható molekula.

A EVL (Extended Validation Library) vegyülettár kb. 1 000 vegyületet tartalmaz, mely diverz szerkezetekre alapul és a NCL vegyülettár szűkített formájának tekinthető.

3.2 Radioaktív enzim aktivitás mérés

A radiometriás PknB mérést 20 µl végtérfigatban, 96-lyukú rakciólemezen végeztem. A kináz oldathoz (10 µM GarA; 2,5 nM PknB; 50 mM HEPES pH 7,0; 0,01 % Brij35; 1 mM DTT; 5 % glicerin) hozzáadtam az ATP tartalmú oldatot (20 µM ATP; 1,5 µCi [γ - ^{33}P]ATP; 500 µM MnCl_2), melyet 30 perces inkubáció követett szobahőmérsékleten.

A reakció leállításához 5 µl 150 mM H_3PO_4 -t használtam. Ezt követően minden lyukból 4 µl-t pipettáztam a P81 cellulóz papírra, melyet 5x10 percig mostam 1 % H_3PO_4 oldattal, hogy a nem kötődött jelölt ATP-t eltávolítsam. A száraz P81 papíron lévő foltokat PhosphorImager (Storm, Molecular Dynamics) készülékkel hívtam elő és értékeltem ki. Minden vegyületet először 50 µM, majd az aktívakat 5 µM-ban teszteltem duplikátumban. Az IC_{50} értékeket 8 pontos hígításban, duplikátumban, KaleidaGraph program segítségével határoztam meg. K252-a és straurosporin vegyületeket használtam referencia inhibitorként.

3.3 Transcreener technológia

3.3.1 HTRF® Transcreener ADP technológia

A HTRF® Transcreener® ADP technológia (Cisbio) egy kompetitív immunassay, melyben a natív ADP és a d2-jelölt ADP verseng az Eu^{3+} kriptáttal jelölt monoklonális ADP ellenes antitestért. A módszer 2 lépésből áll: az enzimatis reakcióból és az ezt követő általános detektáló lépésből.

PknA: 20 mM HEPES pH: 7,5; 1 mM DTT; 1 mM MnCl_2 ; 5 % glicerin; 0,01 % Brij35; 45 µM ATP; 40 µM GarA; 1,5 µM PknA

3.3.2 Transcreener® ADP² FP technológia

A Transcreener® ADP² FP technológia a távoli vörös tartományban mérhető kompetitív fluoreszcencia polarizáción alapuló módszer, amely az ADP kimutatásán alapul. A Transcreener ADP detektáló oldat ADP² antitesthez kötött Alexa633 tracer jelölt ADP-t tartalmaz. Az enzimreakció során termelődött natív ADP lezorítja a tracer jelölt ADP-t az antitestről és így a tracer-ADP szabadon foroghat mely a floreszcencia polarizáció csökkenéséhez vezet.

PknB: 50 mM HEPES pH=7,0; 1 mM DTT; 0,5 mM MnCl₂; 0,01 % Brij35, 5 % glicerin; 2,25 μM ATP; 0,1 mg/ml GarA; 1 nM PknB

PknG: 20 mM MOPS pH: 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MnCl₂; 0,01 % Brij35; 5 % glicerin; 10 μM ATP; 0,1 mg/ml GarA; 15 nM PknG

NADK: 40 mM Tris pH=8,0; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 100 mM NaCl; 100 mM KCl; 0,01 % NP-40; 5 % glicerin; 400 μM ATP; 1200 μM NAD; 800 nM NADK

3.3.3 Transcreener™ AMP/GMP technológia

A Transcreener™ AMP/GMP technológia a távoli vörös tartományban mérhető kompetitív fluoreszcencia polarizáción alapuló módszer, amely az AMP vagy GMP kimutatásán alapul. Az elve ugyanaz, mint a Transcreener® ADP² FP technológiának, csak ADP helyett AMP/GMP van jelen.

NADS: 20 mM HEPES pH=7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 22 mM KCl; 10 mM NH₄Cl; 100 μM ATP; 200 μM NaAD; 140 nM NADS

3.4 Virtuális tesztelés

3.4.1 Szerkezet-hatás összefüggés

A modell elkészítéséhez a Vichem Kft.-ben kifejlesztett programot használtuk. A biológiai mérések eredményein alapuló szerkezet-hatás összefüggést (QSAR) az ADABOOST módszerrel készítettük el, melyben több ezer kiszámított molekulaleíró (molecular descriptors) és a biológiai adatok közti korrelációt vizsgáltuk.

3.4.2 Dokkolás

Dokkolásnál a célfehérjék korábban publikált kristályszerkezetét használtuk fel. A dokkolás során a Vichem, Tripos és WDI vegyülettárat (19 033 vegyület) teszteltük virtuálisan. A dokkolást FlexX 1.20.1. programmal végeztük, alapbeállítások szerint. A kölcsönhatási energiák (H-híd, Van der Waals, Coulomb kölcsönhatás) alapján történt az illesztés. Minden ligand esetén 30 pózt generált a program, melyekhez az empirikus pontozófüggvény pontszámot rendelt és a legjobb pontszámú került kiválasztásra.

3.5 Antibakteriális tesztelés

A vegyületek (10 μM) *Corynebacterium glutamicum* (ATCC 13032) és *M. tuberculosis* H37Rv elleni *in vitro* aktivitásának meghatározása rezazurin redukción alapuló

mikrotiter módszerrel (REMA) történt. Az egy dózisú hatóanyag érzékenység meghatározás *C. glutamicum* esetén 384-lyukú átlátszó, lapos aljú polisztrén mikrolemezen (Corning) történt, 20 µl térfogatban. A vegyületekhez növekedési fázisban lévő, $OD_{600nm} = 0,001$ sejt kultúrát adtunk és 30 °C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. A rezazurin (2 µl; 0,025 w/v%) hozzáadása után a lemezeket 4 órán keresztül inkubáltuk. A baktérium növekedésére a rezazurin redukció fluoreszcencián alapuló (excitáció 570 nm, emisszió 590 nm) monitorozásából következtettünk. Az egy dózisú hatóanyag érzékenység illetve a MIC (a hatóanyag minimális koncentrációja, mely a folyékony sejt kultúra növekedését több mint 99 %-ban gátolja $OD_{600nm} = 0,001$ esetén) meghatározás *M. tuberculosis* esetén hasonlóan történt, de 96-lyukú átlátszó, lapos aljú polisztrén lemezen (Corning), 100 µl térfogatban. 7 nap 37 °C-os inkubálás után hozzáadtuk a rezazurint és további 20 órát inkubáltuk 37 °C-on mielőtt fluoreszcens értékelésre került sor.

3.6 Fertőzött makrofág vizsgálat

A 20 ng/ml PMA-val differenciált THP-1 sejt vonlat egy éjszakán át 10 % FBS és 1 % glutamin tartalmú RPMI oldatban növesztettük, 5 % CO₂ jelenlétében, 37 °C-on. A makrofágokat humán szérummal opsonizált *Mycobacterium bovis* BCG-vel 2 órán keresztül fertőztük (10 baktérium/sejt), majd friss médiummal mostuk. A nem internalizált baktériumokat 100 µg/ml gentamicin hozzáadásával öltük el. A fertőzött makrofágokat 10 µM végkoncentrációjú inhibitorral 48 órán keresztül inkubáltuk. A viabilitás vizsgálatához a médiumot antibiotikum mentes médiumra cseréltük, majd a begyűjtött fertőzött makrofágokat meleg PBS-sel mostuk. A makrofágokat 7H10/10 % OADC (Oleic Acid Albumin Dextrose Complex) lemezre helyezve meghatároztuk a telepszámot (CFU).

3.7 KinaTor™ vizsgálat

A kiválasztott molekula gyantához kötését a vegyészek végezték a korábban már publikált eljárásnak megfelelően. Az inaktivált *M. tuberculosis* lizátumot az EPFL intézet biztosította számomra. Az affinitás kromatográfiához Superdex 75 HR 10/300 GL oszlopot használtam. Az oszlop töltetét 5 ml 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1 M NaCl oldattal ekvibráltam (v=100µl/perc). Ezután 10 ml 15mg/ml tbc lizátumot engedtem át az oszlopon v=50

$\mu\text{l/perc}$ áramlási sebesség mellett. A fehérjét az oszlop mosása után (3 ml, 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 150 mM NaCl, $v=100 \mu\text{l/perc}$) 3 ml 20 mM HEPES; 0,25 % Triton X-100; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT; 150 mM NaCl, 10 mM ATP, 20 mM MgCl_2 és 1 mM inhibitor tartalmú oldattal eluáltam ($v=50 \mu\text{l/perc}$). Az affinitás kromatográfiát az inhibitorral kötött és az inhibitor mentes gyantával is elvégeztem. A fehérjét a SZTE Orvosi Vegytani Intézet ESI-QTOF rendszeren elemezte ki és azonosította.

4 Eredmények

4.1 Célfehérje alapú hatóanyagfejlesztés

4.1.1 PknB kinázon ható inhibitor keresés

4.1.1.1 Radiometriás PknB kináz módszer

PknB radiometriás kináz tesztelési módszerrel elvégeztem a a szűkített kináz vegyülettár tesztelését (~1 000 molekula). A vegyületeket első körben 50 μM koncentrációban teszteltem le duplikátumban, majd az így gátlást mutató molekulákat (85 inhibitor) 5 μM -ban is leteszteltem és végül 35 vegyületnek az IC_{50} értékét határoztam meg duplikátumban, 8 pontban, harmadoló hígításban.

A radiometriás tesztelés után kapott hit vegyületek IC_{50} és MIC értékét a **1.táblázat**ban tüntettem fel.

1.táblázat Radiometriás tesztelés után kapott hit vegyületek IC_{50} és MIC értéke

Vegyület	IC_{50} (μM)	MIC (μM)
VIC-12112	0,274	49
VIC-12147	2,37	>34
VIC-16212	0,82	>55
VIC-16641	0,258	49
VIC-17103	0,584	>47

4.1.1.2 Virtuális tesztelés

4.1.1.2.1 Szerkezet-hatás összefüggés

A hatóanyagtervezés egyik fő lépése a szerkezet-hatás vizsgálat, mely történhet a vegyész személyes meglátása szerint, de vannak ezt segítő számítógépes programok is. Mi mindkettőt alkalmaztuk.

A QSAR modell elkészítéséhez 1050 mérési pontból származtatott pIC_{50} érték állt rendelkezésünkre. A negatív értékeket a modell elkészítésénél nem vettük figyelembe. A végső adabázis 606 adatpontot tartalmazott.

A legjobb modellel leteszteltük a virtuális vegyülettárat (~70 000 molekula) új, szabadalmaztatható szerkezetkeresés végett.

4.1.1.2.2 Dokkolás

PknB kináz esetén 3 kristályszerkezetet is találtunk a PDB (Protein Data Bank) adatbázisban, amit dokkoláshoz tudunk használni (1MRU, 2FUM, 1O6Y). A dokkolás alapján a legjobbnak talált 271 vegyületet leteszteltem biokémiai módszerrel, melyek közül néhánynak meghatároztam az IC_{50} értékét is.

4.1.1.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

Ugyan a radiometriás módszerek érzékenységét nehéz felülmúlni, hátrányuk az, hogy elvégzésükhöz speciális engedéllyel rendelkező labor szükséges; a radiometriás mérés időigényes és körülményes, mivel jelentős előkészületet igényel (radioaktív izotóppal jelzett szubsztrát beszerzése, tárolása, felezési idő figyelembevétele, stb.). Munkám során nyilvánvalóvá vált, hogy ez a módszer nem alkalmazható MTS/HTS tesztelésre, ezért célul tűzttem ki más, nem-radioaktív módszer felkutatását és beállítását.

4.1.1.3.1 PknB Transcreener[®] ADP² FP technológia

A szerkezet-hatás összefüggés felállítása után és a dokkolási eredményekre alapozva ~300 vegyületet teszteltem le PknB Transcreener[®] ADP² FP módszerrel. A Hiba! A hivatkozási forrás nem található.ban megtalálható az újabb hit vegyületek szerkezete, IC_{50} és MIC értéke.

A vegyületeket először duplikátumban 10 μ M-ban teszteltem és az itt 75 %-nál nagyobb gátlást mutató molekulák IC_{50} értékét duplikátumban 8 pontos hígításban határoztam meg.

A PknB Transcreener[®] ADP² FP módszert a radiometriás tesztelésben gátlást mutató vegyületek IC_{50} értékének meghatározásával validáltam.

2. táblázat PknB Transcreener[®] ADP² FP tesztelés után kapott hit vegyületek IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-12150	0,6211	>100
VIC-16135	4,98	>100
VIC-16640	0,99	>100
VIC-16719	0,27	>100
VIC-17494	0,129	>100
VIC-17499	0,688	>100

A táblázatból jól látható, hogy habár a PknB kináz tesztelés során sikerült hatékony vegyületeket találni, ezek mégsem hatnak a tuberkulózis baktériumon.

4.1.2 PknG kinázon ható inhibitor keresés

4.1.2.1 Virtuális tesztelés

4.1.2.1.1 Dokkolás

Potenciális inhibitor keresés céljából PknG kináz esetén is elvégeztük a dokkolást, de ebben az esetben csak egy kristályszerkezet állt rendelkezésünkre PDB adatbázisban (2PZI). A Vichem, Tripos és WDI adatbázisban szereplő 19 033 vegyület dokkolása után 521 lehetséges PknG kinázgátlót választottunk ki további biokémiai tesztelésre.

4.1.2.2 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

4.1.2.2.1 PknG Transcreener[®] ADP² FP technológia

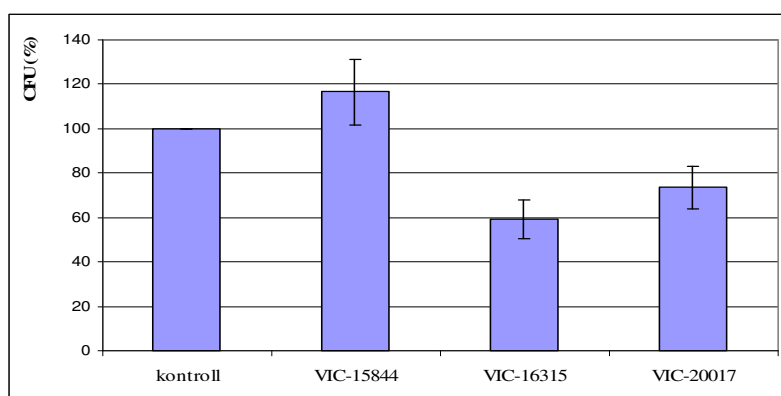
A dokkolás alapján hatékonynak vélt vegyületeket PknG Transcreener[®] ADP² FP módszerrel letesztelve 12 molekula rendelkezett 1 μM-nál alacsonyabb IC₅₀ értékkel (**3. táblázat**), de ezek közül egyik sem gátolta jelentősen a *M. tuberculosis* növekedését.

3. táblázat Dokkolásból származó PknG gátlók szerkezete, IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)	Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)	Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-15473	0,42	>100	VIC-16027	0,07	>100	VIC-16113	0,02	>100
VIC-15662	0,06	>100	VIC-16048	0,23	>100	VIC-16204	0,56	>100
VIC-15844	0,69	>100	VIC-16077	0,1	>100	VIC-16284	0,26	>100
VIC-15870	0,24	>100	VIC-16092	0,47	>100	VIC-16315	0,01	>100

Mivel a *M. tuberculosis* PknG célfehérjének szerepet tulajdonítanak a fagoszóma-lizoszóma fúzió gátlásában, ezért néhány vegyület hatását megvizsgáltuk fertőzött makrofágon is. A **1. ábra** oszlopdiagramján látható, hogy a vizsgált 3 inhibitor közül a VIC-16315 gátolta legjobban a telepszám képződést (~60 % CFU), míg a dokkoláshoz használt VIC-20017 (AX20017, IC₅₀=0,3 μM, MIC>100 μM) vegyület csak 26 %-os gátlást mutatott.

A VIC-15844 pedig statisztikai hibahatáron belül, de inkább elősegítette a telepképződést (116 % CFU).



1. ábra Fertőzött makrofág vizsgálat PknG inhibitorok esetében

4.1.3 PknA kinázon ható inhibitor keresés

4.1.3.1 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

4.1.3.1.1 *PknA* HTRF[®] Transcreener[®] ADP technológia

A HTRF módszer beállítása után teszteltük az EVL vegyülettárat 10 μM koncentrációban, duplikátumban. A **4. táblázat** a PknA inhibitorok IC₅₀ és MIC értékeit tartalmazza.

4. táblázat PknA inhibitorok aktivitása biokémiai és teljes sejtes tesztelés során.

Vegyület	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
VIC-6557	42	>200
VIC-15739	19	>200
VIC-16317	5,2	>200
VIC-16819	10	>200

4.1.4 NAD kinázon ható inhibitor keresés

4.1.4.1 Virtuális tesztelés

4.1.4.1.1 Dokkolás

Mivel a *M. tuberculosis* NAD kinázon ható inhibitorokról irodalmi adat nem állt rendelkezésünkre, ezért úgy gondoltuk, hogy a kristályszerkezeten alapuló virtuális vegyülettár tesztelése kiindulópontot jelenthet.

A tesztelésnél a korábban közölt *M. tuberculosis* NAD kináz és NAD komplex kristályszerkezetét használtuk (1Y3I).

Az 19 033 vegyület dokkolása után 49 vegyületet válsztottunk ki NADK *in vitro* teszteszésre. Spektrofotometriás tesztelés során egyik kiválasztott vegyület sem mutatott gátlást.

A spektrofotometriás módszer átbocsátóképessége elég alacsony, így szerettem volna MTS/HTS rendszerben használható módszert beállítani.

4.1.4.2 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

4.1.4.2.1 NADK Transcreener[®] ADP² FP technológia

A NAD kináz elleni inhibitor keresés során az EVL vegyülettárat 98 μM koncentrációban teszteltem duplikátumban. Sajnos közel 1 000 vegyületből egy sem mutatott gátló hatást még elenyésző százalékban sem, ami az eddigi, más kináz tesztelések során szerzett tapasztalatokkal ellentmond.

2009-ben jelent meg egy publikáció, mely leírja, hogy az ATP kötőhelyen ható vegyületek helyett a NAD analógok bizonyulnak sikeres gátlószereknek. Erre a tudományos megállapításra alapozva megmagyarázató, hogy a NAD kinázon miért nem hatottak az eredetileg ATP kötőhelyen ható inhibitorok. Miután a vegyészek szintetikus úton előállították a publikációban közölt di-(8-bróm-adenozin)-diszulfid NAD analógot (VIC-23779), leteszteltem NADK Transcreener[®] ADP² FP módszerrel, mint referencia anyag.

5. táblázat A referencia anyagként használt NAD analóg irodalmi és mért IC₅₀ értéke illetve MIC értéke

Vegyület	Molekula tömeg	IC ₅₀ (μM) irodalmi	IC ₅₀ (μM) mért	MIC (μM)
VIC-23779	722,40	19	97,4	>100

A **5. táblázat**ban látható, hogy a referencia anyag irodalomban publikált IC₅₀ értéke eltér az általam mért értéktől, ami magyarázható azzal, hogy a cikkben más módszerrel határozták meg ezt az értéket és pontosan nincs feltüntetve a tesztelés során használt körülmény (NAD koncentráció, NADK koncentráció stb.). Az általunk mért MIC értékből látható, hogy habár ez a vegyület a biokémiai mérések során mutat valamiféle gátló hatást, a *M. tuberculosis* növekedését nem gátolja.

4.1.5 NAD szintetázon ható inhibitor keresés

4.1.5.1 Virtuális tesztelés

4.1.5.1.1 Dokkolás

A NAD szintetáz dokkolásnál csak a *B. subtilis* NADS kristályszerkezete állt rendelkezésünkre (INSY), és mivel a *M. tuberculosis* és *B. subtilis* NAD szintetázok közt 40 % homológia van és a bizonyítottan katalitikus szerepet betöltő szekvenciák nagymértékben megőrzöttek, ezért úgy gondoltuk ezt használjuk.

A dokkolás után 19 033 vegyületből 47 lehetséges NADS gátlót választottunk ki további *in vitro* biokémiai tesztelésre.

4.1.5.2 Spektrofotometriás tesztelés

A dokkolás során kapott NADS inhibitor jelölteket letesztelve a legalacsonyabb IC₅₀ érték 50 µM körül volt, ami nem számít kiemelkedő értéknek, ezért a vegyületeket tovább optimalizáltuk és így már számos vegyületet találtunk, melyek alacsony mikromolos IC₅₀ értékkel rendelkeztek. A legjobb NADS inhibitorok IC₅₀ és MIC értékét a **6. táblázat** tartalmazza.

6. táblázat NADS inhibitorok IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)	Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)	Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)
VIC-4450	18	99	VIC-12592	8	51	VIC-12979	5,1	99
VIC-9982	18	64	VIC-12595	5	56	VIC-12990	4	26
VIC-11647	17	65	VIC-12965	10	35	VIC-13017	12,5	69
VIC-11649	14	64	VIC-12976	6,2	127	VIC-13268	3,5	33
VIC-12553	13	72	VIC-12977	4,5	67	VIC-15108	45	36

4.1.5.3 Fluoreszcencia polarizáción alapuló módszerek

4.1.5.3.1 NADS Transcreener™ AMP/GMP FP technológia

A MTS/HTS módszerrel a dokkolából származó eredményektől függetlenül a Vichem vegyülettár szűkített, változatos szerkezeteket tartalmazó, kb. 1 000 vegyületből álló részét (EVL) valamint további 700 vegyületet teszteltük le 98 µM-ban. A hatékonynak bizonyuló vegyületek közül néhányat *M. tuberculosis*-on is vizsgáltunk (7. táblázat)

7. táblázat NADS Transcreener™ AMP/GMP FP tesztelésből származó inhibitorok IC₅₀ és MIC értéke

Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)	Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)	Vegyület	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)
VIC-12730	4,91	ND	VIC-13597	15,71	ND	VIC-13734	13,78	>100
VIC-12734	5,41	ND	VIC-13708	6,77	ND	VIC-14185	10,30	>100
VIC-12735	10,18	ND	VIC-13716	8,59	ND	VIC-14201	9,72	>100
VIC-13592	5,64	ND	VIC-13720	7,81	ND	VIC-15740	15,22	>100
VIC-13594	12,45	ND	VIC-13722	9,45	ND	VIC-16319	19,42	20
VIC-13595	10,37	ND	VIC-13731	10,94	ND	VIC-16889	18,53	ND

4.2 Teljes sejtes tesztelésen alapuló hatóanyag fejlesztés

Az elmúlt tíz évben számos gyógyszergyártó cég választotta hatóanyagfejlesztésben a célfehérje alapú stratégiát, ami sajnos kevés sikerrel járt mivel eddig minden klinikai fejlesztés alatt lévő tuberkulózis ellenes hatóanyagot először az antibakteriális hatása miatt fedeztek fel. Ennek következtében a teljes sejtes tesztelés még mindig a legjobban alkalmazható új, hatékony szerkezetek illetve ezekhez kapcsolódóan új célfehérjék azonosítására.

A teljes sejtes tesztelés során a rezaurin redukción alapuló mikrotiter módszert alkalmaztuk, mellyel ~12 000 vegyületet teszteltünk le *C. glutamicum* baktériumon és ~1 000 vegyületet *M. tuberculosis*-on. Az ok, amiért a gyorsan növekvő, nem patogén *C. glutamicum*-ot alkalmaztuk a nagy mennyiségű vegyület tesztelésénél az, hogy a sejtfal szerkezete hasonló a tuberkulózis bacilluséhoz, a genomja sokkal kisebb, és a *M. smegmatis*-szal ellentétben csak négy STPK-t tartalmaz (PknA, PknB, PknG, PknL).

A két tesztelés alapján 17 vegyület gátolta a *M. tuberculosis* növekedését, melyek közül 3 vegyületet választottunk ki további hatóanyagfejlesztésre (8. táblázat).

8. táblázat *M. tuberculosis* növekedését gátló vegyületek (M = mutagén)

Vegyület	Tesztelés score		Genotoxicitás 10 mM	Citotoxicitás MCC (µM)	MIC (µM)
	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	<i>C. glutamicum</i> ATCC 01332			
VIC-7777	0,9	-0,1	-	>100	3,1
VIC-9376	1	0,5	-	>100	3,1
VIC-18469	0,5	0,2	-	100	6,25

Doktori munkámban csak a VIC-9376 és VIC-18469 vegyületekről számolok be.

4.2.1 VIC-9376 és származékai

Az általunk fejlesztett nitroquinoxalin vegyületek és egy új, tuberkulózis ellenes vegyület a BTZ043 közti hasonlóság alapján szerettünk volna megbizonyosodni arról, hogy a nitroquinoxalin vegyületek is ugyanazon célfehérjén hatnak-e mint a BTZ043 molekula. Ezért a kiválasztott VIC-9376 vegyületet hatását különböző vad típusú és BTZ rezisztens törzseken teszteltük. Habár a BTZ043 vegyület sokkal hatékonyabb, mint a VIC-9376, mindkét vegyület elveszti hatását, ha BTZ rezisztens törzsön teszteljük. Ebből arra következtetünk, hogy az általunk fejlesztett VIC-9376 vegyület (és származékai) részben legalább is a DprE1 fehérjén keresztül gátolja a mikobaktérium növekedését.

4.2.2 VIC-18469 és származékai

A benzoquinoxalin némi szerkezeti hasonlóságot mutat a klofaziminnel, melyet a rifampicinnel és a dapsonnal kombinációban a lepra kezelésénél használnak, valamint együttműködő partnerek biokémiai kísérleteiben gátolta a *M. tuberculosis* NDH-2 fehérjét. Erre alapozva megvizsgáltuk néhány benzoquinoxalin NDH-2 gátló hatását biokémiai rendszerben, melynek során a VIC-18469 ugyan nem, de két analógja (VIC-12955 és VIC-13202) kiemelkedő gátlást mutatott ($IC_{50(12955)}=0,54 \mu\text{M}$; $IC_{50(13202)}=4,14 \mu\text{M}$).

4.3 Célfehérje azonosítás

A teljes sejtes tesztelés egyik hátránya az, hogy a sejt életműködését gátló vegyület hatásmechanizmusa, az általa gátolt célfehérje ill. célfehérjék kiléte nem tisztázott.

Ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása gyakran igen bonyolult feladat, mely sokszor jelentős kihívást jelent a kutatók számára.

4.3.1 KinaTor™

A KinaTor™ technológiát korábban humán kinázok azonosítására számos esetben alkalmazták kutatócsoportunkban is a Max Planck Biokémiai Intézetével együttműködve.. Erre az elméletre alapozva, *M. tuberculosis* célfehérje azonosításra szerettem volna ugyanezt az elvet alkalmazni.

Az általam KinaTorhoz alkalmazott vegyület (VIC-14385) MIC értéke ugyan nem a legjobb (**8. táblázat**), de megközelíti a leghatékonyabb benzoquinoxalin vegyület MIC értékét, ezért a továbbiakban ezt a vegyületet használtam lehetséges célfehérjék azonosítására.

A VIC-14385 kötött gyanta mellett inhibitor mentes (blank) töltettel is elvégeztem az affinitás kromatográfiát, hogy kiszűrjem az aspecifikusan kötődő fehérjéket. Az eluátumokat ESI-QTOF rendszeren elemezve 8 fehérjét sikerült azonosítani (**9. táblázat**).

9. táblázat ESI-QTOF rendszeren azonosított fehérjék

Rendszertani besorolás	Gén	Kódolt fehérje	Molekulatömeg (Da)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>cfp30B</i>	bimoduláris glioxaláz	27324,5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>rv1261c</i>	nitroreduktáz	16738,2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>lprA</i>	lipoprotein	24885,8
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG / Pasteur 1173P2)	<i>atpD</i>	ATP szintáz β lánc	53076,7
<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG / Pasteur 1173P2)	<i>groLE1</i>	chaperon fehérje	56709,3
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>hsaC</i>	vas-függő extradiol dioxigenáz	33564,4
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>acpM</i>	acil hordozó fehérje	12506
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>pstS1</i>	foszfát-kötő fehérje	38226

5 Megbeszélés és Következtetések

Doktori munkám során főleg a célfehérje alapú hatóanyagfejlesztéshez nélkülözhetetlen biokémiai tesztrendszerek fejlesztésével, beállításával foglalkoztam. Öt (PknA, PknB, PknG, NADK, NADS), a *M. tuberculosis* jelátvitelben szerepet játszó célfehérjére összpontosítottam. Az *in vitro* tesztelést a Vichem Kutató Kft közel 12 000 vegyületből álló, főleg eukarióta kinázokra kifejlesztett ATP kötőhelyen ható, illetve allosztérikus

vegyülettárán végeztem el. A biokémiai rendszerek optimalizálásához, majd a vegyületek teszteléséhez szükséges enzimeket magam is előállítottam.

A PknB radiometriás kináz módszer elsajátítása és alkalmazása során, közel 1 000 vegyületből számos nanomolos IC₅₀ értékkel rendelkező inhibitorot találtam, de sajnos egyik sem gátolta a *M. tuberculosis* baktérium növekedését. További, hatékonyabb gátlók keresése céljából QSAR elemzést illetve *in silico* dokkolást is végeztünk. A hatékonyak vélt vegyületeket valamint a vegyészek által javasolt molekulákat Transcreener[®] ADP² kináz technológiával teszteltem le. Az így kapott hit molekulák sem hatottak az *in vitro* sejtes vizsgálat során, *M. tuberculosis* patogénezen.

A 19 033 vegyület dokkolását elvégeztük PknG kináz esetében is és az így kapott lehetséges inhibitorokat Transcreener[®] ADP² kináz módszerrel teszteltem le. PknG kináz esetében sem sikerült biokémiai rendszerben olyan hatékony vegyületet találni, mely gátolta volna a *M. tuberculosis*-t, de mivel a PknG kináznak szerepet tulajdonítanak a fagoszóma-lizoszóma fúzió gátlásában, megvizsgáltunk néhány PknG gátlót fertőzött makrofágon. A legeredményesebbnek a VIC-16315 molekula tűnt, mely 48 óra inkubálás után 40%-ban gátolta a telepkeződést.

A PknA kináz esetében kristályszerkezet hiányában, nem végeztünk dokkolást, hanem a Vichem Kft. 1 000 diverz szerkezetű vegyületből álló EVL vegyülettárának tesztelésével szerettem volna inhibitorokat találni. A tesztelésnél a HTRF Transcreener ADP illetve a Transcreener[®] ADP² módszert alkalmaztam. Sajnos ebben az esetben sem sikerült olyan hit molekulát találni, mely sikeresen fejtette volna ki hatását a patogénezen. A NAD kináz és szintetáz célfehérjék esetében a dokkolás során hatékonyak vélt vegyületeket spektrofotometriás módszerrel tesztelték le a Piemontei Egyetemen. NAD kináz esetében egyik vegyület sem mutatott gátlást, míg a NAD szintetáznál számos inhibitor közül a VIC-15108 (IC₅₀=73 μM, MIC=50 μM) bizonyult a legjobbnak. A hit vegyületekre alapozva még 130 választottunk ki további tesztelésre, melyek közül a VIC-13268 (IC₅₀=3,5 μM, MIC=33 μM) és a VIC-12990 (IC₅₀=4 μM, MIC=26 μM) vegyületek bizonyultak a leghatékonyabbnak. Ezzel párhuzamosan beállítottam a Transcreener NAD kináz illetve NAD szintetáz mérési módszereket, majd leteszteltem az EVL (~ 1 000 vegyület) vegyülettárat. NAD kináz esetén a molekulák még 98 μM koncentrációban sem gátolták az enzimet. Ezt magyarázza az a publikáció is, mely azt állítja, hogy NAD kináz esetében nem az ATP kötőhelyen ható vegyületek a sikeresek, hanem a NAD analógok. A NAD szintetáz esetében számos hit vegyület született, melyek közül sajnos csak néhányat tudtunk *M. tuberculosis*-on is megvizsgálni.

A célfehérje alapú tesztelések eredményeképp elmondható, hogy habár számos vegyület kiemelkedő hatást mutatott a biokémiai tesztrendszerekben, egyik sem gátolta érdemleges módon a *M. tuberculosis* patogént teljes sejtes vizsgálatokban. Erre a sajnálatos megállapításra alapozva úgy döntöttünk, hogy a vegyületek hatását közvetlenül sejtes tesztrendszerben fogjuk vizsgálni, így rögtön azokra a vegyületekre koncentrálva, amelyek képesek átjutni a sejtmembránon.

A tesztelés során a Vichem Kft. 12 000 vegyületből álló (NCL) vegyülettárát először *C. glutamicum*-on teszteltük le, és az így kapott hit vegyületek MIC értékét *M. tuberculosis* baktériumon határoztuk meg. Ezzel párhuzamosan a szűkített vegyülettárat (~ 1 000 molekula) közvetlenül a patogén baktériumon is leteszteltük.

Az így kapott 17 hit vegyület citotoxicitás és genotoxicitás vizsgálata után 3 vegyületet tartottunk érdemesnek a továbbfejlesztésre (VIC-9376, VIC-7777, VIC-18469), melyek közül doktori értekezésemben csak a VIC-9376 (nitoquinoxalin) és VIC-18469 (benzoquinoxalin) vegyületekkel kapcsolatos méréseket tüntettem fel. Mindkét vegyület számos származékát vizsgáltuk. A VIC-9376 szerkezeti hasonlóságot mutat a BTZ043 vegyülettel, így megvizsgáltuk, hogy ugyanazon célfehérjét gátolják-e. A különböző vad típusú és mutáns baktérium törzseken végzett vizsgálatok igazolták, hogy a VIC-9376 molekula is a DprE1 fehérjén keresztül fejt ki hatását.

A VIC-18469 vegyület távoli rokonságot mutat a malária terápiában alkalmazott klofaziminnel, mely partnerek kísérleteiben NDH-2 gátlóként is bevált. A VIC-18469 benzoquinoxalint és néhány analógját NDH-2 biokémiai rendszerben letesztelve a VIC-12955 és a VIC-13202 vegyületek sikeres NDH-2 gátlóknak bizonyultak.

M. tuberculosis célfehérje azonosításra alkalmaztam a KinaTor™ módszert is, amit eddig humán fehérjék esetében sikeresen használtak. Az eljárás során 8 említésre méltó fehérjét sikerült beazonosítani, de egyik sem játszik kulcsfontosságú szerepet a *M. tuberculosis* túlélésénél.

6 Saját publikációk jegyzéke

Tudományos közlemények:

- Székely R, Wácsek F, Szabadkai I, Németh G, Hegymegi-Barakonyi B, Erős D, Szokol B, Pató J, Hafenbradl D, Satchell J, Saint-Joanis B, Cole ST, Órfi L, Klebl BM, Kéri G. A Novel Drug Discovery Concept for Tuberculosis: Inhibition of Bacterial and Host cell Signalling. *Immunology Letters* 116:225–231, (2008) (IF: 2,858; független hivatkozás: 19)

- B. Hegymegi-Barakonyi, R. Székely, Z. Varga, R. Kiss, G. Borbély, G. Németh, P. Bánhegyi, J. Pató, Z. Greff, Z. Horváth, G. Mészáros, J. Marosfalvi, D. Erős, C. Szántai-Kis, S. Garavaglia, S. Perozzi, M. Rizzi, D. Hafenbradl, M. Ko, Y. Av-Gay, B.M. Klebl, L. Órfi, G. Kéri. Signalling inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* – early days of a new therapeutic concept in tuberculosis. *Curr. Med. Chem.*, 15:2760-2770, (2008) (IF: 4,823; független hivatkozás: 19)
- Magnet S*, Hartkoorn RC*, Székely R*, Pató J, Triccas JA, Schneider P, Szántai-Kis C, Órfi L, Chambon M, Banfi D, Bueno M, Turcatti G, Kéri G, Cole ST. Leads for antitubercular compounds from kinase inhibitor library screens. *Tuberculosis.*, 90:354-60. (2010) (*első szerzők; IF: 2,65, független hivatkozás: 2)

Szabadalom:

- S. Cole, R. Hartkoorn, S. Magnet, J. Pató, Gy. Kéri, L. Órfi, P. Bánhegyi, R. Székely. Quinoxaline derivatives and their use for the treatment of mycobacterial infections (2010) P1000356

7 Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Prof. Kéri Györgynek, amiért lehetőséget adott, hogy doktori tanulmányaimat a Vichem Kutató Kft.-ben végezhessem, valamint munkám során hasznos tanácsokkal látott el. Köszönöm Dr. Órfi Lászlónak a gyógyszerkémia területén nyújtott segítséget és tanácsokat, valamint Szántai-Kis Csabának, hogy a közösen eltöltött évek során bevezetett a hatóanyagtesztelés rejtelseibe.

Köszönöm a Vichem Kutató Kft. összes dolgozójának a segítséget, kiváltképp Dr. Pató Jánosnak és Dr. Erős Dánielnek a kémiában nyújtott eredményes munkát, és Hegymegi Barakonyi Bálintnak valamint Dr. Szegedi Zsoltnak a QSAR vizsgálat eredményét.

Köszönöm az NM4TB pályázat keretében Prof. Pedro Alzari csoportjának a radiometriás PknB kináz mérési módszerelsajátításában és a tesztelésben nyújtott segítséget. Az EPFL intézetben köszönöm Prof. Kai Johnson csoportjának, hogy elsajátíthattam a PknB, PknG és GarA fehérjék előállítását valamint Prof. Stewart Cole-nak, amiért részt vehettem a PknA kináz tesztelésben és a *C. glutamicum* teljes sejtes vizsgálatban. Köszönöm munkatársainak a teljes sejtes tesztelésben, citotoxicitás és

genotoxicitás meghatározásban nyújtott munkát. Köszönöm az AstraZeneca Indiának az NDH-2 tesztelés eredményeit.

Köszönöm a TB-DRUG pályázat keretében Prof. Menico Rizzi csoportjának a NADK és NADS spekrofotometriás tesztelés eredményeit, illetve a NADK és NADS enzimeket valamint Prof. Peter Sander csoportjának a teljes sejtes tesztelés eredményét.

Köszönöm Dr. Lengyel Józsefnek a SOTE NET Központi Izotóp Labor vezetőjének, hogy radiometriás kísérleteimet laborjában végezhettem.

Köszönöm Prof. Vértessy Beátának, hogy az Enzimológiai Intézetben helyet adott, hogy a fehérjék expresszálasát és tisztítását itthon is elvégezhessem.

Köszönöm Dr. Kiss Róbertnek a dokkolásban nyújtott munkát.

Köszönettel tartozom Prof. Yossef Av-Gay-nak (University of British Columbia) a fertőzött makrofág tesztelésért, a Proteros biostructures GmbH-nak a szelektivitás vizsgálatért, a KÉKI dolgozóinak a 2D gélelektroforézis során nyújtott segítségért és a SZTE, Orvosi Vegytani Intézetnek az ESI-QTOF elemzés eredményéért.

Köszönöm az ELTE-MTA Peptidkémiai Kutatócsoportnak a peptid szubsztrátok szintézisét.

Külön köszönöm családomnak és barátaimnak azt a felbecsülhetetlen türelmet, biztatást, és támogatást, mellyel mindvégig mellettem álltak és biztosították a kiegyensúlyozott háttérrel, hogy ez a munka létrejöhessen.