

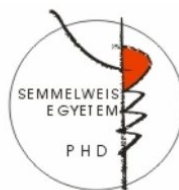
Új, liposzómába zárt TBC ellenes vegyületek vizsgálata

Doktori Tézisek

Dr. Kósa Nikoletta

Semmelweis Egyetem

Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Herényi Levente, PhD, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Müllner Nándor PhD., egyetemi docens
Dr. Uray Katalin PhD., tudományos főmunkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Zelkó Romána, DSc., egyetemi tanár
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Budai Lívía, PhD., egyetemi adjunktus
Dr. Solymosi Katalin, PhD., egyetemi adjunktus

Budapest

2021

1. Bevezetés

1.1. TBC

A TBC mindmáig az egyik legelterjedtebb fertőző betegség a világon, annak ellenére, hogy a betegség gyógyítható. A WHO 2019-es adatai szerint kb. 10 millió új TBC-s fertőzöttet és 1,4 millió halálos esetet regisztráltak világszerte. A TBC kezelése komplikációk nélkül min. 6 hónapot vesz igénybe, amelynek során izoniazid, rifampicin, etambutol és pirazinamid antituberkulotikumok kombinációit alkalmazzák. Az előírt terápia azonban gyakran sikertelen. A hosszú kezelés és a gyógyszerek okozta mellékhatások következtében a betegek terápiához való hűsége nem megfelelő, amely kedvez a gyógyszer rezisztens törzsek megjelenésének és elterjedésének. A rezisztencia legsúlyosabb formája az extenzív rezisztencia (XDR-TBC), amelynek során az elsővonalban alkalmazott izoniazid, rifampicin és a másodvonalban alkalmazott fluorokinolonok, továbbá legalább az egyik parenterálisan alkalmazott aminoglikozid (amikacin, kanamycin) hatástalan a fertőzéssel szemben. Napjainkban egyre nagyobb hangsúlyt kap az új antituberkulotikumok fejlesztése és a terápiába való integrálásuknak az igénye. 2012-től a TBC kezelésére három új vegyületet vezettek be, névszerint a bedaquilint, delamanidot és a pretomanidot. Ezeket az új hatóanyagokat is főleg kombinációban alkalmazzák, azonban már az újonnan alkalmazott antituberkulotikumokkal szemben is beszámoltak a rezisztencia megjelenéséről.

1.2. Liposzómák

A liposzómák szerkezetüket tekintve egy vagy több foszfolipid kettősrétegből állnak, amelyek vizes fázist zárnak közre. Gyógyszerszállító rendszerként és modellmembránként is alkalmazhatóak. A liposzómákat csoportosíthatjuk a vezikulák mérete, lamellaritása és a felszíni, valamint az

összetételbeli módosításuk alapján. Az I. generációs, konvencionális liposzómák farmakokinetikájára jellemző a szervezetből történő gyors kiürülés. Ezzel szemben a módosított felszínnel rendelkező II. generációs vezikulák hosszabb keringési idővel rendelkeznek. Hosszú keringési idejű (stealth liposomes) liposzómák előállítására leggyakrabban polietilén-glikol (PEG) polimert alkalmaznak, amely hidrofil felszínt biztosít a vezikuláknak és gátolja az opszoninok megtapadását a felszínen, ezáltal elkerülhető azok eliminációja. A II. generációs liposzómákon belül megkülönböztetünk olyan vezikulákat, amelyek szerkezetváltozást mutatnak valamilyen jel, például hőmérséklet vagy pH- változás hatására. Ezeket a vezikulákat nevezzük trigger szenzitív liposzómáknak. Az ily módon megformált vezikuláris rendszerek segítségével a liposzómákba csomagolt hatóanyagok kiürülésének helye és ideje megtervezhető és célzottá tehető.

2. Célkitűzések

Tudományos munkám során elsődleges célul tűztem ki, olyan antituberkulotikumokat tartalmazó liposzómás készítmények formulálását, amelyek hatékonyak lehetnek a TBC terápiájában. Céljaim között szerepelt a hatóanyagot tartalmazó vezikulák következő tulajdonságainak a megismerése:

1. Az előállított liposzómák méreteloszlásának vizsgálata és a változások nyomon követése.
2. Az antituberkulotikumok bezárási határfokának a meghatározása.
3. A liposzómába zárt készítmények *in vitro* monocita sejtek általi felvételének a meghatározása és összehasonlítása a szabad hatóanyagokkal.
4. A liposzómás készítmények és a szabad hatóanyagok *in vitro* citotoxicitásának a meghatározása monocita sejt kultúrán.

5. A szabad és liposzómába zárt készítmények *in vitro* hatékonyságának a megállapítása.

3. Módszerek

3.1. Antituberkulotikumok

A **TB501** (6-hidroxi-7-[[4-(2-hidroxietyl) piperazin-1-il]metil]-2-[(2E)-3-(2-metoxifenil)prop-2-én-1-ilidén]-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on) és a **TB515** ((2E)-6-hidroxi-2-(3-fenilprop-2-in-1-ilidén)-2,3-dihidro-1-benzofurán-3-on) antituberkulotikumokat *in silico* módszer segítségével választottuk ki. Az ELTE Számítógéptudományi Tanszék által használt, saját fejlesztésű FRIGATE dokkoló algoritmus segítségével a dUTP-áz bakteriális enzim szelektív gátlóit keresték.

3.2. Liposzóma minták készítése vékonyréteg hidratációs technikával

Kétféle összetételű liposzómát készítettünk. Az első az egy DPPC lipidből álló (SUV_{DPPC}) konvencionális vezikula, a második pedig 5:4:1 tömegarányban DOPE:CHEMS:DSPE-PEG összetételű, pH-változásra érzékeny molekulát tartalmazó, többkomponensű pegilált liposzóma. A lipidfilm készítéséhez a komponenseket kloroformban oldottuk, amelyet nitrogén gáz segítségével párologtattunk el. A következő lépésben a lipidfilmet PBS pufferrel hidráltuk. A létrejött multilamelláris vezikulákat 100 nm porúsátmérvőjű polikarbonát membránon extrudáltuk Avanti Polar Mini Extruderrel, hogy kis unilamelláris liposzómákat (SUV) állítsunk elő. A TB501 és TB515 antituberkulotikumokat a hidrálási fázisban, vagy a lipidfilm készítés során adtuk a rendszerhez.

3.3. A liposzómák méreteloszlás analízise DLS méréssel

A méréseket egy házi építésű, a Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetben továbbfejlesztett fényszórásmérő berendezéssel végeztük. A megvilágításhoz szilárdtest lézerefényforrást használtunk (Melles Griot 58-BLS-301, 457 nm, 150mW), a minták által szórt fény intenzitását a megvilágító fénynyalábhoz képest 90°-os szögben detektáltuk (Hamamatsu detektor, H7155 PMT modul). A méréshez 40 µl liposzóma mintát 200 µl PBS pufferrel hígítottunk.

3.4. Bezárási hatások meghatározása extinkció méréssel

A liposzómába zárt, illetve a szabadon lévő molekulákat méretkizárásos kromatográfiával (SEC) választottuk el. Megmértük a minták abszorbanciáját az elválasztás előtt és az egyes frakciók abszorbanciáját az elválasztás után. Az abszorbanciamérést a Nanodrop 1000 spektrofotométerrel (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware) végeztük a 250-550 nm-es hullámhossztartományban. Az alkalmazott minta mennyisége 2 µl volt. A TB501 és TB515 molekulák bezárási hatásfoka (BH%) megállapítható, ha az elválasztás után mért abszorbancia értékeket elosztjuk az elválasztás előtti abszorbancia értékekkel. A vezikulák miatti fényszórás kiküszöböléséhez a hatóanyagot nem tartalmazó liposzóma minták extinkcióját is megmértük, amellyel korrigáltuk a számolt BH% értékeket.

3.5. Uptake vizsgálata áramlási citometriával és mikroszkóppal

A liposzómába zárt és a szabad hatóanyagok sejtek általi felvételét BD LSR II áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) vizsgáltuk, MonoMac-6 humán monocita sejteken. Az inkubációs idő 3 óra volt. A megvilágításhoz lézer fényt használtunk (Coherent Sapphire szilárdtest dióda-lézer, 22 mW), majd detektáltuk a sejtek által kibocsátott

fluoreszcencia fény (csatorna FITC, emisszió) és a sejtek által szórt fény intenzitását.

A kezelt MonoMac-6 sejtek morfológiáját Olympus CKX41 fluoreszcencia mikroszkóppal (Hamburg, Németország, Olympus U-RFLT50 higanygőz lámpával felszerelt fluoreszcens mikroszkóp) is megfigyeltük.

3.6. *In vitro* citotoxicitás mérése MTT-teszttel

A TB501 és TB515 hatóanyagok MonoMac-6 sejtek életképességére kifejtett hatását vizsgáltuk MTT-oldat segítségével. A TB501 és TB515 hatóanyagok inkubációs ideje a MonoMac-6 sejteken 16 óra volt. A képződött lila színű formazán kristályok mennyiségét OD méréssel határoztuk meg, ELISA Reader (iEMS Reader, Labsystems, Finnország) segítségével 540 nm-en (abszorpciós maximum közelében) és 620 nm-en (referencia hullámhossz). A kiértékelés során az 540 nm-en mért OD értékekből kivontuk a 620 nm-en mért OD értékeket, és a citotoxicitást a következő egyenlettel adtuk meg, százalékban kifejezve (a képletben már a korrigált OD szerepel):

$$\text{Citotoxicitás \%} = [1 - OD_{\text{kezelt}}/OD_{\text{kontroll}}] \times 100$$

A szigmoid lefutású dózis-hatás görbékből a sejtekre nézve megállapítottuk az 50%-os gátlást okozó koncentrációt (IC₅₀).

3.7. Az antituberkulotikumok *in vitro* hatékonyságának mérése

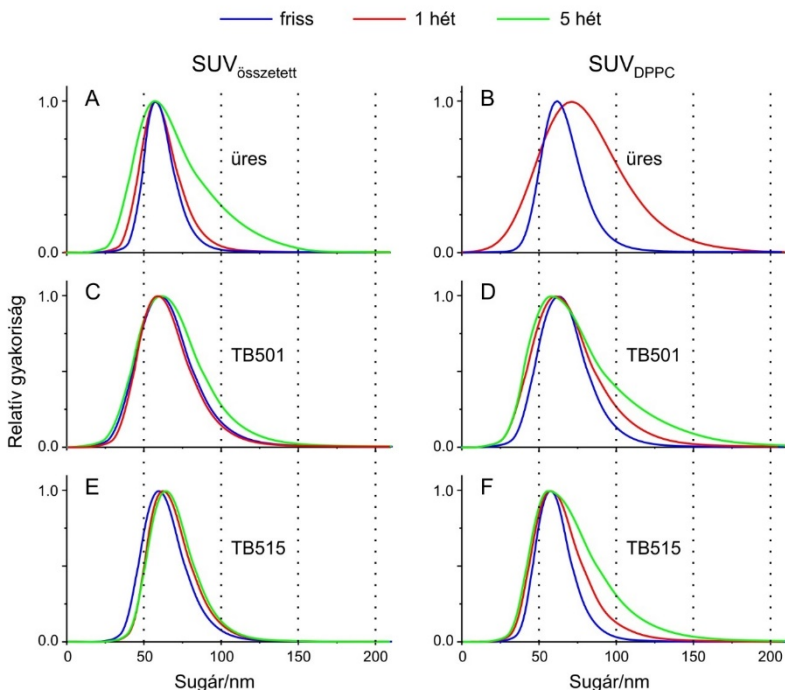
A TB501 és TB515 hatóanyagok hatékonyságát vizsgáltuk a lassan növő Mtb H₃₇Rv (ATCC 27294) és a RIF-re és INH-ra rezisztens Mtb A8 MDR (ATCC 35822) törzseken. A natív hatóanyagokat 0,05-100 µg/ml koncentrációban adtuk a médiumhoz. A hatóanyagok hozzáadását követően 28 napig inkubáltuk a sejteket, amelyből meghatároztuk az

antituberkulotikumok minimális gátló koncentrációját (MIC). Az antituberkulotikus hatás igazolására a törzseket a kezelést követően átoltottuk szilárd Löwenstein-Jensen médiumra, ahol a teleképző egységek (CFU) számából következtettünk a kifejtett gátlás mértékére.

A natív és a liposzómába zárt TB501 és TB515 antituberkulotikumok intracelluláris baktériumokra kifejtett hatását *Mtb* H₃₇Rv (ATCC 27294) törzssel fertőzött MonoMac-6 sejteken vizsgáltuk. A sejteket kétszer kezeltük három napos különbséggel a szabad, illetve a liposzómába zárt készítményekkel. A sejtek lízisét követően a mintákat átoltottuk szilárd Löwenstein-Jensen táptalajra, ahol 6 hét elteltével a CFU-k megszámlálásával állapítottuk meg a készítmények intracelluláris gátlását.

4. Eredmények

4.1. Az előállított liposzóma minták méreteloszlása

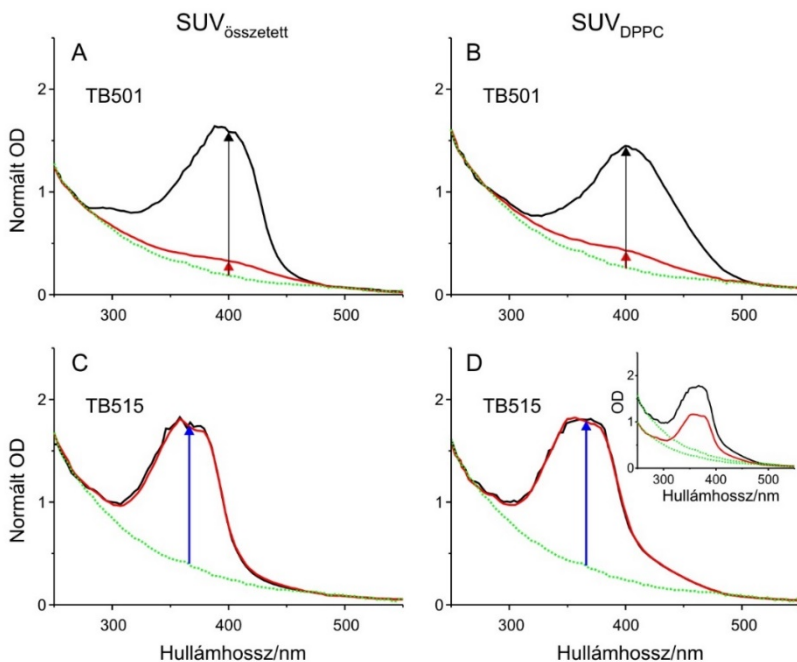


1. ábra: SUV_{DPPC} és a $SUV_{összetett}$ liposzómák méreteloszlásának időbeni követése DLS méréssel. Kék görbe: friss minta; piros: 1 hetes minta; zöld: 5 hetes minta. A SUV_{DPPC} minták esetében 5 hét elteltével a mérés során detektált autokorrelációs függvények már nem voltak kiértékelhetőek.

A vékonyréteg hidratációs technikával, majd extrudálással előállított friss SUV-ok sugarának módusza 60 nm volt, mind a hatféle liposzóma minta esetében. A méreteloszlás másik jellemző paramétere az FWHH érték, amely a görbék maximum magasságának a felénél mért szélessége. A

hatóanyagot nem tartalmazó SUV_{összetett} mintáktól eltekintve a legkisebb FWHH paraméter a SUV_{összetett} +TB515-t tartalmazó vezikuláknál tapasztaltuk.

4.2. Bezárási hatások



2. ábra: A bezárási hatások (BH%) meghatározásához a normált abszorpciós spektrumok a TB501 és a TB515 hatóanyagokra nézve. A detektált abszorpciós spektrumok az elválasztás előtt (fekete görbe) és az elválasztás után (piros görbe). A liposzómák általi fényszórás értékek zöld színnel szerepelnek. Az eredeti mért, normálás nélkülihez hasonló spektrumok a D részben vannak feltüntetve.

1. táblázat: A SUV_{DPPC} és a $SUV_{összetett}$ liposzómákba zárt TB501 és TB515 antituberkulotikumok számolt bezárási hatásfoka a 2. ábra alapján (az átlag 95%-os konfidencia intervallummal (CI) jellemezve).

Antituberkulotikum	$SUV_{összetett}$ (%) 95% CI	SUV_{DPPC} (%) 95% CI
TB501 (400 nm)	10,0—10,6	13,1—14,1
TB515 (370 nm)	96,6—98,8	97,2—99,2

A mérési eredmények alapján szembetűnő, hogy a TB515 molekula esetében a BH% majdnem 100 %-os mindkét liposzómára nézve, addig a TB501 anyagra nézve ez az érték 10 % körüli. A két molekula, mivel ugyanazon családnak tartozik, közös alapvázal rendelkezik, azonban az oldalláncok minősége eltérő, amely eltérő molekula méretben és lipofilitásban nyilvánul meg. Ezek a tulajdonságok befolyásolják a vezikulákba záródás mértékét.

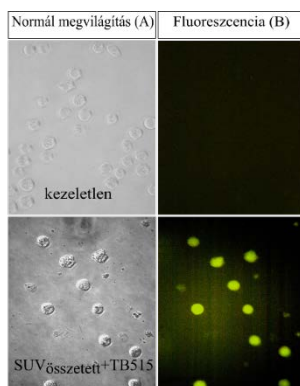
4.3. A hatóanyagok sejtek általi felvételének és a sejtekre kifejtett citotoxicitásának jellemzése

A sejtek általi felvétel a $SUV_{összetett}$ liposzómákra nézve volt a legjobb, míg a SUV_{DPPC} közel hasonló értékeket mutatott, mint a natív molekula. A TB515 molekula liposzómákba zárhatósága jobbnak mutatkozott a TB501 vegyülettel szemben, ezért itt a 100 %-os sejtek általi felvételéhez adtuk meg a hatóanyag mennyiséget μM -ban. Az eredmények alapján a szabad hatóanyaghoz képest a liposzómákba zárt készítményeket hatékonyabban vették fel a MonoMac-6 humán monocita sejtek.

2. táblázat: A natív és a liposzómába zárt (SUV_{DPPC} , $SUV_{összetett}$) antituberkulotikumok MonoMac-6 sejtek általi felvétele, áramlási citometria mérések alapján. TB501-re nézve 160 μM -nál a maximális sejtek általi felvételt adtuk meg, míg a TB515 vegyület esetében a 100 %-os felvételnél a legkisebb hatóanyagkoncentráció μM -ban kifejezve.

Antituberkulotikum	Natív	$SUV_{összetett}$	SUV_{DPPC}
TB501 (felvétel % 160 μM -nél)	0,15-0,2	1,2-1,5	0,2-0,25
TB515 (100 % felvételnél a mennyiség μM -ban)	20-40	80-160	80-160

A sejtek általi felvételt közvetlenül fluoreszcencia mikroszkóppal is



igazoltuk.

3. ábra: A $SUV_{összetett} + TB515$ mintával kezelt és a kezeletlen sejtek képe fluoreszcencia mikroszkóppal, áteső fényvel (hagyományos mikroszkópi kép) (A) és WideBlue filterrel (fluoreszcencia kép) (B) rögzítve. A kezelt sejteken az alkalmazott minta koncentrációja: 25 μM .

A natív és a liposzómába zárt hatóanyagokkal történő kezelését követően, az áramlási citométerrel végzett mérések alapján elmondható, hogy a liposzómába zárt készítmények kevésbé voltak toxikusak a MonoMac-6 monocita sejtekre nézve, a szabad hatóanyagokhoz képest. A kezeletlen sejtekhez viszonyítva a halott sejtek százalékos aránya a liposzómába zárt antituberkulotikumok esetében volt a legkisebb.

3. táblázat: Az áramlási citométerrel mért élő sejtek százalékos aránya a humán MonoMac-6 monocita sejt kultúrán, a natív és a liposzómákba zárt antituberkulotikumokkal történő kezelést követően. A citotoxicitás mértékét 160 μM hatóanyag koncentráció mellett vizsgáltuk a kontroll (kezeletlen)

Antituberkulotikum	Koncentráció (μM)	Natív (%)	SUV _{összetett} (%)	SUV _{DPPC} (%)
TB501	0 (kontroll)	90-92	89-92	91-93
	160	66-76	74-76	89-92
TB515	0 (kontroll)	91-94	92-93	92-95
	160	77-82	82-90	85-90

mintákhoz képest.

4.4. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága és szelektivitása *Mycobacterium* tenyészetben

A TB515 hatóanyagnál mindkét törzsre nézve alacsonyabb MIC értéket állapítottunk meg a mérés során, ami *Mtb* H₃₇Rv esetében 19 μM volt, míg az *Mtb* MDR A8-ra nézve 3,8 μM .

4. táblázat: A natív hatóanyagok (TB501 és TB515) minimális gátló koncentráció értékei (MIC) az *Mtb H₃₇Rv* és az *Mtb MDR A8* törzseken μM és $\mu\text{g/ml}$ koncentráció egységben kifejezve.

Antituberkulotikum	MIC (μM)		MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
	<i>Mtb H₃₇Rv</i>	MDR A8	<i>Mtb H₃₇Rv</i>	MDR A8
TB501	46	138	20	60
TB515	19	3,8	5	1

5. táblázat: A natív antituberkulotikumok IC_{50} értéke a MonoMac-6 sejtekre nézve, kolorimetriás MTT-teszt alapján, továbbá az IC_{50} és MIC arányokból számolt szelektivitási index (SI). A MIC értékeket az *Mtb H₃₇Rv* kultúrán mértük.

Antituberkulotikum	MonoMac-6	
	IC_{50} (μM)	SI <i>Mtb H₃₇Rv</i>
TB501	218	4,7
TB515	78	4,0

Az eredmények alapján szembevetendő, hogy a TB501 molekula magasabb IC_{50} értékkel rendelkezik a makrofágokra nézve, tehát kisebb toxicitást mutatott, mint a TB515 vegyület. Azonban az alacsony SI értékek alapján ezek a vegyületek mérsékelten szelektívek. A liposzómába zárt készítményeknél az IC_{50} értékek minden esetben $250 \mu\text{M}$ fölöttiek voltak. Ezek alapján a molekulák szelektivitása liposzómába zárva növelhető.

4.5. Antituberkulotikumok *in vitro* hatékonysága *Mycobacterium* fertőzött MonoMac-6 sejteken

A TB501 molekula natív formája, 25 μM koncentrációban már képes gátló hatást kifejteni az intracelluláris *Mycobacteriumra*. Liposzómába zárva növelhető a hatóanyag sejtekbe való bejuttatása, ezért a gátló hatás a liposzómába zárt gyógyszerformáknál jobb, főleg a $\text{SUV}_{\text{összetett}}$ készítményeknél, ahol nem volt egy CFU sem.

A TB515 vegyület intracelluláris hatékonysága a TB501 molekulával szemben jóval kisebbnek bizonyult, ugyanis natív formában még 100 μM koncentrációban sem volt képes gátló hatást mutatni az *Mtb H₃₇Rv* törzssel szemben, ugyanakkor a vegyület liposzómába zárva 25-50 μM között csökkentette a CFU-k számát.

6. táblázat: Telepképző egységek száma (CFU) az *Mtb H₃₇Rv* törzssel fertőzött MonoMac-6 sejtek különböző koncentrációjú antituberkulotikumokkal való kezelést majd Löwenstein-Jensen táptalajon

Antituberkulotikum	Koncentráció (μM)	CFU szám		
		kontroll (0)	konfluens telepek	
		Natív	$\text{SUV}_{\text{összetett}}$	SUV_{DPPC}
TB501	12,5	>100	10-50	10-50
	25	50-100	0	1-10
	50	10-50	0	0
	100	1-10	0	0
TB515	12,5	>100	>100	>100
	25	>100	>100	>100
	50	>100	10-50	50-100
	100	>100	0	0

való tenyésztést követően.

5. Következtetések

A doktori munkámban összefoglalt új eredmények alapján az alábbi következtetések vonhatóak le:

1. Az üres $SUV_{\text{összetett}}$ liposzómák a membránban lévő koleszterin származéknak és a pegilált felszínnek köszönhetően jobb stabilitást mutattak a SUV_{DPPC} vezikulákkal szemben. A TB501 és a TB515 hatóanyagok hozzáadása növelte a liposzóma minták stabilitását. A legígéretesebb konstrukció a $SUV_{\text{összetett}}+TB515$ minta volt.
2. A TB515 hatóanyagok mind a SUV_{DPPC} , mind a $SUV_{\text{összetett}}$ liposzómákban nagyobb volt a BH%-a a TB501 molekulához képest. Az eltérés magyarázható a két molekula különböző fizikokémiai tulajdonságaival, úgy mint, oldhatóság, molekula méret, lipofilitás és a hidrogén kötések száma.
3. A MonoMac-6 monocita sejtek általi felvétele növelhető, hogyha a TB501 és TB515 molekulákat SUV_{DPPC} és $SUV_{\text{összetett}}$ liposzómákba zárjuk. Ez a tendencia különösen a TB515 hatóanyagra nézve érvényesül, ahol eleve nagyobb liposzómális BH%-t értünk el. A fluoreszcencia mikroszkópos képek is igazolják, hogy a liposzómába zárt készítmények sejtek általi felvétele sikeres volt.
4. A natív vegyületek kevésbé szelektívek a gátolni kívánt *Mycobacterium tuberculosis* baktériumra nézve, mert a monocita sejtekre is toxikus hatást fejtenek ki. Az alacsony SI kiküszöbölhető, hogyha a liposzómákba zárt molekulákat alkalmazzuk, amelyek mind az áramlási citometria mérés, mind az MTT-teszt során kisebb toxicitást mutattak.

5. A TB501 molekula hatékonysága alul maradt a TB515 vegyülethez képest a szabadon növény Mtb H37Rv tenyészetben, azonban az intracelluláris gátlása kimagasló hatékonyságot mutatott a TB515 molekulához képest. Ez a megfigyelés arra enged következtetni, hogy a sejtekben lezajló komplex metabolikus folyamatok révén a TB515 molekula kevésbé tudja kifejteni a gátló hatását. Liposzómába zárva, fertőzött sejteknél mind a TB515, mind TB501 molekuláknál jelentős javulás figyelhető meg a mikobakteriális sejtekre kifejtett hatásukat illetően. A $SUV_{DPPC}+TB515$ és $SUV_{összetett}+TB515$ készítményeket $100 \mu M$ koncentrációban alkalmazva az összes baktériumot elpusztították és egyetlen CFU sem képződött.

6. Publikációk

Kósa N, Zolcsák Á, Voszka I, Csík G, Horváti K, Horváth L, Bősze S, Herenyi L (2021) Comparison of the Efficacy of Two Novel Antitubercular Agents in Free and Liposome-Encapsulated Formulations. *International Journal of Molecular Sciences* 22:2457. IF: 5,923

Bócskei-Antal B, Zolcsák Á, **Kósa N**, Voszka I, Csík G, Tóth K, Herenyi L. (2019) Comparison of light-induced formation of reactive oxygen species and the membrane destruction of two mesoporphyrin derivatives in liposomes. *Sci Rep*, 9: 1–10. IF: 3,998