

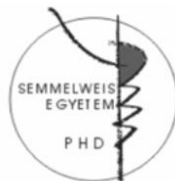
**AZ ÚJ CUKORBETEGSÉG ELLENES
GYÓGYSZERJELÖLT - BGP-15 - HATÁSA
MÁSODIK GENERÁCIÓS
ANTIPSZICHOTIKUMOK METABOLIKUS
MELLÉKHATÁSAIRA**

Doktori tézisek

Dr. Literati-Nagy Zsuzsanna

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Mandl József
Prof. Vígh László

Hivatalos bírálók:

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Tretter László

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Monostory Katalin
Dr. Sárman Beatrix

Budapest, 2013

BEVEZETÉS

Az életmódváltozás következtében a metabolikus betegségek gyakorisága világszerte nő. A metabolikus megbetegedések jelentősen fokozzák az öregedéssel is összefüggő kórképek, mint szív és keringési betegségek, Alzheimer kór és egyes daganatos megbetegedések rizikóját.

WHO 2007-es adatai alapján, a világon közel 54 millió ember szenved valamilyen súlyos pszichiátriai betegségben. Súlyos pszichiátriai betegségek, mint skizofrénia, bipoláris depresszió elsődleges kezelésére használt gyógyszerek az atípusos antipszichotikus szerek (AAPD), mint klozapin (Clozaril), olanzapin (Zyprexa), riszperidon (Risperdal). Ezeknek a szereknek azonban súlyos metabolikus mellékhatásai alakulnak ki, amelyek többek között elhízást, diszlipidémiát és glukóz intoleranciát eredményeznek. Ezek a mellékhatások jelentősen csökkentik a betegek gyógyszereszedési hajlandóságát, inzulin rezisztenciához, II-es típusú diabétesz kialakulásához vezetnek, továbbá fokozzák a kardiovaszkuláris megbetegedések kockázatát. Jelenleg ezen metabolikus mellékhatások kezelésére nincsen hatékony terápia, és ez jelentősen megnehezíti a második generációs antipszichotikumok alkalmazását.

Mivel feltételezik, hogy az AAPD-k diabetogén molekulák, ezért metabolikus mellékhatásaik kezelésében az antidiabetikumok alkalmazása kerül előtérbe. A jelenleg ismert antidiabetikumokkal azonban nem sikerült ezen mellékhatások kivédése. Munkacsoportunk régóta foglalkozik a hidroxámsav származékok antidiabetikus hatásaival.

A BGP-15 egy hidroxámsav származék, új típusú inzulinérzékenyítő gyógyszerjelölt, melynek fejlesztése II/b klinikai fázisban tart. A BGP-15 az első olyan gyógyszerjelölt, amelynek hatásmechanizmusában kiterjedten vizsgálták és bizonyították a hősokkfehérjék (HSP) szintjének befolyásolását. A BGP-15 többek között a hősokkfehérjék indukálásán keresztül fejti ki inzulin érzékenyítő hatását. A BGP-15 számos hatását írták le az elmúlt két évtizedben. Bizonyítottnak látszik, hogy a gyógyszerjelölt kölcsönhatásba kerül a sejtmembrán speciális lipid komponenseivel, melyeknek alapvető szerepük van a hősokkválasz elindításában.

Az inzulin rezisztencia és a diabétesz kialakulásában számos más, a lipid anyagcserét is érintő folyamat, lipid droplet képződés, ER stressz szerepet játszik. Kulcs jelentőségűnek tekinthető a Jun kináz (JNK) aktivációja és az ennek következtében bekövetkező inzulin receptor szubsztrát (IRS) szerin foszforilációja, amely az inzulin jelpálya működését gátolja. JNK aktiválódáshoz számos folyamat vezethet, így többek között krónikus gyulladás, mitokondriális funkció zavarok, vagy endoplazmás retikulum stressz. Kimutatták, hogy a BGP-15 a HSP72 indukcióján keresztül gátolja a JNK aktiválását és javítja az inzulin érzékenységet.

CÉLKITŰZÉSEK

Az inzulinérzékenyítő hatású BGP-15 eddigi hatásainak ismeretében feltételeztük, hogy az kedvezően befolyásolhatja az atípusos antipszichotikumokkal kiváltott súlyos metabolikus mellékhatásokat. Hipotézisünket különböző *in vitro*, *in vivo* modelleken végzett kísérletekben igyekeztünk igazolni. Célul tűztük ki, hogy a HSP72 indukció szerepét *ex vivo* humán megfigyelésekkel is alátámasztjuk.

1. Az adipociták meghatározó szerepe a II-es típusú cukorbetegség kialakulásában jól ismert, ezért vizsgálatainkat részint *in vitro* differenciáltatott 3T3-L1 zsírszöveteken végeztük. Kísérleteinkben a preadipociták jellemző metabolikus változásait mutató zsírcsepp (lipid droplet) képződést atípusos antipszichotikumok adásával idéztük elő. A diabétesz kialakulásában ismert a lipid droplet szerepe. Ezért megvizsgáltuk a BGP-15 hatását atípusos antipszichotikum (klozapin) által kiváltott lipid metabolizmus változásra *in vitro* differenciáltatott 3T3-L1 sejtekben.

2. A BGP-15 esetleges protektív hatás tanulmányozásának másik vizsgálati rendszereként az állatkísérleteket választottuk. Az atípusos antipszichotikumok adásával előidézett metabolikus károsodásokat egészséges nőstény Wistar patkányokon 21 napig tartó riszperidon, 2 hónapos klozapin, 35 napos klozapin, továbbá 5 napos olanzapin kezelésekkel idéztük elő. A károsodásokat és a BGP-15 hatását

hiperinzulinémiás euglikémiás glukóz clamp módszer alkalmazásával kívántuk mérni. Ezekben a kísérletekben terveztük továbbá a BGP-15 hatásának összehasonlítását más a klinikumban használatos antidiabetikumokkal, metforminnal valamint roziglitazonnal.

3. A túlsúly és az inzulin rezisztencia genetikai modelljén Zucker obese patkányokon vizsgáltuk a vitatott fogyasztószer, rimonabant hatását, önmagában, valamint esetenként BGP-15-el való kombinációkban. Összehasonlító vizsgálatokat végeztünk annak érdekében, hogy állatkísérletekben mérjük fel a BGP-15 esetleges terápiás indikációját, valamint előnyét a rimonabanttal szemben.

4. A BGP-15 hőszokkfehérje indukáló hatását különböző rendszereken leírták. Kérdés, hogy ez a hatás kimutatható-e a BGP-15 humán hatásainál, illetve összefügg-e esetleges antidiabetogén hatásával atípusos antipszichotikumokkal kiváltott inzulin rezisztenciában. Atípusos antipszichotikumokkal, illetve BGP-15-el végzett fázis I klinikai vizsgálatokban az inzulin rezisztencia és a vér perifériás magvas sejtjeinek HSP szint változás összefüggésének vizsgálatát terveztük elvégezni olanzapin + placebo és olanzapin + BGP-15 kezelésben részesült egészséges önkéntesekből származó vérmintákban.

MÓDSZEREK

***In vitro* vizsgálatok**

3T3-L1 preadipociták adipogenezis indukciója Giri által leírt módon történt. A kontroll sejteket tenyésztő médiummal kezeltük, ezzel egyidejűleg a sejtek egy részét 13 μ M klozapinnal és 10 μ M BGP-15-el kezeltük. Három nap múlva áramlási citometriás (FACS Calibur, Beckton Dickinson) vizsgálatot végeztünk. A 3T3-L1 sejtek scatter plotjait 4 (R1-R4) részre osztottuk a sejtek SSC (Side Scatter) értéke (granularitás) alapján, ahol az R1 régió volt a legkevésbé granulált. A kontroll sejtek többsége (ahol nem volt adipogenezis indukció) az R1 régióba került. Az R2-R4 régiók azonos nagyságú SSC tartományt foglaltak magukba.

***In vivo* vizsgálatok**

Az antipszichotikumok vizsgálata 210-230g súlyú, nőtény Wistar patkányokon történtek. A rimonabant és BGP-15 kombinációt tanulmányozó kísérleteket hím, 400-420g súlyú Zucker obese patkányokon végeztük.

Az állatokat olanzapinnal, klozapinnal, BGP-15-el, és rimonabanttal szájon át, riszperidonnal valamint kapszaicinnal pedig szubkután kezeltük.

Hiperinzulinémiás Euglikémiás Glükóz Clamp (HEGC)

A vizsgált állatok éjszakai éhezést követően, humán reguláris inzulin infúziót kaptak állandó sebességgel (5-12 mU/kg/min) 2 órán keresztül a véna jugulárisba helyezett katéteren keresztül. Ez a plazma inzulin

immunoreaktivitást körülbelül 100 $\mu\text{U/ml}$ -re állította be. Az inzulin hipoglikémizáló hatását glükóz infúzióval kompenzáltuk, amelynek sebességét úgy állítottuk be, hogy az állat normoglikémiás (5,5 mmol/l) legyen. Ezt, minden 10. percben vércukor meghatározással ellenőriztük az egyik oldali artéria carotis externa-ba vezetett katéteren keresztül nyert vérből. Amikor a vércukorszint legalább 30 percen keresztül a cél szinten állandó maradt (steady state) a cukor infúziós sebességét (mg/kg/min) meghatároztuk és ezt az értéket használtuk az inzulin érzékenység jellemzésére.

Humán klinikai farmakológiai vizsgálatok részeként végzett *ex vivo* vizsgálatok

A BGP-15 és az olanzapin fázis I, 17 napig tartó farmakokinetikai interakció vizsgálatát kettősvak, randomizált, placebo kontrollált módon, egészséges önkénteseken végeztük. A vizsgálat 1. és 18. napján vénás vért vettünk, a perifériás mononukleáris sejtek biokémiai vizsgálatára. A sejtek HSP72 fehérje szintjét SDS-gélelektroforézist követő western blot módszerrel határoztuk meg.

Kapszaicin előkezelés

1. nap – 10mg/kg 2%-os kapszaicin oldat szubkután
2. nap - 30mg/kg 2%-os kapszaicin oldat szubkután
3. nap - 50mg/kg 2%-os kapszaicin oldat szubkután

A szisztémás kapszaicin előkezelést követő 7 nap regeneráció után kezdtük el az állatok kezelését.

EREDMÉNYEK

Az új kísérleti eredményeink tézisszerű összefoglalása

- 3T3-L1 pre-adipocitákon a BGP-15 kivédte az klozapin adásával előidézett lipid droplet felhalmozódást. A BGP-15-el kezelt és a kontroll sejt populáció zsírtartalmuk alapján közel azonos eloszlást mutattak.
- A BGP-15 Wistar patkányokon kivédte klozapin, olanzapin, valamint riszperidon által okozott inzulin rezisztenciát és testsúlynövekedést. A BGP-15 kezelés önmagában nem befolyásolta az egészséges állatok inzulin érzékenységét és testsúlyát sem.
- A BGP-15 – szemben más antidiabetikumokkal – jelentősen gátolta az olanzapin testsúlynövelő és inzulin érzékenységet károsító hatását.
- BGP-15-tel kombinációban adva a rimonabant kezelés csökkentett dózisban is elegendő volt a kívánt inzulinérzékenyítő hatás eléréséhez az inzulin rezisztencia genetikai modelljén Zucker obez patkányokon.
- Szisztémás kapszaicin deszenzitizáció jelentősen fokozta Zucker obez patkányok inzulin érzékenységét, melyet önmagában sem a BGP-15,

sem a rimonabant, sem kombinációjuk jelentősen nem fokozott tovább.

- Humán fázis I vizsgálatban résztvevők perifériás magas vérsajtjeiben az olanzapin kezelés következtében csökkent HSP72 szintet a BGP-15 kezelés fokozta.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az atípusos antipszichotikumok (AAPD) a súlyos pszichiátriai betegségek gyakran alkalmazott gyógyszerei. Az AAPD-k súlyos metabolikus mellékhatásokat, mint testsúlynövekedést, hiperlipidémiát és glükóz intoleranciát okoznak; metabolikus mellékhatásaik kezelése megoldatlan feladat. Az értekezésben a BGP-15 hidroximsav származék, új klinikai II/b fázisban lévő cukorbetegség ellenes szer lehetőségét vizsgáltuk az AAPD-vel kiváltott metabolikus hatások kezelésében.

A BGP-15 sejtes és állatkísérletes modellekben védte az antipszichotikumok metabolikus szindrómát előidéző mellékhatásait és összehasonlításban hatékonyabb volt más antidiabetikumoknál. Ennek alapján feltételezzük, hogy klinikai vizsgálatokban alkalmas lesz az AAPD metabolikus mellékhatásainak mérséklésére.

Humán vizsgálataink valószínűsítik, hogy a BGP-15 ismert chaperon indukciós hatása szerepet játszik a klinikai vizsgálatokban észlelt antidiabetikus hatásának mechanizmusában. Az inzulinérzékenyítő hatásában nagy valószínűséggel kulcs szerepet játszik a HSP72, melynek

szintje az AAPD kezelés hatására csökken a perifériás magas vérsejtekben, míg ezt a csökkenést a BGP-15 kivédi.

Zucker obez patkányokon nyert eredményeink igazolják a BGP-15 korábban megfigyelt inzulinérzékenyítő hatását, rimonabanttal kombinációban pedig mindkét szer alacsonyabb dózisa is elegendő a kívánt inzulinérzékenyítő hatás eléréséhez.

Mindezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a BGP-15 kombinációban a második generációs antipszichotikumokkal megfelelő gyógyszeres kezelést jelenthet a súlyos pszichiátriai betegségekben szenvedőknek az antipszichotikumok metabolikus mellékhatásai nélkül.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A dolgozat témakörében megjelent közlemények:

1. **Literáti-Nagy Z**, Tory K, Literáti-Nagy B, Kolonics A, Török Z, Gombos I, Balogh G, Vigh L Jr, Horváth I, Mandl J, Sümegi B, Hooper PL, Vigh L (2012) The HSP co-inducer BGP-15 can prevent the metabolic side effects of the atypical antipsychotics. *Cell Stress Chaperon*. 17(4):517-21 (IF: 3,013)
2. **Literati-Nagy Z**, Tory K, Literáti-Nagy B, Kolonics A, Vigh L Jr, Vigh L, Mandl J, Szilvássy Z. (2012) A novel insulin sensitizer drug candidate—BGP-15—can prevent metabolic side effects of atypical antipsychotics. *Pathol Oncol Res*. 18(4):1071-6. (IF: 1,366)
3. **Literati-Nagy Z**, Tory K, Literáti-Nagy B, Bajza Á, Vigh L Jr., Vigh L, Mandl J, Szilvássy Z (2013) Synergetic insulin sensitizing effect of rimonabant and BGP-15 in Zucker-obes rats. *Pathol Oncol Res*. (IF: 1,366)
4. Crul T, Noemi Toth, Stefano Piotto, Peter Literati-Nagy, Kalman Tory, Pierre Haldimann, Bernadett Kalmar, Linda Greensmith, Zsolt Torok, Gabor Balogh, Imre Gombos, Federica Campana, Simona Concilio, Ferenc Gallyas, Gabor Nagy, Zoltan Berente, Burcin Gungor, Maria Peter, Attila Glatz, Akos Hunya, **Zsuzsanna Literati-Nagy**, Laszlo Vigh Jr., Femke Hoogstra-Berends, André Heeres, Irma

Kuipers, Lizette Loen, Jean-Paul Seerden, Deli Zhang, Roelien A M Meijering, Robert H Henning, Bianca JJM Brundel, Harm H Kampinga, Laszlo Koranyi, Zoltan Szilvassy, Jozsef Mandl, Balazs Sumegi, Mark A Febbraio, Ibolya Horvath, Philip L Hooper, Laszlo Vigh (2013) Hydroximic acid derivatives: pleiotrophic HSP coinducers restoring homeostasis and robustness. *Curr. Phar. Des* Vol. 19, No. 3 (IF: 3,87)

Egyéb közlemények:

1. Literáti-Nagy B, Kulcsár E, **Literáti-Nagy Z**, Buday B, Péterfai E, Horváth T, Tory K, Kolonics A, Fleming A, Mandl J, Korányi L (2009) Improvement of insulin sensitivity by a novel drug, BGP-15, in insulin-resistant patients: a proof of concept randomized double-blind clinical trial. *Horm. Metab. Res* 41: 374–380 (IF: 2,686)
2. Literáti-Nagy B, Péterfai E, Kulcsár E, **Literáti-Nagy Z**, Buday B, Tory K, Mandl J, Sümegi B, Fleming A, Roth J, Korányi L (2010) Beneficial effect of the insulin sensitizer (HSP co-inducer) BGP-15 on olanzapine-induced metabolic disorders. *Brain Research Bulletin* 83: 340-344 (IF: 2,498)
3. Gombos I, Crul T, Piotto S, Güngör B, Török Z, Balogh G, Péter M, Slotte PJ, Pilbat AN, Hunya A, Tóth N, **Literati-Nagy Z**, Vigh L Jr, Glatz A,

Brameshuber M, Schütz GJ, Hevener A, Febbraio MA, Horváth I, Vigh L (2011) Membrane-lipid therapy in operation: the HSP co-inducer BGP-15 activates stress signal transduction pathways by remodeling plasma membrane rafts. *PLoS One* 6 (12):e28818 (IF: 4,092)

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőimnek **Mandl József** egyetemi tanárnak és akadémikusnak, az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézet és a Patobiokémia doktori program vezetőjének, és **Vígh László** egyetemi tanárnak és akadémikusnak, az MTA Szegedi Biológia Központ Biokémia Intézet vezetőjének, hogy kutatómunkámat lehetővé tették, támogatták és nélkülözhetetlen szakmai segítségükkel nagymértékben hozzájárultak munkám sikeréhez.

Hálás köszönetemet szeretném kifejezni Dr. Tory Kálmánnak azért a támogatásért, tudományos iránymutatásért és megértésért, amelyre kutatómunkám során mindig támaszkodhattam. Köszönöm Dr. Kolonics Attilának, Dr. Horváth Ibolyának, Dr. Török Zsoltnak, Dr. Balogh Gábornak és Szilvássy Zoltán egyetemi tanárnak, hogy ötleteikkel és építő kritikájukkal segítették a munkámat. Hálás vagyok Turbók Józsefnének a kísérletek kivitelezése során nyújtott segítségéért és tanácsaiért.

Végül és mindenekelőtt szeretném megköszönni családomnak, különösképpen Édesapámnak, hogy céljaim elérésében támogattak, és szeretetükre, megértésükre mindig támaszkodhattam.