

Új vegyületek a *M. tuberculosis* fertőzés kezelésére, specifikus kimutatására

BŐSZE Szilvia,^a HORVÁTI Kata,^a MEZŐ Gábor,^a MEDZIHRADESKY-SCHWEIGER Hedvig^a és

HUDE CZ Ferenc^{a,b,*}

^aMTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

^bEötvös Loránd Tudományegyetem, Kémiai Intézet, Pázmány P. stny 1/A, 1117, Budapest, Magyarország

1. Bevezetés

A tuberkulózis (TB, gümőkór) a *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) okozta fertőzés következményeképp kialakuló kórkép, amely megjelenhet bármelyik szervben, de a tüdőtuberkulózis a leggyakoribb. Az ókori világot sújtó háborúk már terjesztették a ragályt. A TB tömeges elterjedését azonban az iparosodás, a nagyvárosok megjelenése, a tömegszállítások eredményezték. A TB kórokozóját Robert Koch azonosította 1882-ben. Emberi fertőzés és kórképek megjelenéséért atípusos, illetve környezeti mycobacteriumok (*M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*) is felelősek lehetnek. A TB kezelésére az 1943-ban felfedezett sztreptomocint használták először, amit 1952-ben az izoniazid bevezetése követett. 1971-től a rifampicint, majd a 80-as évektől a pirazinamidot is alkalmazták. A MTB leggyakrabban csepp-és porfertőzést követően kerül a szervezetbe, ahol elsősorban az alveoláris makrofágok, valamint a dendritikus sejtek bekebelezik; azonban a baktérium fagocitózisa nem vezet minden esetben a kórokozó eliminálásához. A MTB számos ponton képes gátolni a gazdasejt működését, kivédve anyagcsere termékeinek baktericid hatását. A fertőzött gazdasejtekben az intracelluláris MTB ún. dormans állapotban hosszú ideig életképes marad, és évtizedekig megtalálható a szervezetben a betegség kialakulása nélkül. Ebben az esetben látens fertőzöttségről beszélünk, és napjainkban az Egészségügyi Világszervezet (WHO) felmérése szerint a Föld lakosságának egyharmada ide sorolható. A TB továbbra is jelentős népegészségügy kihívást jelent a Föld minden pontján. Ez a betegség tehető felelőssé az elkerülhető felnőttkori halálokok 25%-ért; a megbetegedettek 80%-a gyermekkorú vagy a munkavégzés szempontjából legproduktívabb 15-59 éves. A WHO előrejelzése alapján 2000 és 2020 között közel 1 milliárd ember válik újonnan fertőzötté, és ezek közül várhatóan 200 millió egyénben ez a fertőzés klinikai megbetegedéshez vezet majd. A veszélyeztetett populációba tartoznak az idősek, újszülöttek, legyengült immunrendszerűek (pl. immunuszuppresszáltak, transzplantáltak, autoimmun betegségben szenvedők, HIV fertőzöttek).

A TB felszámolása a néhány évtizeddel ezelőtti optimista elképzelések ellenére nem történt meg, és az újabban fellépő jelenség, a multirezisztens baktériumok megjelenése a helyzetet tovább súlyosbítja.¹

A TB terjedésének megfelelő kontrol alatt tartásában nagy jelentősége van a betegség kezelése, új potenciális hatóanyagok felfedezése és a fertőzöttség specifikus és

korai diagnózisa területén folyó kutatásoknak. Munkánkban fontos szerepet játszanak a szintetikus peptidok és a peptid-biokonjugátumok.

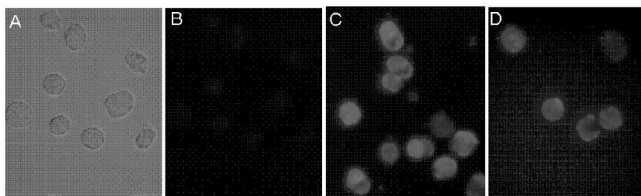
2. Új antituberkulotikus hatású vegyületek

Új antituberkulotikus hatású vegyületeket definiáltunk *in silico* módszerek alkalmazásával Dr. Grolmusz Vince kutatócsoportjában (ELTE Számítógéptudományi Tanszék) kifejlesztett dokkoló algoritmus (FRIGATE) segítségével. A baktérium anyagcseréjében létfontosságú enzimekhez kötődni képes molekulákat – e tulajdonságuk alapján – azonosítottunk.^{2,3} A vegyületek hatását *in vitro* MTB H37RV baktérium tenyészetben tanulmányoztuk, és meghatároztuk a vegyületek MIC értékét (MIC: a legkisebb koncentráció, amely a baktérium *in vitro* növekedését gátolja). A kísérletek az Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet területén található Bakteriológiai Laboratóriumban, Dr. Szabó Nóra és Dávid Sándor együttműködésével történtek.

Az új kemoterápiás szerek azonosítása mellett fontos e gátló vegyületek célsejtbe (pl. fertőzött makrofág) történő juttatása. A hatóanyagjelölt sejtbejutásának hatékonysága növelhető gazdasejt specifikus hordozó molekulákhoz történő kovalens konjugációval. A hatóanyagok többsége elsősorban a gazdasejten kívül csökkenti a mikrobák számát, és kismértékben hat az intracelluláris (és a dormans) baktériumokra. Olyan hatóanyagok-konjugátum konstrukciókat terveztünk és állítottunk elő, amelyekben az antituberkulotikumokhoz egy célbajuttató oligopeptid kapcsolódik közvetlenül vagy bifunkciós közvetítő modul beiktatásával. E vegyületekben célbajuttató egységként ismert oligopeptidet (pl. tuftsinszármazék, granulizin^{2,4,7}), illetve elágazó láncú polimer polipeptidet^{5,6} alkalmazunk. Az új vegyületek antituberkulotikus hatását jellemző MIC értéket MTB H37Rv baktériumszuszpenzió, valamint az intracelluláris baktériumot *in vitro* modellező MTB H37Rv fertőzött MonoMac-6 sejteken határoztuk meg.

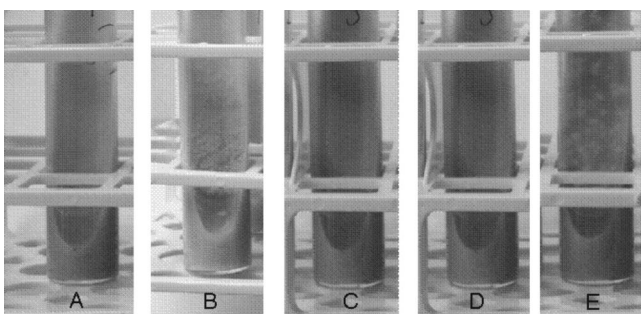
Előállítottuk az általunk *in silico* azonosított, fluoreszcens sajátosságú, antituberkulotikus hatású kumaronon típusú 6-hidroxi-7-[4-(2-hidroxietyl)piperazin-1-ylmetil]-2-[(E)-3-(2-metoxifenil)prop-2-enilidén]benzofuran-3-on (TB5) vegyület konjugálásra alkalmas származékát glutársav-anhidrid alkalmazásával. E vegyületet kapcsolunk oligotuftsinn (OT20) és granulizin peptidhordozókhoz amidkötés kialakításával. Meghatároztuk a konjugátumok *in vitro*

* Tel.: +36-1-372-2828 ; fax: +36-1-372-2620 ; e-mail: fhudecz@elte.hu



1. Ábra. A MonoMac6 humán monocitikus sejtekről készült mikroszkópos felvételek: (A) a kezeletlen kontrol sejtek fénymikroszkópos képe, (B) a TB5 hatóanyaggal kezelt sejtek nem mutatnak fluoreszcenciát (C) a TB5-OT20 konjugátum és a (D) TB5-granulizin konjugátum sejtbejutását demonstráló fluoreszcens mikroszkópos kép

antituberkulotikus hatását. A sejtbejutás mértékét fluoreszcencia mikroszkóp és áramlási citométer segítségével mértük. MonoMac-6 humán monocita sejtek a TB5 szabad hatóanyagot kis mértékben vették fel, míg a peptidokkal képzett biokonjugátumokat nagyságrendekkel nagyobb mértékben² (1. ábra). Az intracelluláris baktériumra kifejtett gátló hatást a fertőzött MonoMac-6 sejteken bizonyítottuk: a konjugált hatóanyag elpusztította az intracelluláris mikrobákat (2. ábra).



2. Ábra. Az intracelluláris *MTB* H₃₇Rv növekedésének gátlása, fertőzött humán MonoMac-6 sejteken: (A) kezeletlen kontrol, a baktérium telepek Löwenstein-Jensen szilárd táptalajon, (B) az INH antituberkulotikum önmagában nem határos, (C) az INH-pal-T5 konjugátum, (D) a TB5-OT20 konjugátum, valamint (E) a PLGA pal-T5-INH hatása – a telepek számának jelentős csökkenése a kezeletlen kontrolhoz és az INH-hoz viszonyítva. A kezelés után a sejteket 2,5 %-os steril SDS oldattal lizáltuk, majd a lizátum került kioltásra a szilárd táptalajon.

Kutatásaink során a jelenleg klinikumban alkalmazott izoniazid (INH) antituberkulotikum peptidkonjugátumait is előállítottuk. Az új, irodalomban nem ismert INH-peptidkonjugátumok előállítására két módszert dolgoztunk ki. Az első esetben a hordozó peptid aldehid származékát oldatban reagáltattuk az izoniaziddal. A másik módszer esetében először az INH-t reagáltattuk glioxilsavval, majd a termék redukcióját követően kapott izonikotinoilhidrazinocetsav származékot kapcsoltuk a szilárd fázison felépített oligopeptid N-terminálisához vagy a lizin aminosav ε-aminocsoportjához. Az INH-peptidkonjugátumok mindegyike gátolta a *MTB* H37Rv baktérium tenyészetek növekedését az INH MIC értékével közel megegyező koncentrációban.^{3,7} Eredményeink azt igazolták, hogy az oligopeptid hordozó egységhez történő kapcsolás a konjugátumban nem befolyásolja az INH *in vitro* antituberkulotikus hatását *MTB* H37Rv tenyészetben.^{2,3,7}

A kolloidális hatóanyag-szállító/célbajuttató rendszerek közül a biodegradálható polimerek alkotta nanorészecskéket, mint gyógyszerhordozókat szintén alkalmazhatjuk. A leggyakrabban használt, a szervezetben lebomló szintetikus

makromolekula a tejsav/glikolsav kopolimer (PLGA), amelynek hidrolízise során a szervezetben megtalálható, nem toxikus kismolekulák (tejsav, glikolsav) keletkeznek. Mivel az INH hidrofíl sajátsága miatt nem tud adszorbeálódni hidrofób polimeren, olyan INH konjugátumot állítottunk elő, amelyben az INH-származék egy palmitinsavval módosított peptid-hordozóhoz (INH-pal-T5) kapcsolódik. E konjugátum megoszlási hányadosa oktanol/víz rendszerben nyolcszorosa volt az INH-ra jellemző értéknek, ami jelzi a hidrofíl sajátság jelentős módosulását. Az INH palmitoilezett TKPKG tuftsinszármazékkal képzett konjugátumát PLGA nanokapszulákba csomagoltuk (PLGA pal-T5-INH), és Dr. Kiss Éva csoportjával (ELTE Kémiai Intézet, Határfelületi-és Nanoszerkezetek Laboratóriuma) együttműködésben, meghatároztuk a nanorészecskék tulajdonságait atomerő mikroszkóp, pásztázó elektron mikroszkóp és dinamikus fényszórás mérés segítségével. A nanoprecipitációs módszerrel jól reprodukálhatóan állíthattuk elő a 200 nm-nél kisebb átmérőjű részecskéket, a konjugátum esetében nagy kapszulázási hatékonyság (>90%) mellett. Eredményeink azt mutatták, hogy a nanorészecskék stabilitása és méreteloszlása megfelel a kolloidális gyógyszer-hordozókkal szemben támasztott követelményeknek.⁸ Megállapítottuk, hogy az INH-konjugátumot tartalmazó nanorészecskék a fertőzött MonoMac-6 sejteken elpusztították az intracelluláris baktériumokat (2. ábra).

3. Szintetikus antigének a *M. tuberculosis* fertőzés kimutatására

A *M. tuberculosis* fertőzöttség kimutatása radiológiai, mikroszkópos, mikrobiológiai és molekuláris biológiai vizsgálatokon, illetve ezek kombinációján alapszik, és rendszerint a diagnózis a betegség előrehaladott stádiumában történik. A szenzitizáltság (*MTB* fertőzöttség vagy korábbi BCG vakcináció) kimutatása történhet *in vitro* immunreakción alapuló módszerek segítségével is. A fertőzést követően a baktérium celluláris immunválaszt indukál, és számos specifikus *MTB* antigén stimulálja a T-sejteket. Az *in vitro* T-sejt válasz mérésén alapuló diagnosztikai módszerekhez alvadágátolt perifériás teljes vért, vagy a vérből izolált monomorfonukleáris sejteket (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) használnak. A teljes vér vagy a PBMC kultúra stimulálását végezhetjük specifikus *MTB* immundomináns fehérjékkel, vagy e fehérjékből levezethető szintetikus oligopeptid antigénekkal. Az antigének által kiváltott *in vitro* immunválasz jellemzésére a termelt citokinek leggyakrabban az interferon-gamma (IFN- γ), mennyiségét határozzák meg. (pl. IGRA tesztek).⁹ A tesztek specificitása és érzékenysége a stimuláláshoz használt antigénektől jelentős mértékben függ.

Kutatásaink során célunk olyan, *in vitro* körülmények között optimális T-sejt választ kiváltó, szintetikus peptid antigének tervezése és előállítása volt, amelyek alkalmasak a *MTB* fertőzöttség korai és specifikus kimutatására. E peptidok és konjugátumaik a jövőben a gyakorlatban is bevezethető immunodiagnosztikumok lehetnek.

A *MTB* specifikus immunválasz kialakításában két immundomináns fehérje (38 kDa és 16 kDa (Hsp 16.3) glikoprotein) játszik kiemelt szerepet. E fehérjéken

– átlapoló oligopeptidekkel (3. ábra) – T-sejt epitópotokat lokalizáltunk. Mind a szekretált 38 kDa, mind a 16 kDa fehérje, amely a baktérium dormans állapotában az egyik legnagyobb mennyiségben termelődő fehérje, mind pedig az azonosított szintetikus epitóppeptidek alkalmasak bizonyultak *in vitro* T-sejt válasz indukálására és így a MTB fertőzöttség igazolására.¹⁰⁻¹³

A			
p91-110	SEFAYGSFVRTVSLPVGAE	S ⁹¹ →A	A EFAYGSFVRTVSL
p92-110	EFAYGSFVRTVSLPVGAE	E ⁹² →A	S AFAYGSFVRTVSL
p93-110	FAYGSFVRTVSLPVGAE	F ⁹³ →A	SEAAYGSFVRTVSL
p94-110	AYGSFVRTVSLPVGAE	A ⁹⁴ →S	SEFAYGSFVRTVSL
p95-110	YGSFVRTVSLPVGAE	Y ⁹⁵ →A	SEFAAGSFVRTVSL
p91-104	SEFAYGSFVRTVSL	G ¹⁰⁴ →A	SEFAYAS FVRTVSL
p91-103	SEFAYGSFVRTVS	S ¹⁰³ →A	SEFAYGAFVRTVSL
p91-102	SEFAYGSFVRTV	F ¹⁰² →A	SEFAYGSAVRTVSL
p91-101	SEFAYGSFVRT	V ¹⁰¹ →A	SEFAYGSAFVRTVSL
p91-100	SEFAYGSFVRT	R ¹⁰⁰ →A	SEFAYGSAFVRTVSL
p92-104	EFAYGSFVRTVSL	T ¹⁰⁴ →A	SEFAYGSAFVRTVSL
p93-104	FAYGSFVRTVSL	V ¹⁰³ →A	SEFAYGSAFVRTVSL
p94-104	AYGSFVRTVSL	S ¹⁰² →A	SEFAYGSAFVRTVSL
p93-101	FAYGSFVRT	L ¹⁰⁴ →A	SEFAYGSAFVRTVSL

B																					
klón	HLA típus	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9											
P6.2	DR1	S	E	F	A	Y	G	S	E	F	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
B2.1	DR15	S	E	F	A	Y	G	S	E	F	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
P5.2	DR11	S	E	F	A	Y	G	S	E	F	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
P4.2	DR13	S	E	F	A	Y	G	S	E	F	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E
B1.2	DR7	S	E	F	A	Y	G	S	E	F	R	T	V	S	L	P	V	G	A	D	E

3. Ábra. A 16 kDa fehérje 91-110 szakasz aminosavszekvenciája alapján előállított peptidek: (A) a peptidek, valamint az Ala aminosavcseréket tartalmazó peptidek szekvenciája, (B) a HLA és T-sejt receptor kötődésben kulcsfontosságú aminosavak (vastagított egybetűs kóddal)

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy a minimális T-sejt epitópotok N- és C-terminálisát követő aminosavaknak (lebegő régióknak) fontos szerepe van az epitópspecifikus immunválasz hatékonyságában. Azt találtuk, hogy az epitóp szekvencia, illetve lebegő régiók megfelelő kémiai manipulálásával növelhető az immunválasz mértéke.⁹⁻¹² Szintetikus peptidek, peptidszarmazékok alkalmazásával, valamint alanin aminosavcserékkel meghatároztuk a HLA és T-sejt receptor kötődésben szerepet játszó kulcsfontosságú aminosavakat is (3. ábra).

Felismertük azt is, hogy az epitópsajátosságú oligopeptid makromolekulával történő konjugációjával tovább növelhető az immunválasz hatékonysága.¹⁰ Megállapítottuk, hogy a hordozóként kiválasztott elágazó láncú polipeptid (poli[Lys(Ser_i-DL-Ala_m)] (SAK), poli[Lys(Glu_i-DL-Ala_m)] (EAK)) vagy tetrafluorin származék (H-[Thr-Lys-Pro-Lys-Gly]₄-NH₂) felépítése, tulajdonságai, a peptid és a makromolekula között kialakított kötés (pl. tioéter vs. amid), valamint a hordozó immunogenitása és az epitóp peptidek konjugátumbeli orientációja jelentősen befolyásolja a MTB specifikus *in vitro* T-sejt válasz mértékét.

Kísérleti eredményeink szerint az előállított szintetikus peptid antigének önmagukban, illetve – fokozott mértékben – konjugátumaik alkalmasak specifikus *in vitro* T-sejt válasz kiváltására, és így felhasználhatóak lehetnek a MTB fertőzöttség, valamint a látens és aktív TB kimutatására és megkülönböztetésére.

Köszönetnyilvánítás

Kutatásainkat az OTKA (T 68358, T 68258, T 68120), az NKTH(NKFP_07_1-TB_INTER-HU, a GVOP-3.2.1-2004-04 0005/3.0; GVOP-3.2.1-2004-04-0352/3.0. támogatta.

Hivatkozások

- Dyer, C.M. *Tuberculosis*, pp 89-121, Chapter 7 and 8, **2010**, Greenwood Press, Santa Barbara, CA, USA
- Horváti, K.; Bacsa, B.; Szabó, N.; Mező, G.; Grolmusz, V.; Vértessy, B.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *Bioconjugate Chem.* (DOI: 10.1021/bc200221t, Publication Date (Web): April 19, **2012**)
- a) Horváti, K. *M. tuberculosis* immundomináns fehérjéiből származtatható mesterséges peptidantigének, valamint antituberkulotikum konjugátumok szintézise és *in vitro* aktivitásuk vizsgálata, PhD értekezés, ELTE, Budapest, 2009 http://teo.elte.hu/minosites/ertekezés2009/horvati_k.pdf, b) Horváti, K. *Magyar Kémikusok lapja*, **2010**, LXV. (7-8), 249-250.
- Mező, G.; Kalászi, A.; Reményi, J.; Majer, Zs.; Hilbert, Á.; Lang, O.; Köhidai, L.; Barna, K.; Gaál, D.; Hudecz, F. *Biopolymers* **2004**, *73*, 645-656.
- Szabó, R.; Peiser, L.; Pluddemann, A.; Bősze, Sz.; Heinsbroek, S.; Gordon, S.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chem.* **2005**, *16*, 1442-1450.
- Szabó, R.; Mező, G.; Pállinger, É.; Kovács, P.; Köhidai, L.; Bősze, Sz.; Hudecz, F. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1078-1086.
- Horváti, K.; Mező, G.; Szabó, N.; Hudecz, F.; Bősze, Sz. *J. Peptide Science*, **2009**, *15*, 385-391.
- Kiss, É.; Schnöller, D.; Pribranská, K.; Hill, K.; Péntes, Cs. B.; Horváti, K.; Bősze, Sz. *J. Dispers. Sci.* **2011**, *32*, 1728-1734.
- Richeldi, L. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2006**, *174*, 736-742.
- Hudecz, F. *Biologicals*, **2001**, *29*, 197-207.
- Caccamo, N.; Barera, A.; Di Sano, C.; Meraviglia, S.; Ivanyi, J.; Hudecz, F.; Bősze, Sz.; Dieli, F.; Salerno, A. *Clinical and Experimental Immunology* **2003**, *2*, 260-266.
- Bősze, Sz.; Caccamo, N.; Majer, Zs.; Dieli, F.; Mező, G.; Hudecz, F. *Biopolymers (Peptide Science)* **2004**, *76*, 467-476.
- Caccamo, N.; Meraviglia, S.; La Mendola, C.; Bősze, Sz.; Hudecz, F.; Ivanyi, J.; Dieli, F.; Salerno, A. *Eur. J. Immunol.* **2004**, *34*, 2220-2229.