

Magyar Állami Eötvös Ösztöndíj

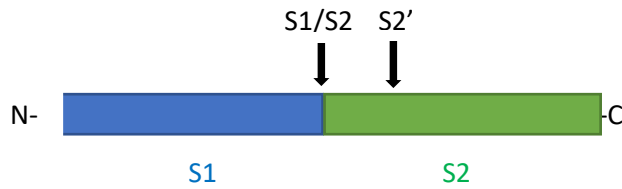
Kutatási beszámoló

Különböző állatfajokban végbemenő biotranszformációs útvonalak *in vitro* összehasonlítása 3-amidinofenilalanin származékok alkalmazásával

Bevezetés, irodalmi áttekintés

A 3-amidinofenilalanin (3-APhA) típusú vegyületek (Hammami és mtsai, 2012) szerepe a vírusos megbetegedések elleni küzdelemben kulcsfontosságú lehet. A gazdasejt proteázai aktiváló szerepet töltenek be a vírus gazdasejthez való kötődésében, így célpontot biztosíthatnak a vírusellenes terápiának. A gazdasejt proteázok gátlása előnyösebbnek bizonyulhat a klasszikus vírusellenes terápiákhoz képest, hiszen jóval kisebb a gyors lefolyású gyógyszerrezisztencia kialakulásának esélye (Steinmetzer és Hardes, 2018). A SARS-CoV-2 glikoproteinje, az S fehérje felelős a patogén gazdasejthez (annak felszínén lévő ACE2 receptorhoz) való kötődéséért, melynek aktiválását a gazdasejt TMPRSS2 proteáza végzi. A TMPRSS2 gátló vegyületek alkalmazása megakadályozza a SARS-CoV-2 gazdasejtbe való jutását, mert megelőzi a TMPRSS2 által történő S fehérje aktivációt (Hoffmann és mtsai, 2020).

A TMPRSS2 gátlásán túl szükség lehet egy másik aktiváló proteáz, a furin gátlására is, ezzel növelve az antivirális hatást annak köszönhetően, hogy a két proteáz a SARS-CoV-2 S fehérjéjének hasítását 2 eltérő ponton, a furin az S1/S2, a TMPRSS2 pedig az S2' helyen végzi (1.A ábra). Egy humán légúti epitheliális sejtvonalon végzett kísérletben azt találták, hogy a TMPRSS2 és a furin egyidejű gátlása az S fehérje két különböző ponton történő hasításának megakadályozása által kitűnő antivirális hatást érhet el, és ezzel a SARS-CoV-2 által okozott megbetegedés megelőzésében és kezelésében fontos terápiás lehetőségként vetődhet fel (Beste és mtsai, 2020). A kutatás során alkalmazott 3-APhA típusú vegyületek szerkezeti képleteit az 1.B ábra foglalja össze.



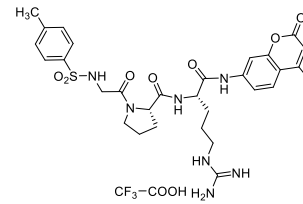
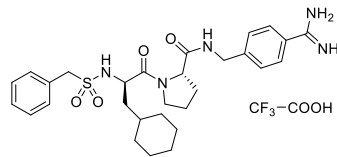
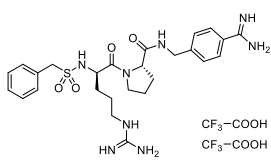
B

MI-0001

MI-0003

MI-109

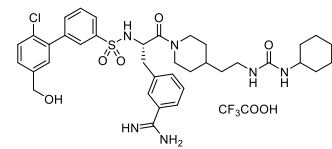
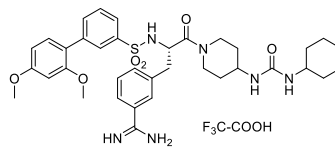
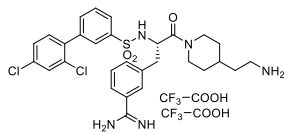
Trombin substrat



MI-432

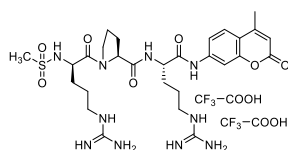
MI-463

MI-482

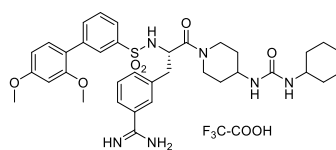


MI-507

FXa szubsztrát

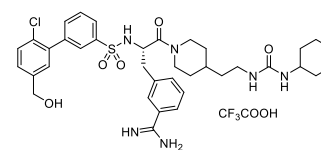


MI-1900

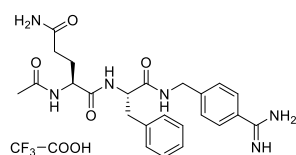


MI-2065

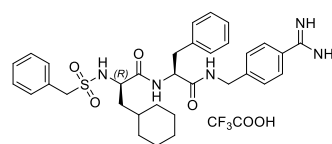
TMPRSS2 szubsztrát



MI-2605



MI-2802

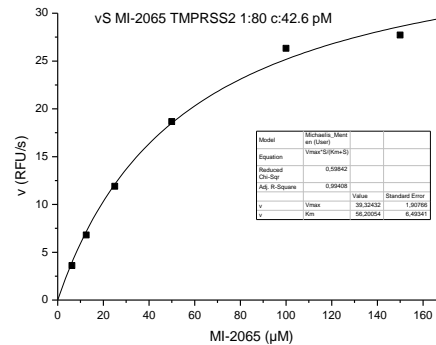
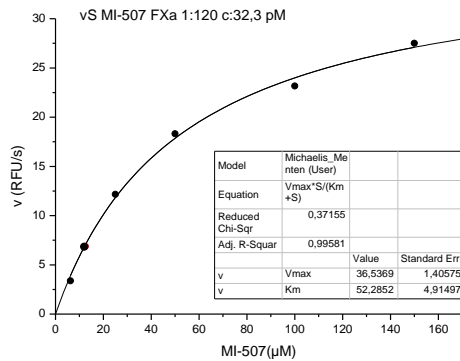


1. ábra A S fehérje TMPRSS2 és furin általi hasítási helyei (A) és a TMPRSS2 inhibitorok képletei (B)

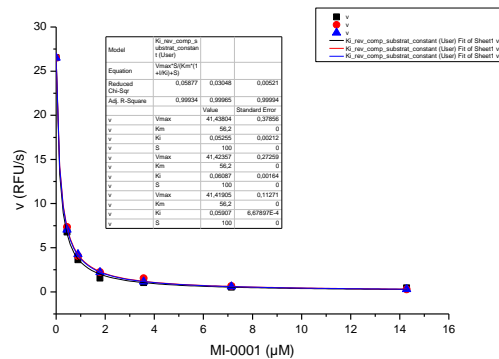
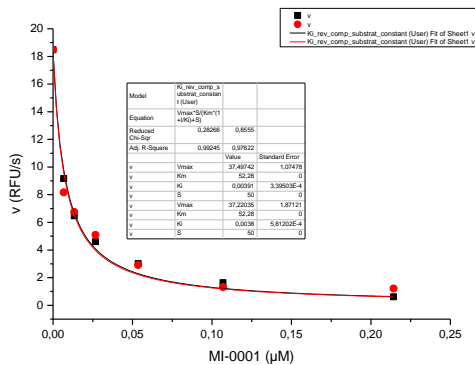
Enzimkinetikai mérések az MI vegyületek TMPRSS2, thrombin és FXa iránti szelektivitásának meghatározására

Az alkalmazott enzimek esetében meghatároztuk a K_m és a V_{max} kinetikai paramétereket (2. ábra), teszteltük az MI-0001, MI-0003, MI-432, MI-463, MI-482, MI-1900, MI-2605 és az MI-2802 TMPRSS2 gátló vegyületek célnzim iránti szelektivitását. A gátlás a tesztelt MI vegyületek esetében reverzibilis kompetitív típusú volt. A TMPRSS2 inhibitorok potenciális véralvadásgátló mellékhatásának kiszűrésére az MI vegyületek egyéb szerin

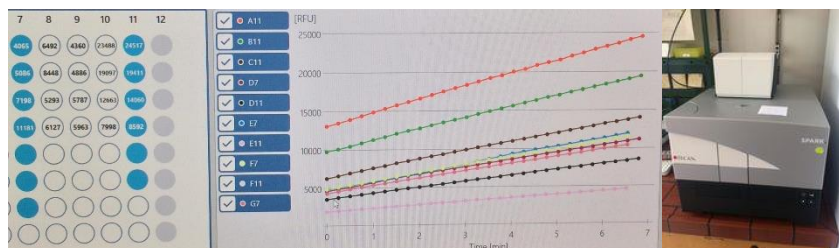
proteázok mint a trombin vagy az aktivált X-es faktor (FXa) iránti affinitását is meghatároztuk (3.-4. ábra, 1. táblázat).



2. ábra FXa and TMPRSS2 enzimek Km és Vmax értékei Michaelis-Menten kinetika alapján.



3. ábra MI-0001 hatása a FXa és a TMPRSS2 enzim működésére. A vegyület K_{iFXa} és $K_{i\text{trombin}}$ értéke alacsony, véralvadástgátló hatással rendelkezik. A $[FXa]$ 32,3 pM, a $[TMPRSS2]$ 42,6 pM ($\lambda_{Ex}/E_m=380/460$). Pufferként alkalmaztam 0.05 mol/L Tris+0.154 mol/L NaCl-ot Triton X 100 (0.01%) vagy PEG 8000 összetevőkkel (1 g /L).



4. ábra Fluorimetriás/enzimkinetikai mérések kivitelezése TECAN Spike készülékkel

Enzimek/ vegyületek	MI-0001	MI-0003	MI-432	MI-463	MI-482	MI-1900	MI-2605*	MI-2802*
Ki értékei (μM)								
TMPRSS2	0,057 \pm 0,004	0,03	0,186 \pm 0,027	0,003	0,067 \pm 0,005 (előmérés)	0,079	0,257 (előmérés)	0,065 \pm 0,007 (előmérés)
Trombin	0,001	0,001	0,017	0,457	0,085	0,912	>1 μM	0,015 \pm 0,001
FXa	0,004	0,084 \pm 0,008	0,049	0,011	0,86	0,01	n. a.	0,023 \pm 0,002

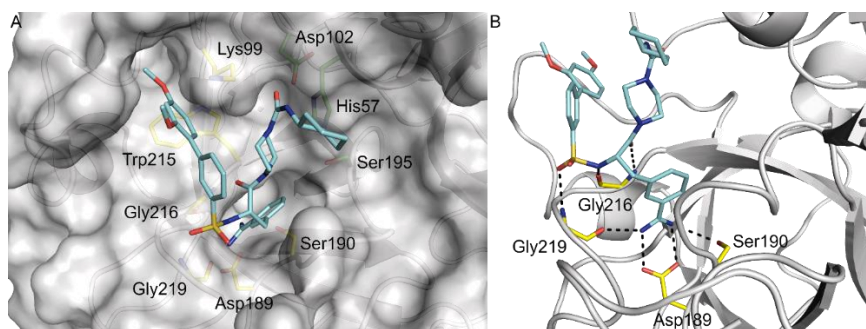
1. táblázat Ki értékek összefoglalása átlag \pm S. D. formájában. A TMPRSS2 enzimnél az MI-2065, a trombinnál az MI-109 és a FXa esetében az MI-507 szubsztrátként került alkalmazásra. Az *MI-2605 és az MI-2802 újonnan szintetizált vegyületek.

Molekulamodellzés a TMPRSS2 és az MI gátlószerek közötti interakció jellemzésére

A molekulamodellzés kezdeti lépéseként a komplex megalkotásához trombint alkalmaztunk (PDB: 3RM2-humán trombin az egyik szerkezeti analóggal, az MI-0003

vegyülettel komplexben). A trombin kitörlését követően a humán TMPRSS2 kristályos szerkezetét használtuk (PDB: 7MEQ -humán TMPRSS2 nafamosztattal komplexben). Az MI-0003 vegyület adott gátlószerre történő átalakítását a MOE szoftver (Molecular Operating Environment, version 2019, Chemical Computing Group: Montreal, Kanada) builder funkciójával (felszín receptor TMPRSS2 szerin-proteáz domén SPD) végeztük el az energia minimalizálását követően. Az MI vegyület(ek)- TMPRSS2 komplex vizualizálására PyMOL szoftver (PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0; www.pymol.org) segítségével került sor.

Az MI-1900 Y alakú konformációt vesz fel a tripszinszerű szerin-proteázokkal komplexben. A 3-APhA vegyület központi része jellemzően az S1 zsebhez kötődik, a bifenil terminális fenil gyűrűje az S3/4 kötőhelyet foglalja el a Trp215 fölött, ami körül van véve a Lys99 aminosav bázikus oldalláncával (5. ábra).

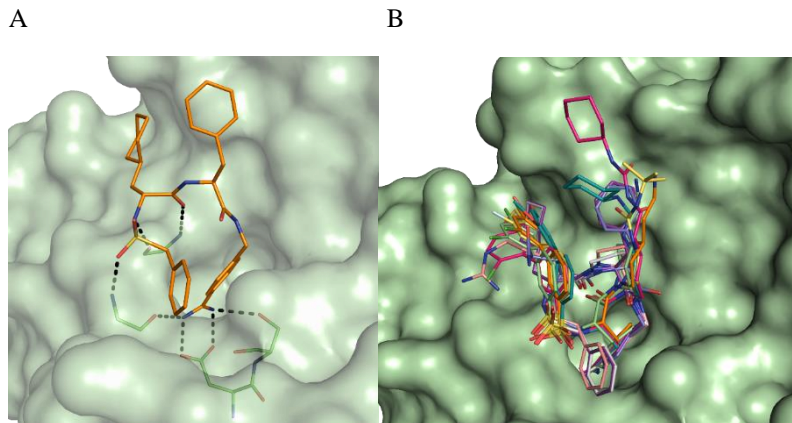


5. ábra Az MI-1900 és a TMPRSS2 komplex modellje (a világoskék atomok a szénatomok).

(A) A gátlószer a TMPRSS2 aktív helyéhez kötődve látható. A katalitikus triád ábrázolása (Ser195, His57, Asp102) zöld szénatomokkal történt, az inhibitor poláris kapcsolatait is magában foglaló aktív hely fontos maradványait sárga szénatomok jelölik.

(B) Az aktív hely interakcióinak közeli képe. Az amidino csoport erős ionos interakciót eredményez az Asp189 aminosavval az S1 zseb alján és poláris kapcsolatokat létesít a szomszédos Ser190 and Gly219 maradványokkal.

A TMPRSS2 és az általunk alkalmazott MI gátlószerrek közötti kölcsönhatás a 6. ábrán kerül bemutatásra.



6. ábra (A) Az MI-2802 TMPRSS2 enzimmel való komplexben. (B) Az MI vegyületek (MI-0001, MI-0003, MI-432, MI-463, MI-482, MI-1900, MI-1904, MI-2802 és az N385 modellvegyület) konformációjának megjelenítése TMPRSS2 enzimmel történő kölcsönhatásban (PyMOL).

Állatfaji különbségek a TMPRSS2 gátlók CYP450 -re gyakorolt hatásában

Négy TMPRSS2 gátló (MI) 3-ApA típusú vegyület, MI-432, MI-463, MI-482 és MI-1900 hatását vizsgáltuk különböző fajokból (humán, patkány, beagle és makákó) származó mikroszómákon a CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 és CYP3A4 izoenzimek aktivitására. Mikroszomális CYP1A2 aktivitás vizsgálata során 50 μ M koncentrációban alkalmazott szerin proteáz inhibitorok hatására patkánynál MI-463 és MI-1900, beagle mikroszómán MI-432 és MI-482, makákó esetében pedig mind a négy használt gátlószer szignifikánsan csökkentette a fluoreszcencia intenzitást. Kísérleti adataink szerint a vizsgált 3-ApA típusú vegyületek 50 μ M koncentrációban nem csökkentették szignifikánsan a humán mikroszomális CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19 aktivitását, azonban a CYP3A4 aktivitását mind a négy alkalmazott MI vegyület jelentős mértékben gátolta. Kutatásuk során igazolódott, hogy az *in vitro* antivirális hatással rendelkező, általunk vizsgált 3-ApA típusú vegyületek egyes izoenzimek működésére fajfüggő gátló hatással (CYP1A2 és CYP3A4) rendelkeznek, amely szükségessé teheti további *in vivo* vizsgálatok elvégzését a gyógyszerinterakciós potenciál előjelzése céljából (7. ábra).

CYP izoenzim aktivitás mérés (fluoreszcencia intenzitás változása)					CYP1A2 aktivitás mérés (fluoreszcencia intenzitás változása)				
HUMÁN	MI-4321	MI-463	MI-482	MI-1900	CYP1A2	MI-432	MI-463	MI-482	MI-1900
CYP1A2	-	-	-	-	PATKÁNY	-	↓	-	↓↓
CYP2C9	-	-	-	-	BEAGLE	↓↓	-	↓↓↓	-
CYP2C19	-	-	-	-	MAJOM	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↓
CYP3A4	↓	↓	↓	↓*					

* autofluoreszcencia $\geq 50 \mu\text{M}$

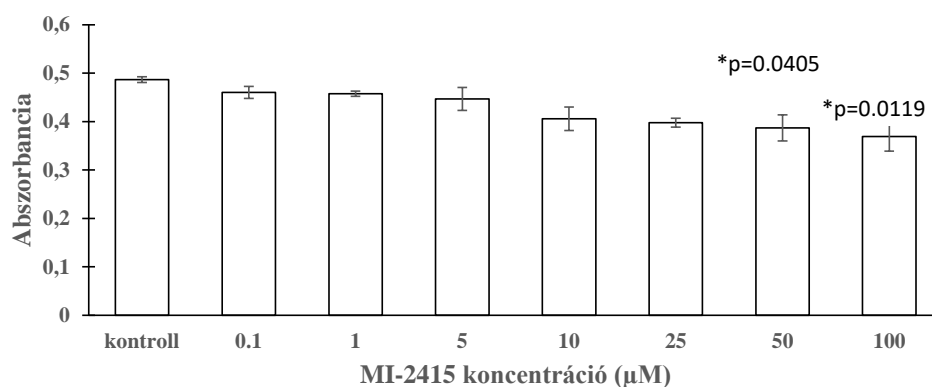
7. ábra MI vegyületek CYP aktivitásra gyakorolt hatása. A gyógyszerjelölt vegyületek egyes CYP izoenzimek működését fajfüggő módon gátolták (CYP1A2 és CYP3A4), de a humán mikroszomális CYP1A2, CYP2C9 és CYP2C19 aktivitását nem befolyásolták jelentős mértékben.

Patkány, beagle és majom májsejteket vetettük alá különböző koncentrációjú MI-432 és MI-1900 származékokkal való kezelésnek. A CYP1A2 izoenzim aktivitásában bekövetkező változásokat lumineszcencia segítségével határoztuk meg. A CYP1A2 aktivitását patkánynál egyik inhibitor sem befolyásolta szignifikánsan a vizsgált koncentrációkban. A beagle esetében vegyületfüggő (MI-432, 20 és 50 μM), a majom esetében pedig koncentrációfüggő (MI-432 és MI-1900, 50 μM) CYP1A2 enzimgátlás figyelhető meg. Az egyes 3-APhA-származékok CYP1A2 és a CYP3A4 izoenzimre *in vitro* kifejtett gátló hatása miatt, a vírusos megbetegedések kezelésében (például SARS-CoV-2) történő jövőbeli felhasználásuk során, - amennyiben ezt további *in vivo* kísérletek is megerősítik-, javasolt a terápiás protokoll részeként a gyógyszerkölsönhatások további feltérképezése, szoros monitorozása.

Furin inhibitor MI-2415 *in vitro* tesztelése

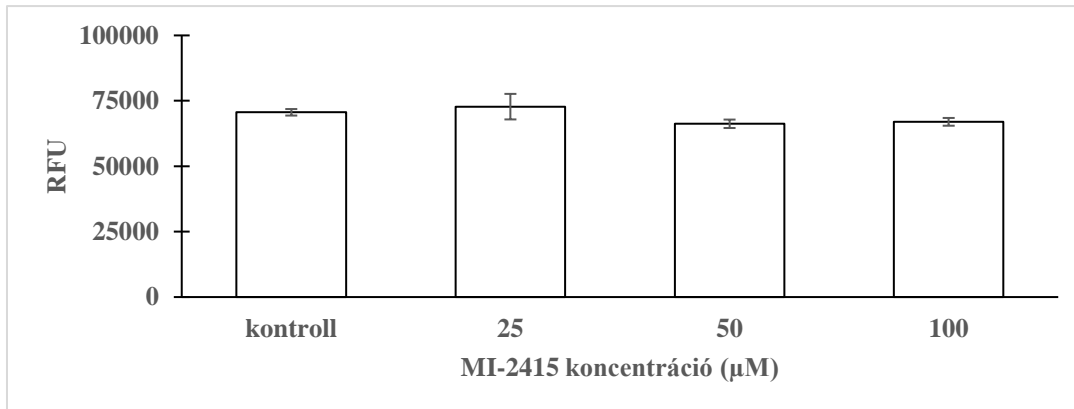
A citotoxicitási-, a CYP aktivitás- és az extracelluláris hidrogén-peroxid szint mérésekhez kollagénnel borított membrán inzertekre kiültetett primer humán májsejteket (PHH-kat) használtam. A sejtek metabolikus aktivitásának mérésére a CCK-8 reagenst és a Williams's E közeget (1:10 arányban keverve) adtam a májsejtekhez és 2 órás inkubációt követően 450 nm-en történt az abszorbancia mérése. A májsejtek MI-2415-el történő, 24 óráig

tartó kezelése 25 μM koncentrációig nem befolyásolta a sejtek életképességét, azonban 50 μM koncentráció felett a vegyület citotoxikusnak bizonyult (8. ábra).



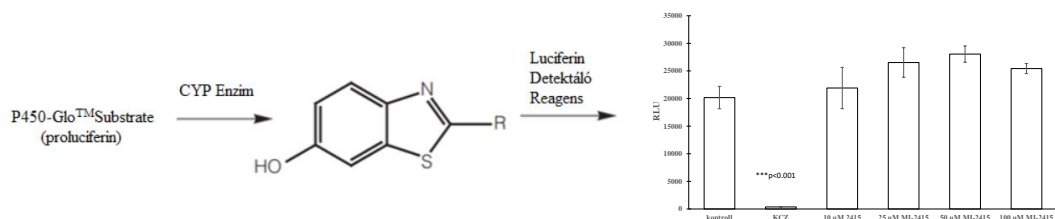
8. ábra MI-2415 24 órás citotoxicitásának vizsgálata. Primer humán májsejtek életképessége csak magasabb inhibitor koncentráció alkalmazása esetén (50 μM , $p=0.0405$, 100 μM , $p=0.0119$) mutatott csökkenést a kontrollhoz viszonyítva. A mérési adatok átlag abszorbancia értékek \pm standard deviációk formában kerülnek bemutatásra ($n=3$)

A hepatociták által termelt H_2O_2 mennyiségi mérésére Amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) módszert alkalmaztam. Az Amplex red vegyületből fluoreszcens rezorufin keletkezik, melynek mennyisége arányos a felülúszóban (extracellulárisan) található, sejtek által termelt H_2O_2 mennyiségével. Az MI-2415 nem emelte szignifikánsan a májsejtek extracelluláris hidrogén-peroxid termelését 24 órás inkubációt követően a vizsgált koncentráció tartományban 100 μM -ig (9. ábra).



9. ábra A kezelt PHH-k felülúszóiban az MI-2415 24 órás kezelés hatására nem látható szignifikáns változás a fluoreszcencia intenzitásában (RFU) a kontroll csoportokéhoz képest ($\lambda_{Ex}/Em=560/590$, $n=3$).

A gyógyszerinterakciós vizsgálatokban a sejteket CYP3A4 szubsztrátot tartalmazó közegben tartottam, amely a kezelt mintáknál 10, 25, 50 illetve 100 µM MI-2415-t vagy 10 µM ketokonazol (KCZ-t) tartalmazott pozitív kontrollként vagy negatív kontroll esetében inhibitor hozzáadása nélkül készült.



10. ábra A CYP3A4 enzimaktivitás mérés PHH-kban. Az MI-2415 nem csökkentette szignifikánsan az enzimműködést ($p>0.05$). A ketokonazol (KCZ) jelentősen gátolta a CYP3A4 izoenzim aktivitását ($p<0.001$). A mérési adatok átlag lumineszcencia értékek (RLU) \pm SD formájában kerülnek bemutatásra ($n=3$).

Az MI-2415 nem gátolta a CYP3A4 enzim működését PHH-kban számottevően még magasabb, 100 µM koncentrációban sem, amely alapján arra lehet következtetni, hogy a vizsgált furin gátló származék gyógyszerinterakciós potenciálja alacsony a CYP3A4-n metabolizálódó más gyógyszervegyületekkel (10. ábra).

Összefoglaló, jövőbeli tervek

Az eddig különböző állatfajokból származó mikroszómákon és májsejteken alkalmazott vegyületek közül a MI-432 és az MI-482 jelentős trombin iránti affinitást mutatott ($K_i < 0.1 \mu\text{M}$). Az újonnan szintetizált vegyületek közül az MI-2605 bár csak magasabb koncentrációban gátolja a trombint, de a TMPRSS2 affinitása is kisebb mértékű az MI-2802 vegyülethez képest. A jövőben olyan 3-APhA típusú vegyületek szintézise valósul meg, ahol az indánváz beépítésével javítható a szelektivitási profil, hiszen a kevésbé flexibilis molekulaszervezet miatt a trombinhoz való affinitás csökken, ezáltal a nem-szelektív származékok által előidézett vérárvadási zavarok mérsékelhetőek a TMPRSS2 iránti affinitás megtartása mellett.

A jövőbeli kutatásokban a vizsgált vegyületek között szerepelnek majd további furin enzimgátlók, amelyek a TMPRSS2 inhibitoroktól eltérő hasítási helyen képesek gátolni az S fehérje proteolízisét, és ezáltal a patogén mint a SARS-CoV-2-gazdasejt összekapcsolódást, így módon erős vírusellenes hatást kifejtve. A vegyületek előszűrésére is van lehetőség a trombin és a FXa gátlás mértékének meghatározása alapján a mért K_i értékek összehasonlításával.

A One Health mozgalom része az új gyógyszerek tesztelése és fejlesztése humán és állati megbetegedések megelőzése és kezelése érdekében (www.onehealthinitiative.com). A kutatásunkban alkalmazott gyógyszerjelölt vegyületek tesztelése során kapott eredmények, szerves hozzájárulást képezhetnek ezen integrált multidiszciplináris gyakorlat kialakításához mind a humán, mind az állatorvosi területen. Kutatásunk folytatásaként további cél más állatfajokból származó mikroszómák/sejtek felhasználásával szélesebb körben történő összehasonlítások elvégzése, valamint fajonként további izoenzim profilok vizsgálata farmakokinetikai paraméterek meghatározása céljából.

Idézett irodalmak

Bestle, D.; Heindl, M. R.; Limburg, H.; Lam, van T. V.; Pilgram, O.; Moulton, H.; Stein, D.A.; Harges, K.; Eickmann, M.; Dolnik, O.; Rohde, C.; Klenk, H.-D.; Garten, W.; Steinmetzer, T.; Böttcher-Friebertshäuser, E. (2020): TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation and spread of SARS-CoV-2 in human airway epithelial cells and provide promising drug targets. *Life Sci. Alliance* 3(9): e202000786.

Hammami, M.; Rühmann, E.; Maurer, E.; Heine, A.; Gütschow, M.; Klebe, G.; Steinmetzer, T. (2012): New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase. *Med. Chem. Comm.* 7(3): 807-813.

Hoffmann, M.; Kleine-Weber, H.; Schroeder, S.; Krüger, N.; Herrler, T.; Erichsen, S.; Schiergens, T. S.; Herrler, G.; Wu, N.-H.; Nitsche, A.; Müller, M. A.; Drosten, C.; Pöhlmann, S. (2020): SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* 181(2): 271-280.

Steinmetzer, T.; Harges, K. (2018): The Antiviral Potential of Host Protease Inhibitors. In: Böttcher-Friebertshäuser, E.; Garten, W.; Klenk, H. D. (eds): *Activation of viruses by host proteases*, 1st ed. Marburg, Németország, 279-325.

Pászti-Gere, E.; Szentkirályi-Tóth, A; Szabó, P; Steinmetzer, T; Fliszár-Nyúl, E; Poór, M (2022): In vitro characterization of the furin inhibitor MI-1851: Albumin binding, interaction with cytochrome P450 enzymes and cytotoxicity. *Biomed. Pharmacother.* 151:113124.

A beszámolót készítette: Pásztiné Gere Erzsébet