

PEPTID-KONJUGÁTUMOK: ÚJ TÍPUSÚ FEGYVEREK A MULTIREZISZTENS BAKTÉRIUMOK ELLEN¹

Horváti Kata
MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport
e-mail: khorvati@elte.hu

Összefoglalás

A klinikai használatban lévő gyógyszerekre rezisztens patogének terjedése korunk egyik legnagyobb egészségügyi kihívását jelentik. A cikkben összefoglalom a kutatás-fejlesztés legfontosabb törekvéseit és ismertetem az antimikrobiális rezisztencia ellen irányuló kutató munkánk legújabb eredményeit.

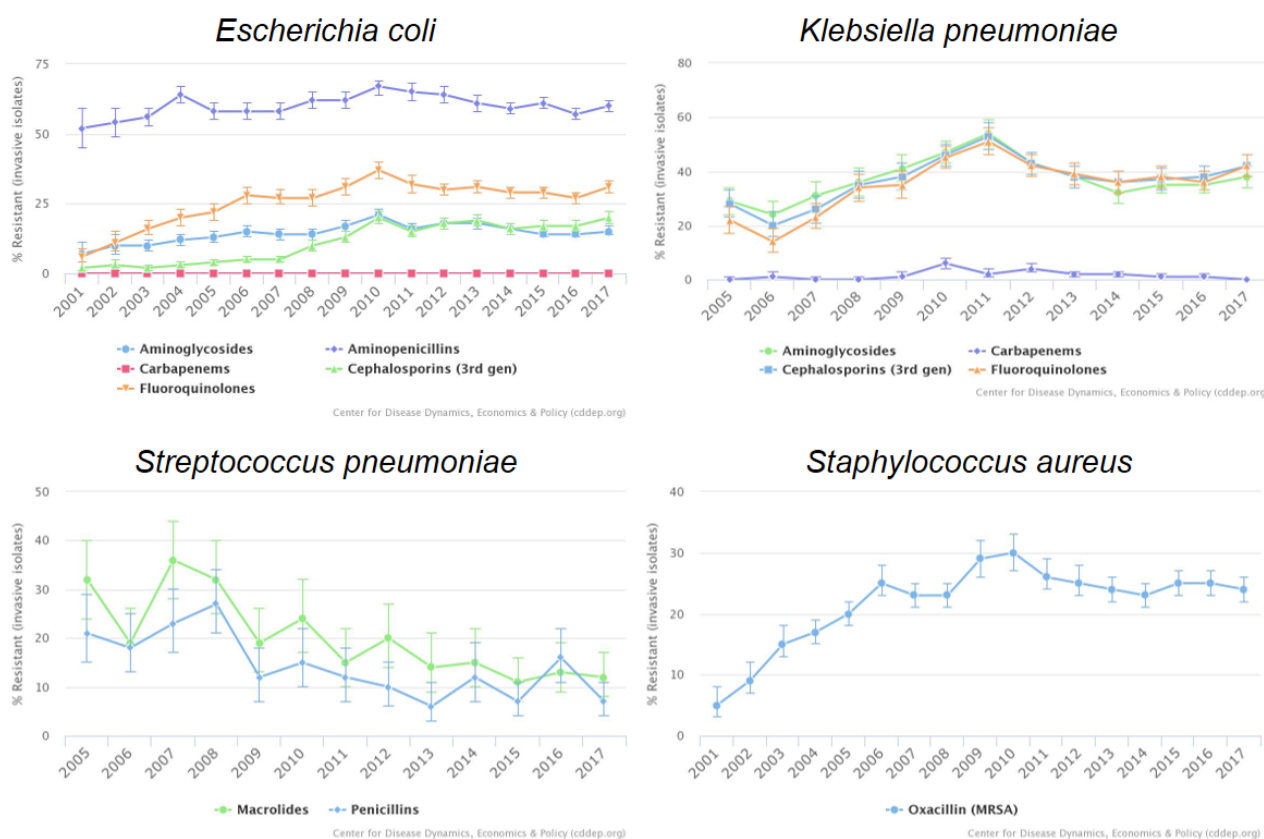
Bevezetés

Az antimikrobiális szerekre rezisztens, illetve multirezisztens baktériumtörzsek megjelenése és terjedése egyre riasztóbb méreteket ölt és arányuk folyamatosan növekszik (1. ábra). Antimikrobiális rezisztencia természetes úton is kialakulhat a kórokozók genetikai módosulásával, de a helytelen gyógyszerhasználat miatt ez a folyamat jelentősen felgyorsult. Fontos megemlíteni, hogy a humán alkalmazás mellett az állatorvosi gyógyszerhasználat, illetve a környezet fertőtlenítésére használt szerek is nagyban hozzájárulnak a rezisztencia terjedéséhez.

Az antimikrobiális rezisztenciát 4 csoportra oszthatjuk, melyek közül az antibakteriális rezisztencia a leggyakoribb. Emellett a gombák (pl. Candidiasis), paraziták (pl. malária) és vírusok (pl. HIV) okozta megbetegedések esetén is megjelent a hatóanyag-rezisztencia. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) legfontosabb feladatai között tartja számon az antimikrobiális rezisztencia elleni küzdelmet. Jelentéseikben a leggyakrabban előforduló rezisztens baktériumok

¹ Horváti Kata az MTA Prémium posztdoktori kutatói program hároméves támogatását nyerte el, lásd *Biokémia XLIV. ÉVFOLYAM 3. SZÁM 2019. szeptember, 3. oldal (a szerkesztőbizottság megjegyzése).*

az *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* és *Salmonella* spp [1]. Gyakori megbetegedések, mint például a tüdőgyulladás, urológiai betegségek és posztoperatív fertőzések kezelése válik lehetetlenné a multirezisztens törzsek terjedése miatt.



1. ábra. Antibiotikum rezisztencia Magyarországon négy kiválasztott baktérium esetében. Forrás: The Center for Disease, Dynamics Economics & Policy. ResistanceMap: Antibiotic resistance. 2019.

A WHO külön munkacsoportokban foglalkozik a HIV, malária és tuberkulózis betegségekkel. A tuberkulózis a legtöbb halálos áldozatot (évente 1,8 millió) követelő, egyedi baktérium okozta fertőző betegség napjainkban. A 10 millió új megbetegedésből évente közel félmillió a rezisztens baktérium okozta esetek száma (2. ábra). A rezisztens törzsek 78%-a multirezisztens, tehát a kórokozó egyszerre rezisztens a két leggyakrabban alkalmazott antibakteriális szerre (Rifampicin és Isoniazid). A multirezisztens tuberkulózis (MDR-TB) kezelése hosszabb, költségesebb, jóval több mellékhatással jár és a hatékonysága is

rosszabb. Az MDR-TB esetek mindössze felénél (52%) volt eredményes a terápia [2].



2. ábra. Multirezisztens tuberkulózis előfordulása az újonnan diagnosztizált esetek között (%). Forrás: WHO Regional Office for Europe/European Centre for Disease Prevention and Control. Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe 2019 – 2017 data.

A sikeres terápia érdekében szükséges, hogy újabb hatóanyagokat fejlesszünk és vonjunk be a kezelésbe (1. táblázat), viszont az újonnan kifejlesztett gyógyszerekkel szemben is gyorsan kialakulhat rezisztencia. Ez a tény nagyban visszaveti a klasszikus antibakteriális szerek gyógyszeripari fejlesztését [3].

Kutatás-fejlesztés az antimikrobiális rezisztencia ellen

A rezisztens baktériumok ellen hatékonyan küzdhetünk: (i) védőoltásokkal, (ii) terápiás vakcinákkal és (iii) új típusú hatóanyagokkal, melyekre csak korlátozott mértékben alakul ki rezisztencia. Mindhárom csoportban találunk peptid-alapú vegyületeket. Jelenleg 150-nél több peptid-alapú vegyület van aktív klinikai fejlesztés alatt és a vegyületek közel fele elérte a fázis II. vizsgálatokat [4-5].

(i) A fertőző betegségek elleni védekezés leghatékonyabb fegyvere a védőoltás. Vannak azonban olyan baktériumok, melyek ellen jelenleg nincs védőoltás, de

gyakran megjelennek az antibiotikum rezisztens légúti megbetegedések és krónikus fertőzések kórokozójaként (pl. *Staphylococcus*ok, *P. aeruginosa*). Fontos megemlíteni, hogy a jelenleg alkalmazott BCG védőoltás hatása sem optimális és felnőttkorban már nem véd a tuberkulózis ellen [6]. Specifikusan ezekre a törzsekre kifejlesztett vakcinákkal hatékonyan küzdhetünk a rezisztencia terjedése ellen [7].

1. táblázat. WHO által meghatározott prioritási sorrend az antibakteriális hatóanyagok kutatás-fejlesztése számára.

Prioritás	Baktérium	Rezisztencia
Kritikus	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Karbapenem-rezisztens
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Karbapenem-rezisztens
	<i>Enterobacteriaceae</i>	Karbapenem-rezisztens, ESBL-termelő
Magas	<i>Enterococcus faecium</i>	Vankomicin-rezisztens
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Methicillin-rezisztens, Vankomicin-rezisztens
	<i>Helicobacter pylori</i> ,	Klarithromicin-rezisztens
	<i>Campylobacter spp.</i>	Fluoroquinolon-rezisztens
	<i>Salmonellae</i> ,	Fluoroquinolon-rezisztens
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cephalosporin-rezisztens, Fluoroquinolon-rezisztens
Közepes	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penicillinre nem-érzékeny
	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicillin-rezisztens
	<i>Shigella spp</i>	Fluoroquinolon-rezisztens

Forrás: WHO (2017) Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.

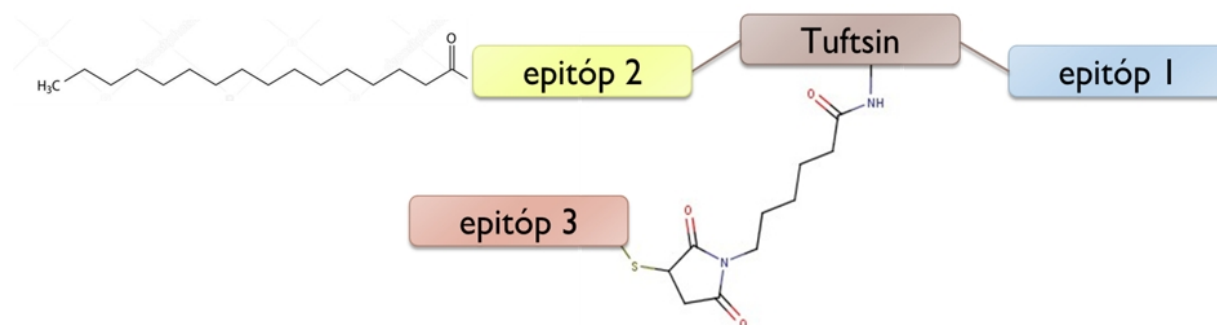
(ii) Azokban az esetekben, ahol a profilaktikus védőoltások nem alkalmazhatóak (pl. egészséges működésben is részt vevő baktériumok), illetve ahol a baktérium el tud „bújni” a gazdaszervezetben (pl. *Mycobacterium tuberculosis*), a fertőzést követő terápiás vakcinálás jó alternatívát nyújthat [6]. Az irodalomban nagyszámban találunk újonnan azonosított antigén szekvenciákat, melyeket peptidkémiai módszerek segítségével olyan formába tudunk hozni, hogy alkalmasak legyenek az immunterápiára.

Peptid-alapú vakcina jelöltek a tuberkulózis ellen

A tuberkulózis kórokozója nagy antigén-diverzitást, illetve általános változékonyságot mutat (aktív-dormans állapot, normál-csökkent metaboliz-

mus, extracelluláris-intracelluláris létforma stb.), ami igen megnehezíti a betegség elleni védekezést. A tuberkulózis esetében nagy jelentőséggel bírnak azok az oltóanyag jelöltek, melyek egy preparátumban többféle immundetermináns részt is tartalmaznak, így váltva ki egy általánosabb, hatékonyabb immunválaszt a változékony kórokozó ellen.

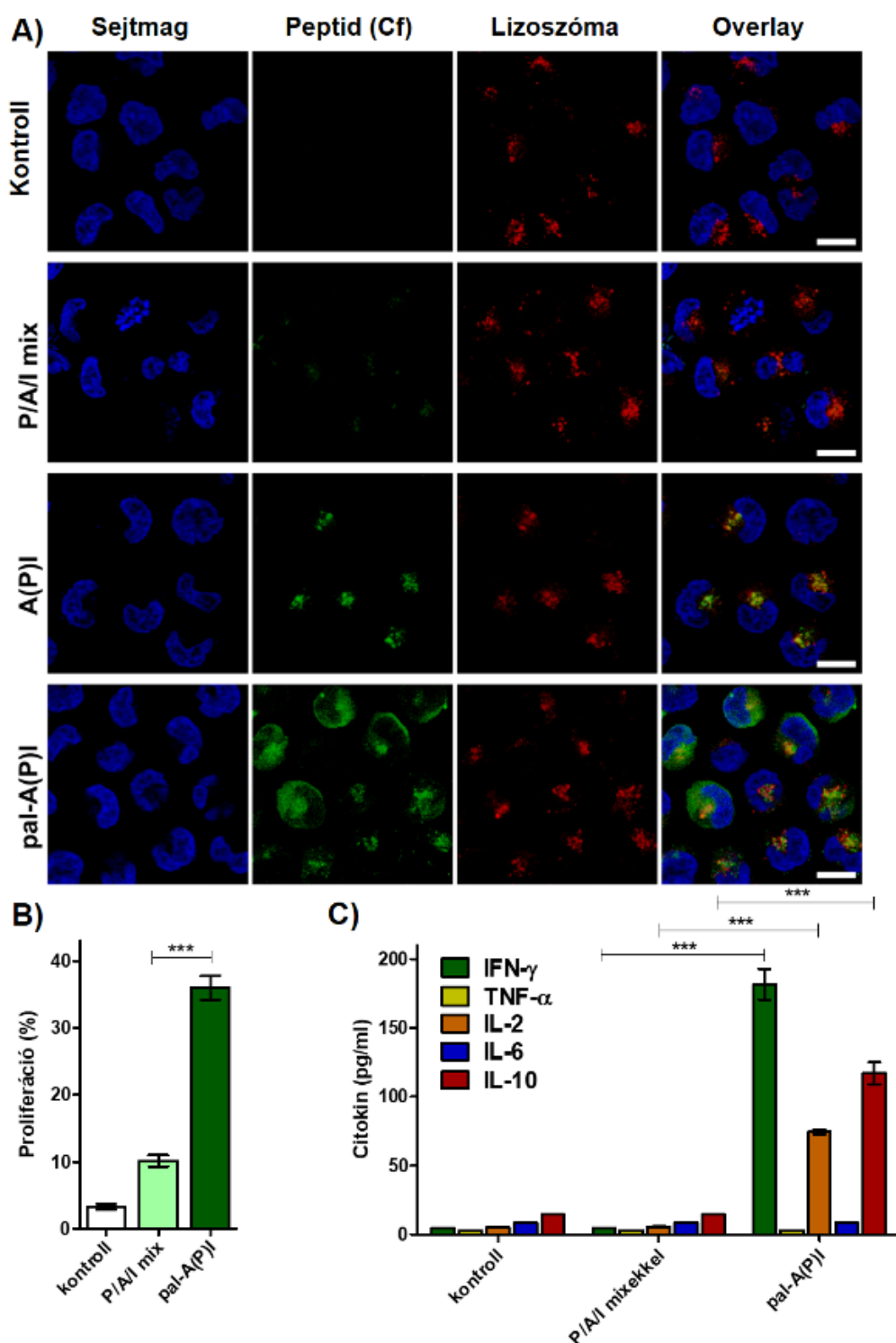
Kutatásaink arra irányulnak, hogy olyan konjugátumokat állítsunk elő, melyek egy molekulán belül 3 immundetermináns részt (T-sejt epitópot) tartalmaznak. Az epitópok a *Mycobacterium tuberculosis* által termelt immundomináns fehérjékből származtathatóak (PPE68, Ag85B és IniB) és kemoszelektív ligációs technikák alkalmazásával egy peptid-hordozóhoz kapcsolódnak (3. ábra). A konjugálás célja az, hogy növelni tudjuk az epitóp peptidek sejtbejutását és immunogenitását is [9].



3. ábra. Kutatásaink során előállított multi-epitóp konjugátumok általános szerkezete.

Kísérleteink igazolták, hogy az alkalmazott konjugációs eljárás többszörösére növelte az epitóp peptidek sejtbejutását (4. ábra). A következőkben a konjugátumok immunogenitását vizsgáltuk. CB6F1 egereket háromszor beoltottuk (*subcutan*) a konjugátummal, illetve a megfelelő kontrollokkal, majd a lépből izolált T-sejtek proliferációs választ vizsgáltuk áramlási citométerrel, illetve egy gyöngy-alapú citokin esszével (LEGENDplex Mouse Th Cytokine Panel, BioLegend). Az eredmények alapján levonhatjuk azt a következtetést, hogy a konjugátumokkal történt immunizálást követően szignifikánsan nagyobb immunválaszt kaptunk, mint önmagukban az epitóp peptidek esetében (4. ábra). Kidolgoztunk tehát egy olyan konjugálási eljárást, melynek segítségével

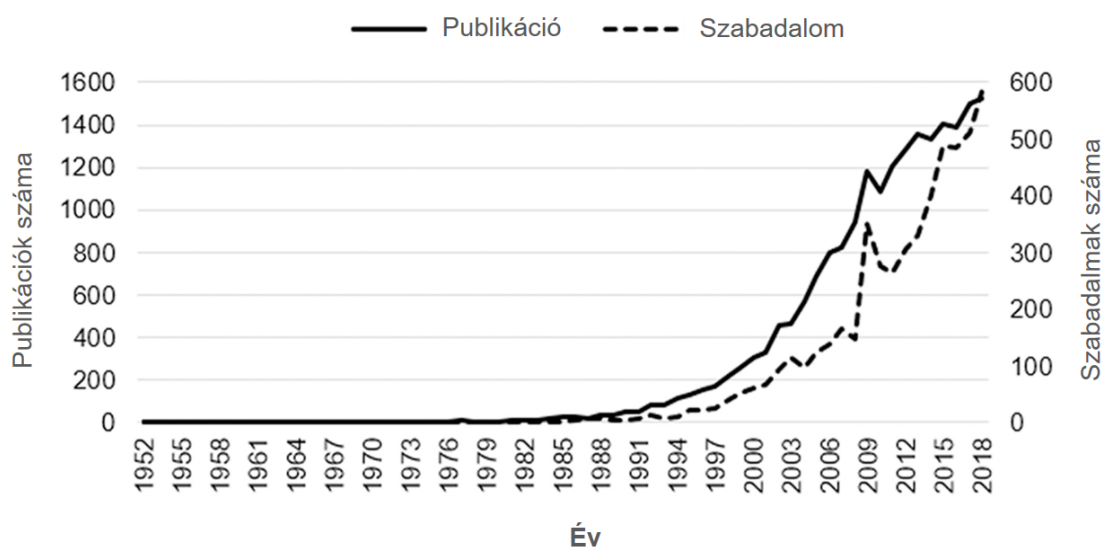
növelhető az epitóp peptidek immunogenitása és ez az eljárás más korokozóhoz köthető epitópokra is alkalmazható lehet a jövőben [9].



4. ábra. Vakcina-konjugátumok sejtbejutása és immunogenitása. Konfokális mikroszkópos felvételek az epitóp peptidek keverékével (P/A/I mix) és a konjugátummal (pal-API) kezelt MonoMac-6 sejtekről (A). Az immunizált egerek lépsejtjeinek antigén-specifikus proliferációja (B) és a sejtek citokin válasza (C).

Antimikrobiális peptidek

A törzsfejlődés legősibb védekező mechanizmusaiban vesznek részt az antimikrobiális peptidek (AMP). Az AMP-k többmillió éve fejtik ki hatásukat a mikróbák ellen, rezisztencia azonban nem, vagy csak korlátozott mértékben alakul ki velük szemben. Kézenfekvő, hogy ezeket a peptid típusú vegyületeket használjuk a klinikumban a rezisztens baktériumok ellen [8]. A természetben található szekvenciák azonban nem alkalmazhatóak közvetlenül a terápiában, mert gyakran nem elég szelektívek, hemolitikus és citotoxikus mellékhatásaik vannak és gyorsan lebomlanak a szervezetben. Fontos kutatási terület ezért, hogy a természetes AMP-ket módosítsuk pl. nem-természetes aminosavak, foldamerek beépítésével, illetve formulázzuk azokat a jobb biodisztribúció elérése érdekében. A terület fontosságát jelzi, hogy jelenleg számos peptid-alapú antibakteriális vegyület vizsgálata van klinikai fázisban (5. ábra).

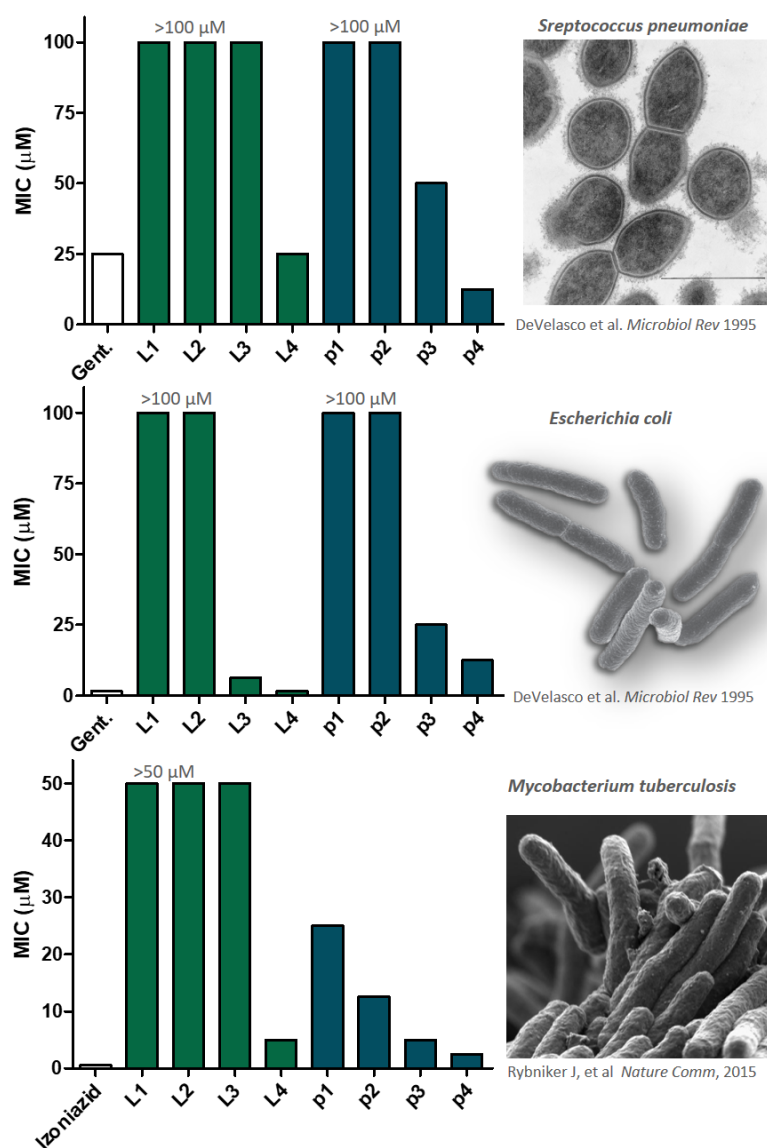


5. ábra. Antimikrobiális peptidekkel foglalkozó publikációk és szabadalmak száma (évenkénti megjelenés). Forrás: *Peptide Science*, **2019**: 111(5).

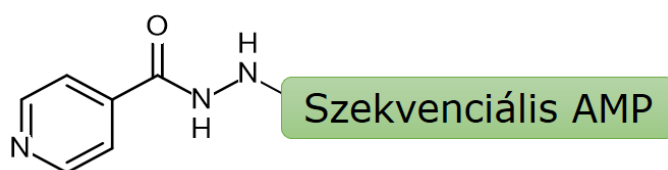
Kutatásaink során kiemelkedő antimikrobiális hatással rendelkező szekvenciális oligopeptideket fejlesztettünk, melyek hatékonynak bizonyultak Gram -, Gram + baktériumok, valamint mycobacteriumok ellen is (6. ábra).

Az újonnan fejlesztett szekvenciális oligopeptideket hordozóként is alkalmaztuk

és egy régebbi munkánkban kidolgozott szintézismódszer [10] segítségével Izoniazid hatóanyag konjugálására használtuk.



6. ábra. Újonnan fejlesztett szekvenciális oligopeptidek antibakteriális hatása és a baktériumok mikroszkópos és elektronmikroszkópos képe. (Gent: Gentamycin, L1-p4: a peptidek kódja).



7. ábra. Az Izoniazid-peptid konjugátumok szerkezete.

Így olyan peptid-konjugátumokhoz jutottunk, melyek egy molekulán belül kétféle hatásmechanizmussal rendelkeznek: az antibakteriális peptid sejtfal roncsoló hatása kombinálódik a kismolekula intracelluláris hatásával.

A vegyületeket *M. tuberculosis* baktériummal fertőzött monocita típusú sejteken, mint makrofág modellen vizsgáltuk.

Kísérleteink bizonyították, hogy míg a szabad Isoniazid hatástalan az intracelluláris baktérium ellen, az AMP-vel konjugált forma nagymértékben hatásos [11-12]. Jövőbeni terveink között szerepel ezeknek a vegyületeknek a tesztelése rezisztens és multirezisztens baktérium kultúrákon, valamint vizsgálni kívánjuk az esetlegesen kialakuló rezisztencia mechanizmusát is.

Irodalomjegyzék

- [1] Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014. World Health Organization; 2014.
- [2] Global tuberculosis report 2019. Geneva: World Health Organization; 2019.
- [3] Theuretzbacher, U. et al. (2019) Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. *Lancet Infect Dis*, **19 (2)**: e40-e50.
- [4] Lau, J.L., Dunn, M.K. (2018) Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions. *Bioorg Med Chem*, **26 (10)**: 2700-7.
- [5] Mok, W.W., Li, Y. (2014) Therapeutic peptides: new arsenal against drug resistant pathogens. *Curr Pharm Des*, **20 (5)**: 771-92.
- [6] Kaufmann, S.H., Hussey, G., Lambert, P.H. (2010) New vaccines for tuberculosis. *Lancet*, **375 (9731)**: 2110-9.
- [7] Jansen, K.U., Knirsch, C., Anderson, A.S. (2018) The role of vaccines in preventing bacterial antimicrobial resistance. *Nat Med*, **24 (1)**: 10-19.
- [8] Nuti, R., Goud, N.S., Saraswati, A.P., Alvala, R., Alvalam M. (2017) Antimicrobial Peptides: A promising therapeutic strategy in tackling antimicrobial resistance. *Curr Med Chem*, **24 (38)**: 4303-14.
- [9] Horváti, K., Pályi, B., Henczkó, J., Balka, G., Szabó, E., Farkas, V.,

- Biri-Kovács, B., Szeder, B., Fodor, K. (2019) A convenient synthetic method to improve immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* related t-cell epitope peptides. *Vaccines*, **7 (3)**: E101.
- [10] Horváti, K., Mező, G., Szabó, N., Hudecz, F., Bősze, S. (2009) Peptide conjugates of therapeutically used antitubercular isoniazid-design, synthesis and antimycobacterial effect. *J Pept Sci*, **15 (5)**: 385-91.
- [11] Horváti, K., Bacsa, B., Kiss, E., Gyulai, G., Fodor, K., Balka, G., Rusvai, M., Szabó, E., Hudecz, F., Bősze, S. (2014) Nanoparticle encapsulated lipopeptide conjugate of antitubercular drug isoniazid: *in vitro* intracellular activity and *in vivo* efficacy in a Guinea pig model of tuberculosis. *Bioconjug Chem*, **25 (12)**: 2260-8
- [12] Horváti, K., Bacsa, B., Mlinkó, T., Szabó, N., Hudecz, F., Zsila, F., Bősze, S. (2017) Comparative analysis of internalisation, haemolytic, cytotoxic and antibacterial effect of membrane-active cationic peptides: aspects of experimental setup. *Amino Acids*, **49 (6)**: 1053-67.



Horváti Kata az Eötvös Loránd Tudományegyetemen végzett 1998-ban okleveles vegyészként. Doktori munkáját Bősze Szilvia témavezetésével az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoportban végezte, melynek azóta is tagja. 2015-2018 között Bolyai János Kutatási Ösztöndíjas volt, 2019-től MTA Prémium Posztdoktori kutató. 2017-ben elnyerte az Akadémiai Ifjúsági Díjat. A 2019-ben induló BactiVax konzorcium tagja (H2020-MSCA-ITN), melynek fő kutatási célja multirezisztens baktériumok elleni vakcinák fejlesztése.