

Biológiailag aktív β -karbolin vegyületek humán szérumfehérje kötődésének vizsgálata spektroszkópiai, kromatográfiás és *in silico* módszerek alkalmazásával

Doktori értekezés tézisei

Nagy-Domonkos Celesztina Diána

okleveles vegyész



**Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Kémia Doktori Iskola, Szintetikus kémia, anyagtudomány és
biomolekuláris kémia doktori program**

A doktori iskola vezetője: Dr. Inzelt György (D.Sc.)

Programvezető: Dr. Perczel András (D.Sc.)

Témavezető: Benéné Dr. Visy Júlia (C.Sc.)

Konzulens: Dr. Zsila Ferenc (Ph.D.)

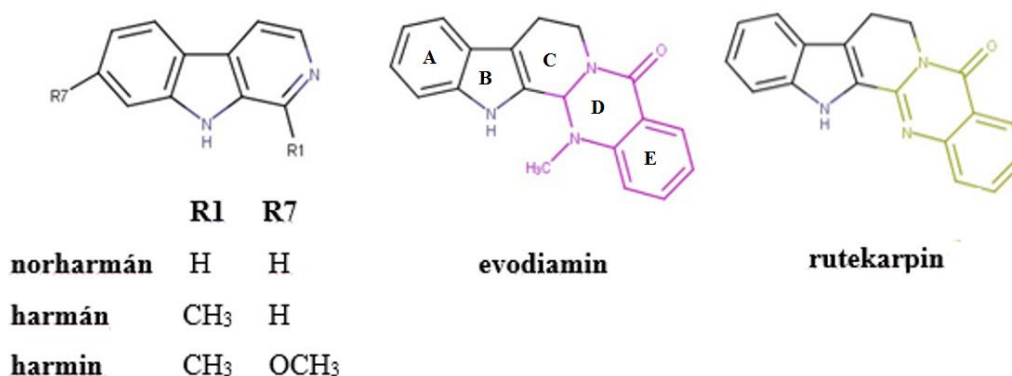
**MTA Természettudományi Kutatóközpont, Szerves Kémia Intézet, Kémiai
Biológia Kutatócsoport**

Budapest, 2015.

1. Bevezetés

A konvencionálisan alkalmazott gyógyszerek esetében jelentkező rezisztencia, valamint az orvostudomány egyre szaporodó megoldatlan problémáinak következtében a természetes anyagok gyógyászatban betöltött szerepe az elmúlt néhány évben ismét jelentősen előtérbe került. Sokrétű farmakológiai aktivitásuknak, valamint változatos szerkezetüknek köszönhetően felismerték, hogy ígéretes kiegészítő vegyületi lehetnek a hagyományos gyógyszeres terápiának, új kiindulási vegyületként szolgálhatnak gyógyszerjelölt molekulák kifejlesztéshez, kombinatorikus kémiai vegyülettárak szintéziséhez vagy akár eddig ismeretlen hatásmechanizmusok felfedezéséhez.

Napjainkban, a kutatások egyik reményteli területeként az indol alkaloidok családjába tartozó β -karbolinokat tartják számon, melyek gyakran tanulmányozott csoportjaként a triciklusos (norharmán (NH), harmán (HH), harmin) és pentaciklusos (evodiamin (EVD), rutekarpin (RTK)) gyűrűrendszerű β -karbolinokat említhetjük.



Az egyszerű és összetett gyűrűrendszerű β -karbolinok szerkezete

A természetben főként a hagyományos távol-keleti orvoslásban alkalmazott növények alkotóelemeiként lelhetők fel, de néhány β -karbolin indol származékokból történő egyszerű képződésük révén több étel, ital komponenseként vagy akár az élő szervezet endogén ligandumaiként is előfordulhat (NH, HH). Érdeemes megemlíteni, hogy az EVD a nyugati országokban számos táplálékkiegészítő készítmény fő összetevőjeként is elérhető. Szerteágazó biológiai aktivitással rendelkeznek, amelynek köszönhetően az öngyógyítás mellett, az orvostudomány és a gyógyszerkutatás fontos eszköztárát képezik, annak ellenére, hogy pontos hatásmechanizmusaik, szerkezeti és farmakokinetikai tulajdonságaik nem teljesen ismertek. Ennek egyik oka, hogy a kutatások többsége főként molekuláris célpontjaikkal (nukleinsavak, enzimek) alkotott interakcióik feltárására összpontosít, így egyéb szervezetbeni sorsukat

befolyásoló makromolekulákkal szembeni viselkedésükről csak kevés és hiányos információ áll rendelkezésünkre. Élettani tulajdonságaik előrejelzését tovább nehezíti, hogy néhány képviselőjük akár racém formában is előfordulhat a természetben, de a farmakológiai vizsgálatok során a biológiailag aktív enantiomer azonosítására ritkán, míg a mellette jelenlevő hatástalan vagy akár toxikus mellékhatást mutató forma sajátosságainak részletes felderítésére nem térnek ki.

Az élettanilag aktív vegyületek szervezetbeni sorsát, a felszívódásra, szöveti megoszlásra, metabolizmusra és eliminációra vonatkozó kinetikai történések (ADME) együttese határozza meg. Közülük az egyik fontos tényező a megoszlás folyamata, mely során a hatóanyag a vér makromolekuláihoz reverzibilisen kötődve a keringésből a célszervekhez jut. A folyamatban jelentős szerepet a szérum két komponensének a humán szérum albuminnak (HSA) és az α_1 -savas glikoproteinnek (AGP) tulajdonítanak. Az emberi vérplazma fehérjekoncentrációjának számottevő részét a helikális szerkezetű HSA adja ($\sim 600 \mu\text{M}$), amely meghatározó szerepet tölt be kémiaailag változatos exogén (gyógyszerek) és endogén anyagok (zsírsavak, hormonok, epesavak, toxikus metabolitok) szállításában. Több jól ismert kötőhellyel rendelkezik zsírsavak, szerves vegyületek és fémionok számára. Az apoláris szerves kismolekulák részére három egymástól jól elkülönülő hidrofób kötőzseb érhető el. Jellegzetes ligandumaiként a savas és semleges karakterrel rendelkező molekulákat említhetjük. A természetes eredetű β -karbolinok közül a NH és HH HSA kötődését már tanulmányozták, de az eredmények, mind az asszociációs állandók, mind a kötőhely tekintetében ellentmondásosnak bizonyultak. Így az albumin ezen alkaloidokkal szembeni affinitásának kiderítésével, nemcsak hogy bővíthetjük és tisztázhatjuk a β -karbolin vegyületek szervezetbeni megoszlását befolyásoló tényezőkről szerzett ismereteket, de a kölcsönhatások molekuláris hátterének feltárásával elősegíthetjük az albumin kevésbé ismert alkaloid kötő képességének részletes megismerését is.

A HSA mellett a szérum másik jelentős gyógyszerkötő fehérjéjeként az AGP-t említhetjük. Kötőüregét egy mély, hidrofób β -hordó reprezentálja, amely javarészt aromás, bázikus karakterű molekulák kötődésének kedvez. Átlagos koncentrációja a vérben albuminhoz képest jóval alacsonyabb ($\sim 20 \mu\text{M}$), de akut fázisos reakciók során (pl. sérülés, gyulladás, fertőzések, rákos megbetegedések) mennyisége jelentősen megemelkedik ($\sim 60\text{-}100 \mu\text{M}$) míg az albuminé lecsökken ($\sim 250\text{-}300 \mu\text{M}$). Így bizonyos kóros folyamatokban az AGP a szervezet egyik jelentős molekulakötő fehérjéjévé léphet elő. Emellett nem szabad figyelmen kívül hagyni, hogy a vérplazmában az AGP három fő genetikai variánsának (F1, S és A) keverékeként fordul elő, mely frakciók eltérő gyógyszerkötő képességgel rendelkeznek. Különböző megbetegedésekben az AGP plazmaszintjének növekedéséhez a variánsok nem egyenlő

mértékben járulnak hozzá, így a biológiailag aktív vegyületek farmakológiai vizsgálatánál az AGP polimorfizmusát fontos szem előtt tartani.

A szabadgyógyszer-elmélet értelmében a hatóanyag-plazmafehérje komplex nem tud a célszervek membránján áthaladni, következésképpen terápiás cél elérésére és farmakodinámiás hatás kifejtésére kizárólag a vegyületek szabad frakciója képes. Továbbá, a fehérjekötődés a kölcsönhatás erősségétől függően befolyásolhatja a vegyületek metabolizmusát, toxicitását, valamint nem várt gyógyszerinterakciókat idézhet elő. Így a β -karbolinok szállítófehérjékkel szembeni viselkedésének részletes vizsgálatával nemcsak, hogy becsülni tudjuk a vegyületek élettani hatásért felelős szabad plazmakoncentrációját, de kölcsönhatásaik jellegének tanulmányozásával lehetőségünk nyílik a kötődésben kulcsszerepet játszó szerkezeti tényezők mélyebb megismerésére is.

2. Célkitűzés

Doktori munkám során, kutatásaimban a biológiailag aktív természetes és a Servier Gyógyszerkutató Intézet fejlesztése alatt levő szintetikus β -karbolin analógok plazmafehérjékkel szembeni viselkedésének vizsgálatára összpontosítottam. Kromatográfiai, spektroszkópiai és *in silico* módszerek alkalmazásával tanulmányozni kívántam ezen vegyületek HSA-val és AGP-vel alkotott kölcsönhatásait, amely során célom volt, hogy:

- meghatározom a β -karbolin-szérumfehérje asszociációt jellemző paramétereket (asszociációs egyensúlyi állandó (K_a), sztöchiometria),
- jelzőligandumokkal végzett kötődésvizsgálatokban azonosítom és jellemezzem ezen alkaloidok specifikus HSA kötőhelyét,
- szerkezet-kötődési affinitás összefüggéseket állítsak fel,
- vizsgáljam, hogy az albumin zsírsavkötési profilja, milyen módon befolyásolja az egyszerű gyűrűrendszerű β -karbolin (NH, HH) vegyületek HSA kötődését,
- feltárjam és egymáshoz rendeljem az EVD és RTK molekulák szerkezetében rejlő strukturális és spektrális jellemzőket,
- meghatározom és következtetéseket vonjak le a tiszta EVD enantiomerek plazmafehérjék jelenlétében megvalósuló kötőkonformációjára,
- albumin és AGP kristályszerkezetének felhasználásával szerkezetalapú fehérje-ligandum dokkolásokat hajtsak végre, amelyből származó információk lehetővé teszik a kötődésért felelős farmakofór pontok azonosítását, valamint a kölcsönhatások molekuláris szintű megismerését.

3. Vizsgálati módszerek

3.1. Felhasznált anyagok

A HSA, AGP, NH és (\pm)-EVD Sigma-Aldrich termékek voltak. A RTK-t az AK Scientific cégtől vásároltuk. A felhasznált tiszta AGP genetikai variánsokat irodalomból ismert fém-affinitás kromatográfia segítségével szeparáltuk. A HH-t, harmin-t és szintetikus analógjaikat a Servier Kutatóintézetből, Dr. Kotschy András bocsájtotta rendelkezésünkre: **[b1]**: 7-isopropoxi-1-metil-9H-pirido[3,4-b]-indol, **[b2]**: 1-metil-7-(1-fenil-etoxi)-9H-pirido[3,4-b]-indol, **[b3]**: 1-metil-7-(2-piridil-metoxi)-9H-pirido[3,4-b]-indol, **[b4]**: 1-metil-7-[2-(2-piridil)-etoxi]-9H-pirido[3,4-b]-indol, **[b5]**: 9-benzil-7-metoxi-1-metil-pirido[3,4-b]-indol, **[b6]**: 7-metoxi-9-[(3-metoxi-fenil)-metil]-1-metil-pirido[3,4-b]-indol, **[b7]**: 7-metoxi-1-metil-9-[[4-(trifluoro-metil)-fenil]-metil]-pirido[3,4-b]-indol, **[b8]**: 7-metoxi-1-metil-9-[1-[4-(trifluoro-metil)-fenil]-etil]-pirido[3,4-b]-indol, **[b9]**: 7-metoxi-1-metil-9-[2-[4-(trifluoro-metil)-fenil]-etil]-pirido[3,4-b]-indol.

3.2. Immobilizált HSA-affinitás kromatográfia

A kötődési egyensúlyi állandók értékének becslésére, valamint a relatív kötődési különbségek, mint szubsztituens hatás és sztereoselektív kölcsönhatások feltárására alkalmaztuk.

3.3. Ultraszűrés

A (\pm)-EVD sztereoselektív szérumfehérje kötődésének kimutatására használtuk. A szűrletben a minta összetételét királis HPLC technikával határoztuk meg.

3.4. Királis HPLC analízis

Irodalomból ismert metodika alkalmazásával az EVD enantiomerek szétválasztására, a racemát fehérjés oldatának ultraszűrletében az enantiomer arány megállapítására, valamint affinitás kromatográfiával szeparált enantiomereinek azonosítására vettük igénybe.

3.5. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A β -karbolinok szérumfehérje kötődését jellemző paraméterek meghatározásához, specifikus HSA kötőhelyük tisztázásához, valamint az EVD enantiomerek kiroptikai tulajdonságainak megismeréséhez alkalmaztuk. Előbbi esetben az alkaloidok fehérje jelenlétében indukálódó CD (ICD) aktivitását mértük, míg ligandum leszorítás kísérletekben, a vizsgált vagy referencia vegyületek ICD jeleinek változásait követtük. A változó

ligandum/fehérje arány függvényében mért ICD aktivitás nemlineáris regressziós analízisét Microcal Origin 8.6 programmal végeztük.

3.6. *(R)-EVD CD spektrumának kvantumkémia számítása*

A molekula alacsony energiájú konformereinek meghatározásához, az EVD ismert kristályszerkezetét alapul véve konformáció analízist végeztünk Marvin 6.3.0. (Conformer plugin, ChemAxon) program segítségével. A számítás eredményeként kapott alacsony energiájú konformerek CD spektrumait DFT szinten, COSMO (Conductor-like Screening Model) oldószer modell alkalmazásával Turbomole v6.5 programmal számítottuk.

3.7. *Fluoreszcencia spektroszkópia*

A kötődést jellemző asszociációs állandók értékének meghatározásához a triciklusos β -karbolinok saját fluoreszcenciájának fehérje jelenlétében bekövetkező változását, valamint az összetett gyűrűrendszerű EVD és RTK esetében a fehérje kötődés során indukálódó emissziót detektáltuk. A kötőhelyek azonosításához a fehérje, valamint specifikus jelzőanyagok fluoreszcenciájának kioltását mértük a vizsgált vegyület koncentrációjának függvényében. Az adatok nemlineáris regressziós analíziséhez Microcal Origin 8.6 programot használtunk.

3.8. *Molekulamodellzési vizsgálatok*

Dokkolásokat minden esetben a DockingServerrel hajtottuk végre, ahol a HSA és az AGP fehérje adatbázisból elérhető kristályszerkezeteit használtuk. A dokkolási eredményeket a PyMOL program segítségével jelenítettük meg.

4. Új tudományos eredmények és azok jelentősége

1.) Megvalósítottuk az egyszerű gyűrűrendszerű természetes β -karbolinok (NH, HH), 1:1 sztöchiometriájú szérumfehérje kötődésének biofizikai módszerekkel történő kimutatását. Kompetitív kötődési kísérletekkel azonosítottuk a IIIA alegységben elhelyezkedő HSA kötőhelyüket. Molekulamodellezés vizsgálatokkal feltártuk a kölcsönhatás molekuláris részleteit, miszerint az alkaloidok a IIIA kötőrégióban, az egyik nagy affinitású zsírsavkötőhellyel átfedésben, π - π kölcsönhatások (Tyr411, Phe488) és hidrogénkötések révén stabilizálódnak. Kimutattuk, hogy míg a NH mérsékelten erős ($K_a \sim 1.7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) és a HH gyenge ($K_a \sim 2.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) komplexet képez az albuminnal, addig AGP kötődésük elhanyagolható mértékű. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy szerkezetbeni megoszlásukért a vérplazma nagy részét alkotó albumin lehet a felelős.

2.) Tanulmányoztuk az albumin fontos endogén ligandumaiként számon tartott telített és telítetlen táplálkozási zsírsavak (FA) β -karbolin-HSA kötődésre gyakorolt hatását, amelyben a CD és fluoreszcencia spektroszkópiát alkalmazva β -karbolin-zsírsav-albumin terner komplexek kialakulását igazoltuk. A HSA és β -karbolinok között olyan korábban nem ismert lipid modulálta kölcsönhatást tártunk fel, ahol a FA-ak kooperatív allosztérikus mechanizmus révén a NH és HH HSA-val szembeni affinitásának számottevő erősödését (~ 3 - 10 -szeres erősödés) eredményezték. Kimutattuk, hogy a FA-ak a β -karbolin-HSA komplexhez tartozó indukált CD jelek inverzióját, valamint a fluoreszcencia spektrumban a kötött ligandumhoz tartozó alacsony kvantumhatásfokú emissziós sáv intenzitásának növekedését idézik elő, amely szintén IIIA kötőhelyen megvalósuló együttes kötődésükre utal. Molekulamodellezés vizsgálatokkal feltártuk, hogy a jelenség háttérében az alkaloidok megváltozott kötődési módja áll. A kapott eredmények tükrében megállapítottuk, hogy ezen β -karbolin mintázatot viselő vegyületek farmakológiai aktivitásért felelős szabad szérumszintje erősen függ az albuminhoz egyidejűleg kötődő zsírsavak számától és szerkezetétől.

3.) A Servier Gyógyszerkutató Intézettel folytatott együttműködésben vizsgáltuk több, új típusú, bioizoszter helyettesítéssel előállított harmin származék plazmafehérjéjével szembeni viselkedését, melynek eredményeként szubsztituens függő albumin és AGP kötődéseket azonosítottunk. Szerkezet-kötődési affinitás összefüggéseket felállítva megállapítottuk, hogy az alapváz 7-es és 9-es pozícióban aromás farmakofór csoportokkal történő módosítása harminhoz képest ($K_a \sim 3.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$) erős HSA és AGP ($K_a \sim 10^5$ - 10^6 M^{-1}), valamint szelektív AGP genetikai variáns kötődést okoz. Megfigyeléseink arra világítottak rá, hogy a biológiai

hatás javítására irányuló módosítások a gyógyszerjelölt β -karbolinok farmakológiailag aktív szabad szérumszintjének csökkenését eredményezhetik, amely egy fontos optimalizálható paramétert jelent a gyógyszerkutatás további szakaszában.

4.) A 7-es pozícióban piridin oldalláncot hordozó (**b4**) harmin származék esetében szelektív AGP variáns kötődést mutattunk ki és tisztáztuk ennek molekuláris hátterét, miszerint a kötődés a két variáns különböző gyógyszerkötő üregének architektúrájából kifolyólag az AGP-F1*S-től eltérően az AGP-A variáns dimer formában valósul meg.

5.) Az indolokinazolin-vázis ligandumok vizsgálatára irányuló törekvéseink során, EVD-ra és RTK-ra a szérumban mindkét komponensén erős kötődést állapítottunk meg, amelynek mértéke EVD esetében albuminhoz ($K_a \sim 1.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) képest AGP-n ($K_a \sim 9.8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) egy nagyságrenddel erősebbnek adódott. Eredményeinkből arra következtethetünk, hogy míg egészséges szervezetekben az EVD megoszlásáért javarészt a HSA felelős, addig patológias állapotokban az AGP plazmakoncentrációjának ingadozása is befolyásolhatja az alkaloid szabad vérszintjét.

6.) A (\pm)-EVD-ra enantioszelektív szérumfehérje kölcsönhatásokat mutattunk ki, amelynek mértéke a HSA kötőhelyen hangsúlyosabb volt, mint AGP-n. Bizonyítottuk, hogy mindkét esetben az (*R*) enantiomer kötődése kedvezményezett. A kötődési sztereoselektivitás eltérő ADME profilt kölcsönözhet a két enantiomernek, amely megfigyelés fontos támpontot nyújthat a biológiailag aktív forma kívánt terápiás hatékonyságának eléréséhez, valamint esetleges dózis függő mellékhatásainak csökkentéséhez.

7.) Megvalósítottuk a racém EVD HSA-affinitás kromatográfiával történő rezolválását, amely módszer gyakorlati szempontból egy új, ígéretes gyógyszeranalitikai technikát biztosíthat az eddig nehézséget jelentő EVD és rokon szerkezetű vegyületeik szennyezésként megjelenő sztereoizomereinek azonosítására, szétválasztására.

8.) A CD spektrumok kvalitatív értékelésével és kvantumkémiai számításai révén feltártuk az EVD spektrális változásainak strukturális hátterét és egymáshoz rendeltük alacsony energiájú konformereinek szerkezeti és kiroptikai jellemzőit. Bizonyítottuk, hogy az intramolekuláris exciton csatolt sávpár változásainak követésével információt nyerhetünk az EVD konformeregyensúlyának módosulásairól és uralkodó konformerének geometriájáról. Ligandum leszorítás vizsgálatokkal meghatároztuk az EVD specifikus HSA kötőhelyét és javaslatot tettünk az (*R*)-EVD albumin IIA alegységében levő kötőhelyen felvett

kötőkonformációjára. A kapott eredményeink amellet, hogy segíthetik a jövőben az EVD szerkezet-biológiai aktivitás közti összefüggések molekuláris hátterének megismerését, rávilágítottak az alkaloid fehérjékkel szembeni konformációs adaptálódási képességére is.

9.) Párhuzamot vontunk az EVD és a rokon szerkezetű RTK struktúrájában és szérumfehérjékkel szembeni viselkedésében megmutatkozó eltérő sajátságok között. Bizonyítottuk, hogy specifikus HSA kötőhelye EVD-hoz hasonlóan a IIA alegységben található. Kimutattuk, hogy merev, síkalkatú szerkezete EVD-hoz képest szorosabb illeszkedést, erősebb kölcsönhatást ($K_a \sim 1.4 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$), valamint 2:1 (ligandum: fehérje) sztöchiometriájú komplex képzését teszi lehetővé albuminnal. A megfigyelések segíthetik a szervezetbe kerülő RTK megoszlási folyamatát befolyásoló plazmafehérje kötődés előrejelzését és támpontként szolgálhatnak az ilyen alapvázat hordozó gyógyszerjelölt vegyületek farmakológiailag aktív szérumszintjének prognózisához.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

- I. **Celesztina Domonkos**, Ilona Fitos, Júlia Visy, Ferenc Zsila: Fatty acid modulated human serum albumin binding of the β -carboline alkaloids norharmane and harmane, *MOLECULAR PHARMACEUTICS* 10:(12) pp. 4706-4716. (2013), IF: 4.787.
- II. **Celesztina Domonkos**, Ilona Fitos, Júlia Visy, Ferenc Zsila: Role of the conformational flexibility of evodiamine in its binding to protein hosts: a comparative spectroscopic and molecular modeling evaluation with rutaecarpine, *PHYSICAL CHEMISTRY CHEMICAL PHYSICS* 16:(41) pp. 22632-22642. (2014), IF: 4.198.
- III. **Celesztina Domonkos**, Ferenc Zsila, Ilona Fitos, Júlia Visy, Rudolf Kassai, Balázs Bálint, András Kotschy: Synthesis and serum protein binding of novel ring-substituted harmine derivatives, *RSC ADVANCES* 5:(66) pp. 53809-53818 (2015), IF: 3.840.