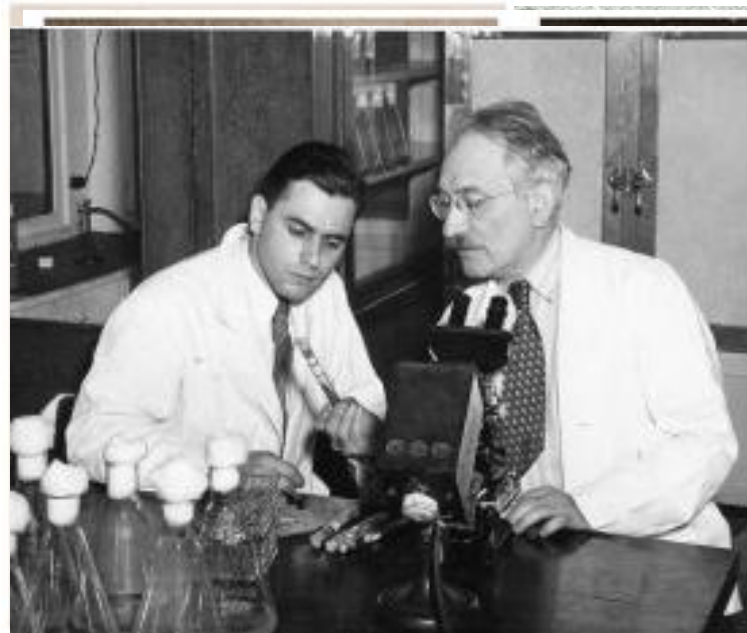


***M. tuberculosis*: Az ősi ellenfél - új fegyverek**



Selman Abraham Waksman (1888-1973)
és Albert Schatz (1922-2005)
 streptomycin - 1943
 orvosi Nobel-díj - 1953

p-aminoszalicilsav (PAS) - 1946
 izoniazid (INH) - 1952



France: Streptomycin for tuberculosis



2011/2012 TUBERCULOSIS GLOBAL FACTS

THE TUBERCULOSIS EPIDEMIC AND RESPONSE

Tuberculosis (TB) is contagious and airborne. It is a disease of poverty affecting mostly young adults in their most productive years. 95% of TB deaths are in the developing world.

The number of people who fell ill with TB dropped to 8.8 million in 2010, including 1.1 million cases among people with HIV. The number has been falling since 2005.

The estimated global incidence rate fell to 128 cases per 100,000 population in 2010, after peaking in 2002 at 141 cases per 100,000. The rate is falling but very slowly.

The number of people who died from TB fell to 1.4 million in 2010, including 350,000 people with HIV, equal to 3,000 deaths a day.

In 2000, there were 9.7 million orphan children as a result of TB deaths.

TB is among the three greatest causes of death among women aged 15-44. 320,000 women died from TB in 2010.

The TB death rate has fallen by 40% since 1990, and the number of deaths is also declining.

5.7 million TB cases were notified through TB DOTS programmes in 2010.

Globally, the percentage of people successfully treated reached its highest level at 87% in 2009.

Since 1995, 46 million people have been successfully treated and up to 6.8 million lives saved through DOTS and the Stop TB Strategy.

Among the 22 highest TB burden countries, Brazil and China show a sustained decline in TB burden over the

MULTIDRUG-RESISTANT TB

In 2010, there was an estimated prevalence of 650,000 cases of multidrug-resistant TB (MDR-TB), and in 2008 it was estimated there were 150,000 MDR-TB deaths annually.

The number of patients enrolled on MDR-TB treatment increased to 46,000 in 2010.

While more people are being treated for MDR-TB in 2010, it is just 10% of the estimated number of MDR-TB patients that needed treatment (i.e. MDR-TB patients that would be identified if all newly-notified TB patients were tested for drug resistance).

TB/HIV CO-INFECTION

2.1 million TB patients knew their HIV status in 2010 compared with 1.6 million in 2000, with the highest HIV testing rates of TB patients in Europe (80%) and Africa (50%). In 48 countries, including 22 in Africa, at least 75% of TB patients knew their HIV status.

46% of HIV-positive TB patients were enrolled on antiretrovirals and 77% started on co-trimoxazole preventive treatment in 2010.

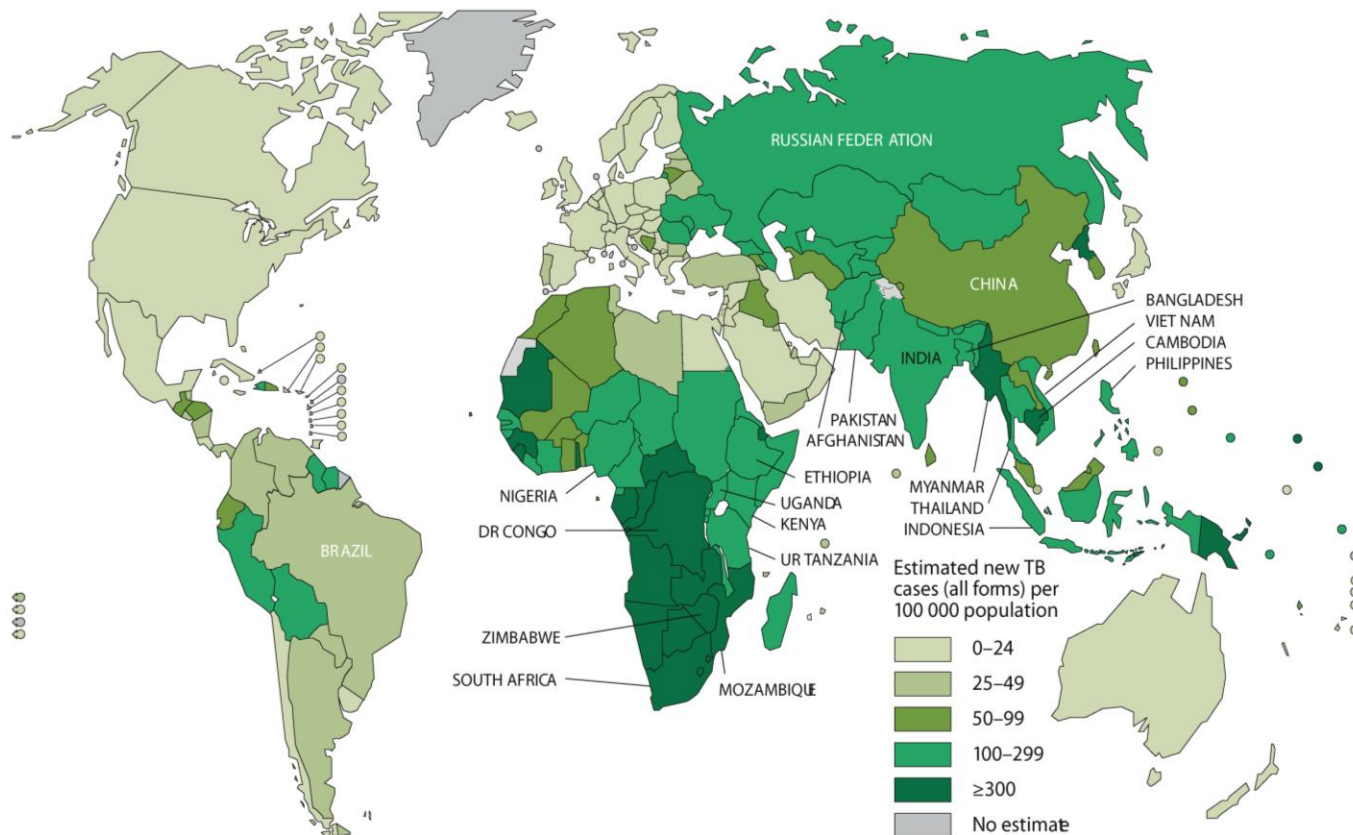
NEW DIAGNOSTICS

As of July 2011, 26 countries are using Xpert MTB/RIF, a rapid molecular test that accurately diagnoses TB and MDR-TB in 100 minutes. The test was endorsed by WHO in December 2010, with 140 countries eligible to purchase the kits at a concessional price.

FINANCING

Worldwide, the share of domestic funding for TB provided by affected countries rose to 88%. But most low income countries still rely on external funding, with the Global Fund the largest external donor. It is providing 62% of international TB funding for 2012.

- a világ lakosságának kb. egyharmada fertőzött
- évente 1,4 millió halálos áldozat (2010)
- évente 8,8 millió újonnan diagnosztizált beteg (2010)
- HIV fertőzötteknél 50-szer gyakoribb a tbc előfordulása
- 5% MDR-TB (650 ezer új eset / év)
- évente 40 ezer XDR-TB



A tuberkulózis immundiagnózisa

- B-sejt válaszon alapuló kimutatás – **alacsony érzékenység**
- PPD, tuberkulin bőrpróba (Tuberculin Skin Test, TST) - **hamis negatív és pozitív válasz**



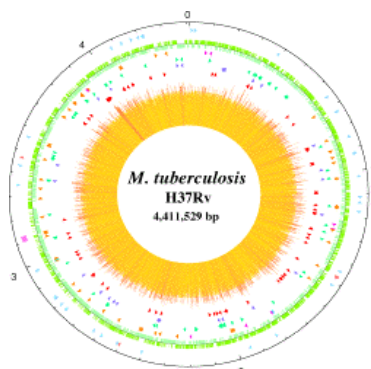
- T-sejt válaszon alapuló kimutatás – **a szelektivitás és az érzékenység függ:**
 - **antigén (fehérjék, peptidek, konjugátumok)**
 - **PBMC, teljes vér**
 - **mérés (citokin termelés, T-sejt proliferáció)**
 - **módszer (ELISA, ELISPot, FACS, stb)**

Potenciális antigének a tuberkulózis immundiagnózisában

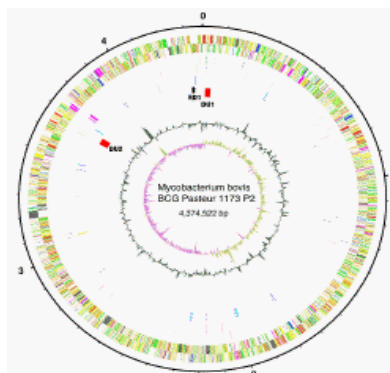
szenzitizáltság:

- BCG oltás vs. *M. tuberculosis* fertőzés
- atípusos és környezeti mycobacterium okozta fertőzés
- aktív és látens tuberkulózis

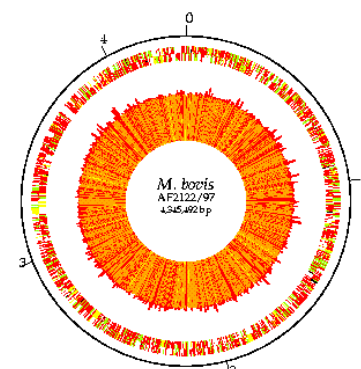
S.T. Cole, *et al.* Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **1998**. 393: 537-544.



<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>



<http://genolist.pasteur.fr/BCGList/>



<http://genolist.pasteur.fr/BoviList/>

M. tuberculosis ↔ BCG ~ 100 gén (**Region of Difference, RD**)

M. tuberculosis ↔ egyéb mycobacteriumok ~ 50 gén

látens fertőzés kimutatása → dormans állapotban szekretált fehérjék
~ 50 gén (**Dormancy Regulon, DosR**)

38kDa fehérje (Ag5, Ag78, protein antigen B, PstS1, Rv0934)

- humorális és celluláris immunválaszt vált ki, DTH, T-sejt proliferációt indukál
- 38G peptid (350-359) a PPD+ egészséges donorok 90%-nál indukál T-sejt stimulációt ¹
- hordozókhoz való konjugációval növelhető a peptid antigenitása (OT20, SOC, KLH, MAP, SAK) ²

16kDa fehérje (korábban 14kDa fehérje, Hsp16.3, acr1, Rv2031c)

- dormans állapotban a legnagyobb mennyiségben expresszált protein (DosR)
- lokalizált T-sejt epitópok, lokalizált TCR és HLA kötő régiók, aminosavak ^{3,4}
- hordozókhoz konjugálva növelhető az epitóp peptid antigenitása (SAK, EAK, T20)

ESAT-6 és CFP-10 fehérjék

- immunogének, specifikus, szenzitív antigének (QuantiFERON-TB Gold®, T-SPOT.TB®) ⁵
- hiányoznak a BCG vakcinatörzsből (Region of Difference, RD1)
- megtalálhatóak: *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. africanum*, *M. marinum*, *M. szulgai* törzsekben

Rv1733c fehérje

- látens antigén, dormans állapotban expresszálódik (DosR) ⁶
- megtalálható a *M. bovis* és BCG törzsekben
- epitóp régiók lokalizálása (91-130, 191-210)

¹ Vordermeier, H. M. et al. *Eur J Immunol*, **1992**. 22(10): 2631

² Bősze, Sz. et al. *Peptides* **2004**. 1105-1106.

³ Caccamo, N. et al. *Eur J Immunol*, **2004**. 34(8): 2220

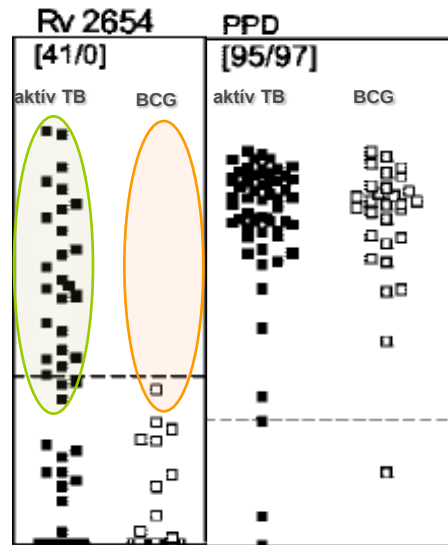
⁴ Bősze, Sz. et al. *Biopolymers*, **2004**. 76: 467

⁵ Brock I, et al. *J Clin Microbiol*. **2004**, 42(6): 2379

⁶ Leyten E. M. et al. *Microbes Infect*. **2006** 8: 2052

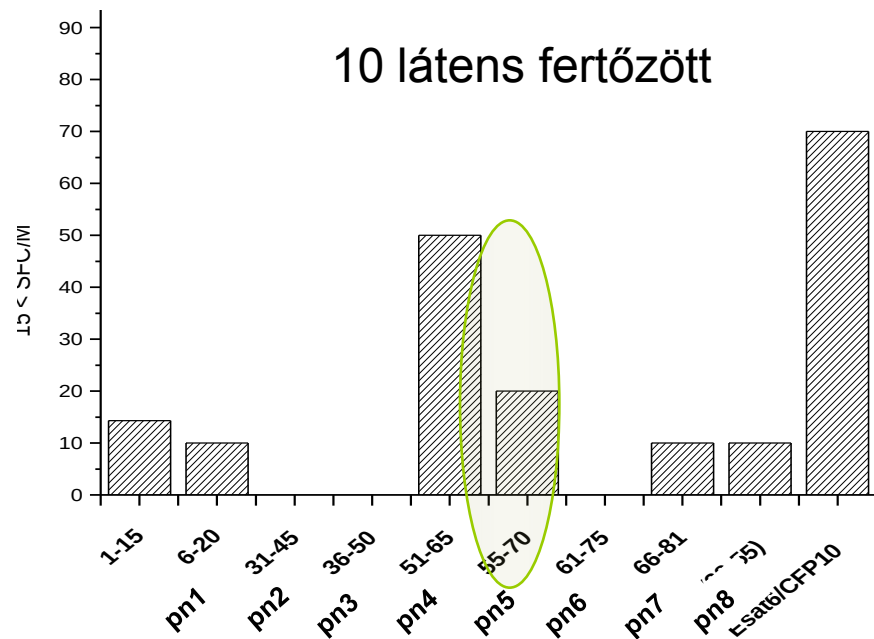
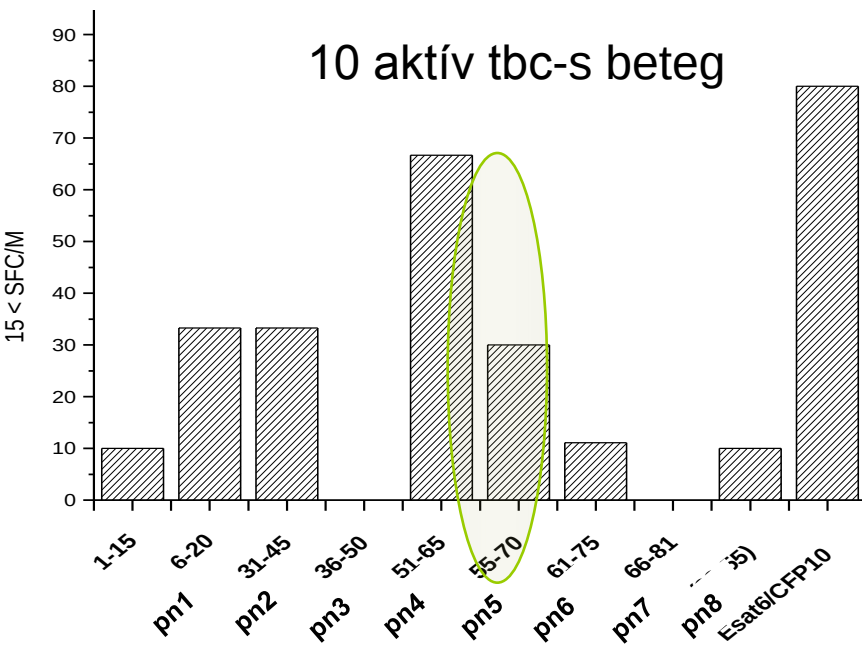
Rv2654 (Tb7.7) fehérje

- *M. tuberculosis* complexre specifikus, szenzitív antigén
- hiányzik a BCG vakcinatörzsből (RD11), a *M. bovis* és nagy valószínűséggel a környezeti mycobacteriumokból ¹
- 3D szerkezete nem ismert (81 as)
- *in vivo* késői típusú túlérzékenységet indukál tengerimalacokban
- pulmonáris és extra-pulmonáris tbc-s betegek esetében jelentős T-sejt stimuláció
- QuantiFERON-TB Gold In-Tube® tesztben alkalmazzák a p4 (38-55) peptidet
(az Esat6 és CFP10 fehérjek mellett)

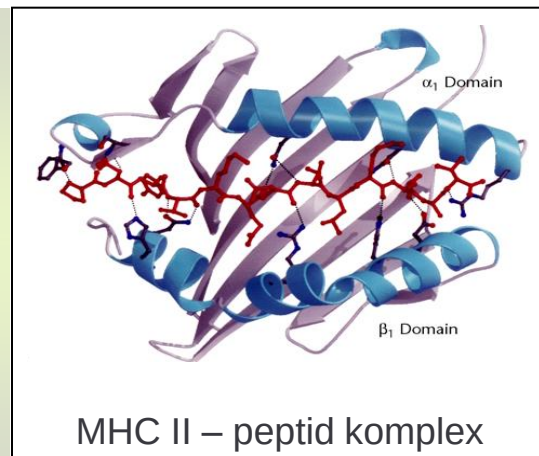


¹ Aagaard C, Brock I, Olsen A, Ottenhoff TH, Weldingh K, Andersen P. Mapping immune reactivity toward Rv2653 and Rv2654: two novel low-molecular-mass antigens found specifically in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infect Dis.* **2004**;189(5):812-9

Rv2654 (Tb7.7) T-sejt epitóp szerkezete



- **pn5(51-65) peptid: 67% !!!**
- magasabb, mint a pnc(38-55) peptid
-> QuantiFERON-TB Gold In-Tube (Tb7.7)p4
- magasabb, mint a rekombináns Rv2654 fehérje (53%)
- közel az ESAT6/CFP10 fehérje keverékhez
- (polárisabb, mint a pnc peptid)





<https://www.tb-inter.org/>

**MTA-ELTE Peptidkémiai
Kutatócsoport**

Uratim Kft.

Ubichem Kft.

**SZBK Enzimológiai
Intézet**

**ELTE Határfelületi- és
Nanoszerkezetek Laboratóriuma**

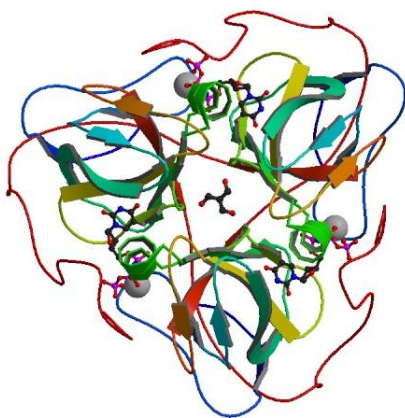
származékok tervezése, konjugátumok szintézise
in vitro és *in vivo* tesztek

in silico módszerek

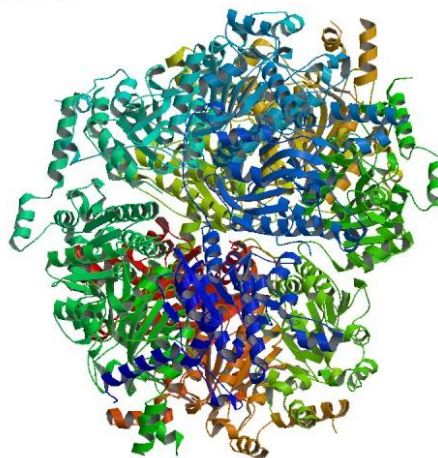
ligandumok és származékaik szintézise

enzimaktivitás vizsgálatok, célfehérjék jellemzése

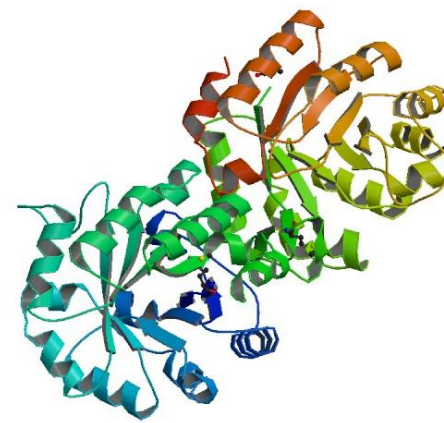
membrán modellek, PLGA formulázás



***M. tub.* dUTPáz** (nukleotid metabolizmus)
(EC 3.6.1.23; Rv2697; PDB kód: 2py4)



2bzz karboxi-transzferáz (EC 6.4.1.3; Rv3280;
PDB kód: 2bzz)



PriA enzim (hisztidin és triptofán bioszintézis)
(EC 5.3.1.16; Rv 1603; PDB kód: 1qo2)

Antituberkulotikus hatású származékok

TB8

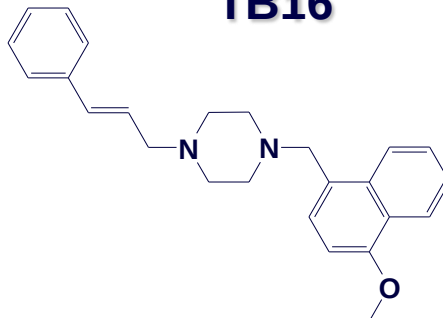


pirido-pirimidinek

154 származék

vegyület	MIC (μ M)
TB820	2,06
TB827	0,15
TB836	0,15
TB852	1,03
TB868	0,62
TB869	1,25
TB871	0,27
TB872	0,67
TB886	1,00
TB887	0,14
<i>INH</i>	0,73

TB16

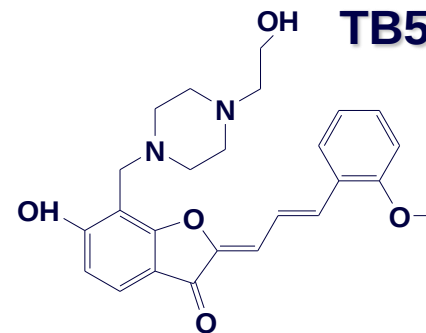


piperazinok

45 származék

vegyület	MIC (μ M)
TB1620	10,2
TB1622	9,5
TB1625	10,5
TB1626	10,5
TB1627	12,0
TB1628	10,2
TB1630	9,5
TB1632	9,5
TB1635	9,5
TB1636	9,5
TB1639	9,5

TB5



kumaronon származékok

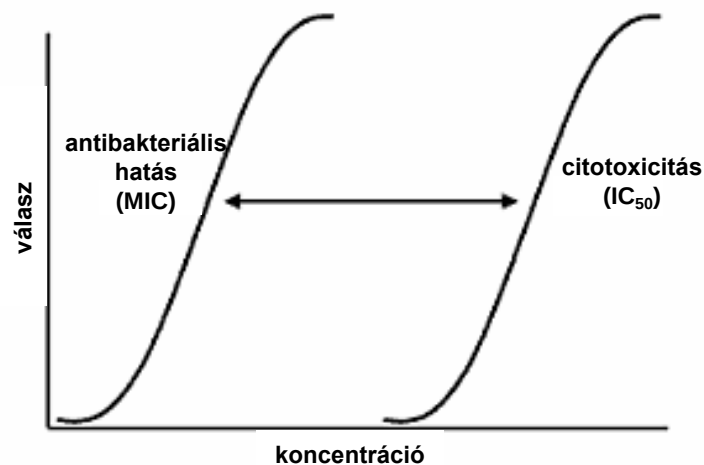
20 származék

vegyület	MIC (μ M)
TB501	46
TB502	68
TB504	35
TB505	15
TB507	71
TB508	37
TB509	71
TB511	33
TB514	14
TB515	19
TB518	38

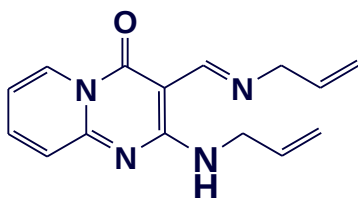
összesen 167 vegyület mutat gátlást *M. tuberculosis* H₃₇Rv tenyészetben

***In vitro* szelektív molekulák**

vegyület	MIC (μM)	IC₅₀ (PBMC) (M)
TB 801	3,73	12100
TB 827	0,15	>188
TB 836	0,15	>210
TB 852	1,03	>164
TB 847	5,67	181

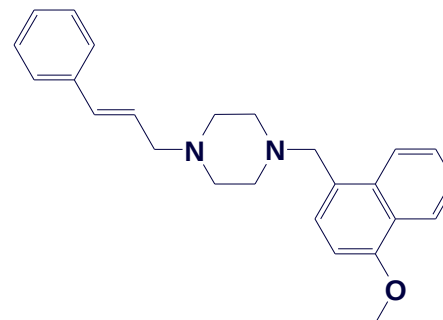


Multirezisztens *M. tuberculosis* ellen ható vegyületek



TB8

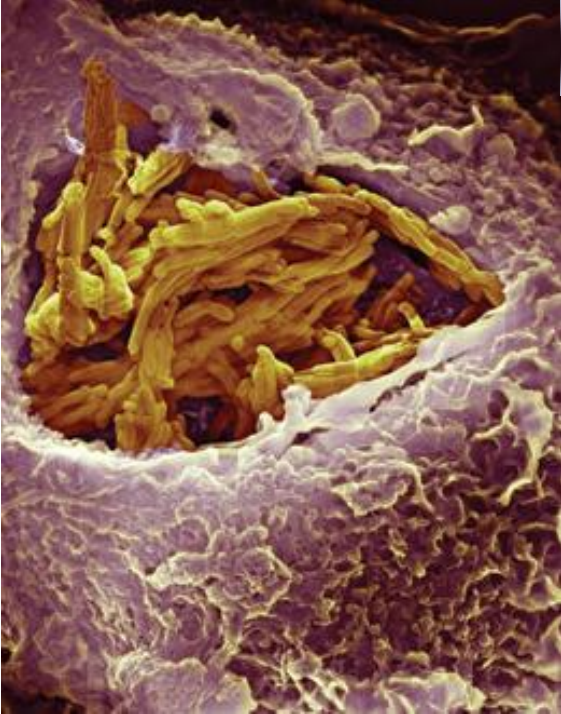
vegyület	MIC (μ M)
TB 807	15,4
TB 808	14,2
TB 813	4,9
TB 820	20,6
TB 823	19,3
TB 827	0,3
TB 831	153,5
TB 836	1,5
TB 858	18,7
TB 863	4,1
TB 864	246,6



TB16

vegyület	MIC (μ M)
TB 1620	23,2
TB 1622	38,1
TB 1627	24,0
TB 1628	40,8
TB 1630	40,2
TB 1632	9,5
TB 1635	19,1
TB 1636	19,1
TB 1639	38,1
TB 1641	20,8
TB 1642	21,6

Mycobacterium tuberculosis



Intracelluláris patogén

gátolja a gazdasejt működését és így megakadályozza az immunrendszer által irányított eliminációt

A fertőzött makrofágokban **dormans állapotban** hosszú ideig létképes (látencia, perzisztencia)

A fertőzött makrofágok hatóanyagfelvétele igen korlátozott

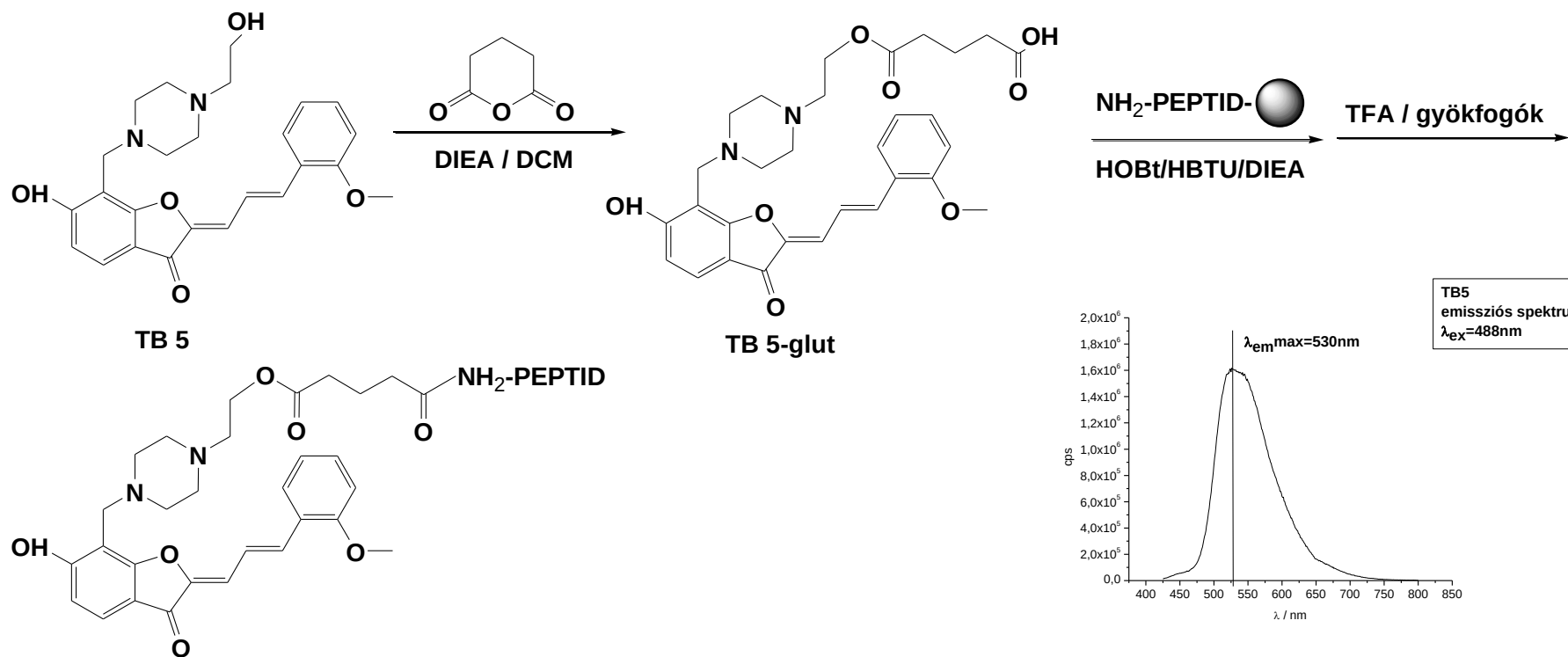


Hatóanyagok célbajuttatása:

Receptor mediált endocitózis (tuftsin receptoron keresztüli internalizáció (OT20))

Antimikrobiális peptidek (kölsönhatás a lipid membránnal, baktérium lízis (granulizin peptidek))

TB5 – peptidkonjugátumok



vegyület	összetétel	M_{av}^a számított / mért	R_t^b (perc)
TB5		436,4 / 436,4 *	24,5
TB5-glut		550,5 / 550,5 *	26,3
OT20	[TKPKG] ₄	2063,5 / 2063,5	14,8 #
TB5-OT20	TB5 -[TKPKG] ₄	2596,0 / 2596,0	28,4 #
GranF2	³³ VCRTGRSRWRDVCRNFMRRYQSR ⁵⁵	2988,5 / 2988,7	21,6
TB5-GranF2	TB5 - ³³ VCRTGRSRWRDVCRNFMRRYQSR ⁵⁵	3521,0 / 3520,8	30,1

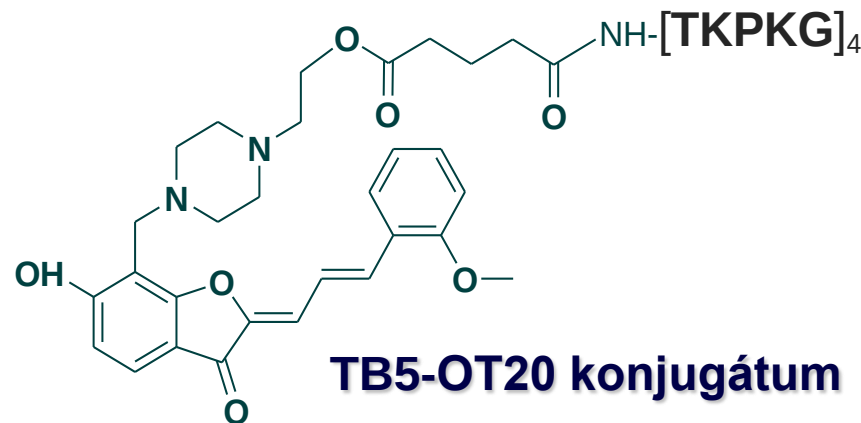
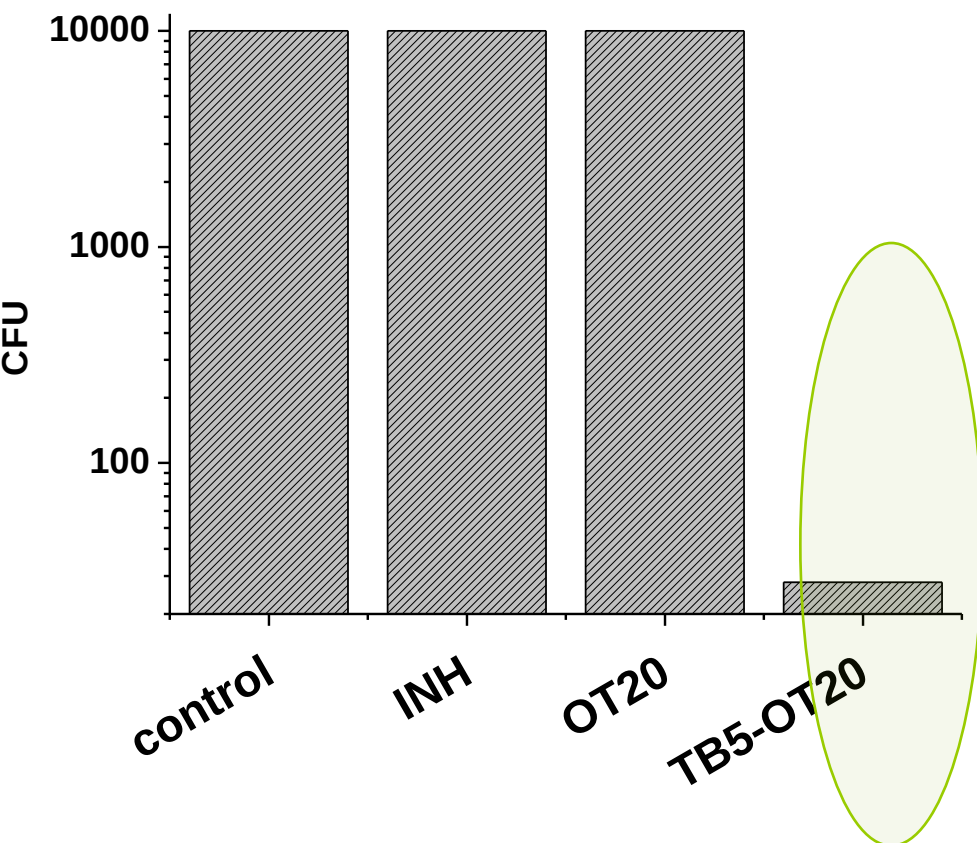
A peptidek C-terminálisa amidált formában

^a Átlag molekulatömeg (Bruker Esquire 3000+ ESI-MS); *monoizotópos molekulatömeg

^b RP-HPLC, Knauer, Eurospher-100, C18, 5 μm , 250×4 mm oszlop; 1 mL/perc; UV det. $\lambda = 214\text{ nm}$, A eluens: 0,1% TFA/H₂O, B eluens: 0,1% TFA/acetonitril : H₂O = 80 : 20 (v/v), gradiens: 10% B, 5 perc; 10-80% B, 35 perc,

gradiens: 5% B, 5 perc; 5-60% B, 35 perc,

Intracelluláris *M. tuberculosis*-t gátló TB5-konjugátumok

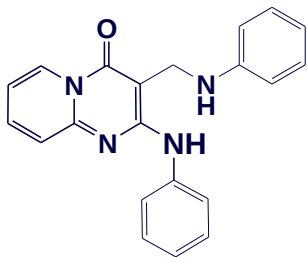


kontroll

TB5-OT20

K. Horvati, Bacsá B. et al.: Enhanced cellular uptake of a new, *in silico* identified antitubercular by peptide conjugation. *Bioconj. Chem.* (2011) közlésre elfogadva

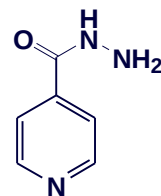
In vivo toxikológia



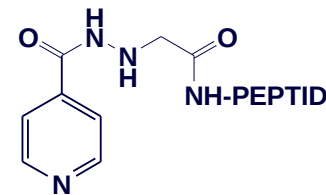
TB836



TB820 konjugátum



izoniazid (INH)

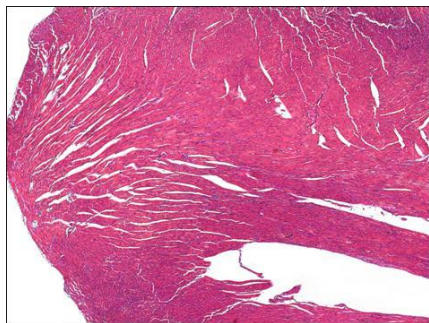


INH-konjugátum

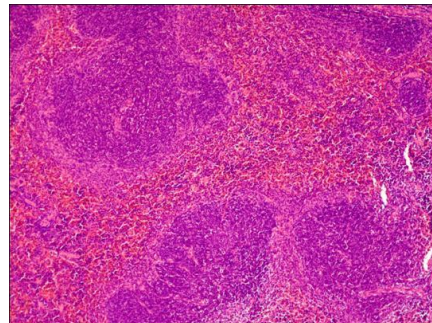
LD50 értékek meghatározása OECD előírások alapján Balb/c nőstény egereken

Formulázás: DMSO : Solutol® HS 15 : fiz.só oldat = 1 : 1 : 2 v/v/v

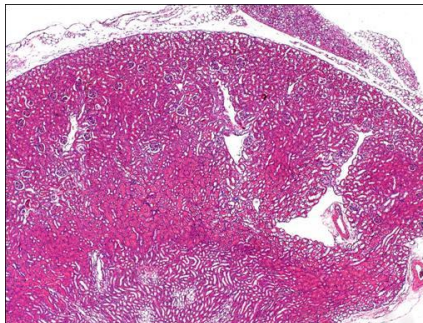
TB820: 200 mg/ttkg, TB820 konjugátum: 72 mg/ttkg, TB836: 50 mg/ttkg



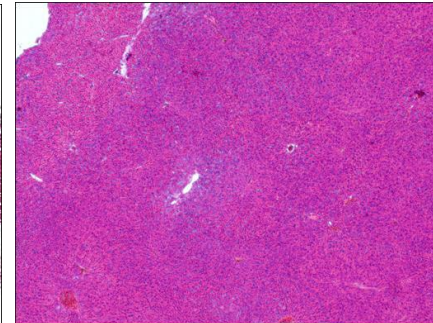
szívizom



lép



máj



vese

A vegyületek hatására testsúlycsökkenést, illetve a szerveken makroszkopikus elváltozást nem tapasztaltunk

***In vivo* antituberkulotikus hatás**

- 6 hetes nőstény albínó tengerimalacok,
 - inkubációs karantén (3 hét)
 - intramuscularis fertőzés: *M. tub* H₃₇Rv
 - 10 állat / csoport
-
- kezelés: heti 2-szer, 12 héten keresztül,
 - orális adminisztráció, 30mg/ttkg
 - eutanázia, diagnosztikai boncolás, szervkivétel
- Fodor Kinga, Vargha Ervin (Országos Epidemiológiai Központ, Állatház)

- CFU meghatározás

Dávid Sándor (Bakteriológiai Laboratórium, Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet)

- metszet készítés, baktérium festés

Rusvai Miklós, Balka Gyula (Szent István Egyetem, ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék)



tüdő

lép

máj

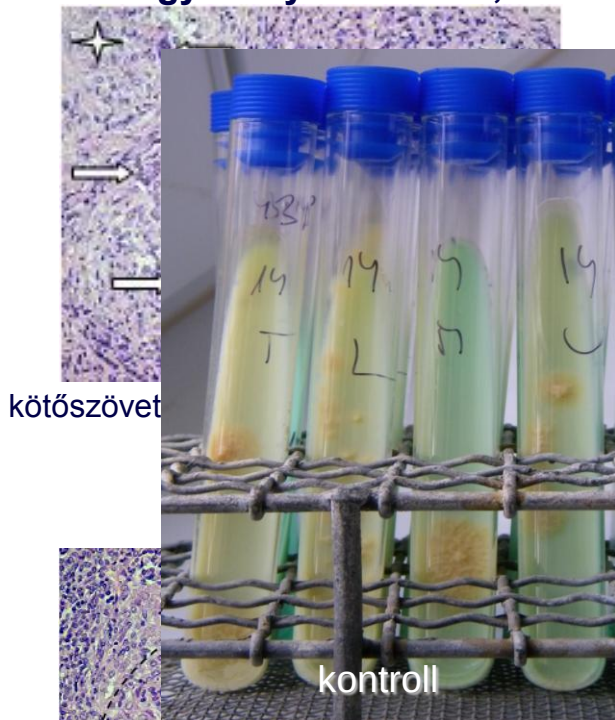
vese

szív

nyirok-
csomók

***In vivo* antituberkulotikus hatás**

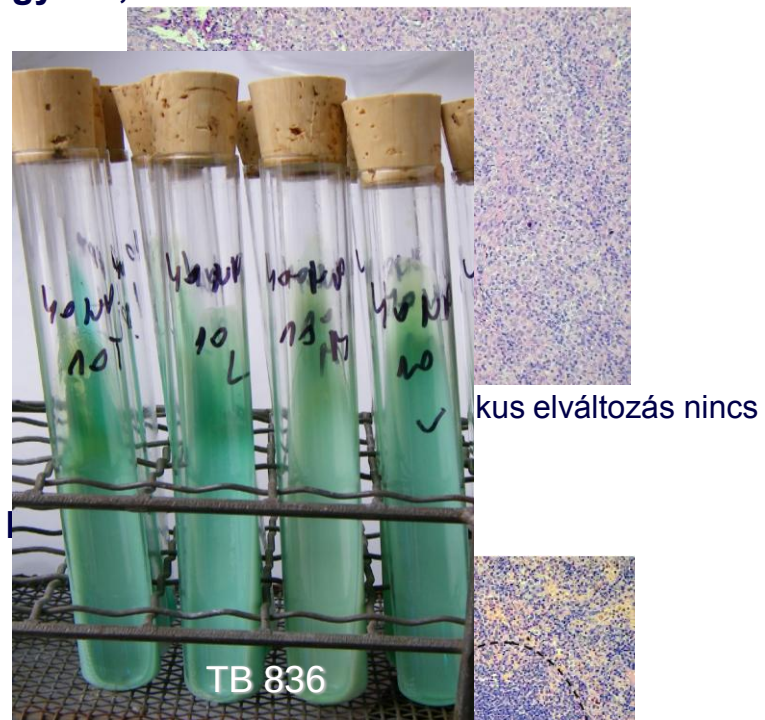
lágycéki nyirokcsomó, 200X nagyítás, hematoxin-eozin festés



kötőszövet

kontroll

kiterjedt tuberkulum heterofil granulocitákkal



kus elváltozás nincs

TB 836

a metszési síkban tuberkulotikus elváltozás nincs

MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport

Bősze Szilvia

Bacsa Bernadett

Medzihradszky-Schweiger Hedvig

Mező Gábor

Szabó Nóra, Dávid Sándor

Országos Korányi TBC és Pulmonológiai Intézet, Bakteriológia Labor

Egerszegi Sándor

Uzsoki Kórház

Vértessy Beáta és csoportja

Enzimológiai Intézet

Grolmusz Vince és csoportja

ELTE Számítógéptudományi Tanszék

Kiss Éva és csoportja

ELTE Határfelületi- és Nanoszerkezetek Laboratóriuma

Ubichem Kft.

Fodor Kinga, Vargha Ervin

Országos Epidemiológiai Központ, Állatház

Balka Gyula, Rusvai Miklós

Szent István Egyetem, ÁOTK Kórbonctani és Igazságügyi Állatorvostani Tanszék



<https://www.tb-inter.org/>

Uratim Kft.

in silico módszerek

Ubichem Kft.

ligandumok és származékaik szintézise

**SZBK Enzimológiai
Intézet**

enzimaktivitás vizsgálatok, célfehérjék jellemzése,
in silico módszerek

**ELTE, Peptidkémiai
Kutatócsoport**

származékok tervezése,
konjugátumok tervezése és szintézise
in vitro és *in vivo* tesztek

ELTE, Kémiai Intézet

membrán modellek

Új hatóanyagok keresése in silico módszerekkel

Új molekuladinamikai dokkolási algoritmus
(Prof. Grolmusz Vince és Kutatócsoportja)

Zinc adatbázis

(Zinc – <http://zinc.docking.org/>)

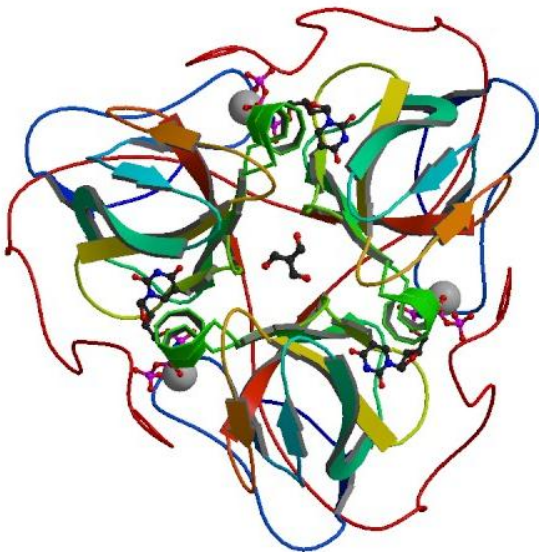
~ 8 millió kereskedelmi forgalomban kapható molekula

Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. *J. Chem. Inf. Model.* **2005.** 45:177-82

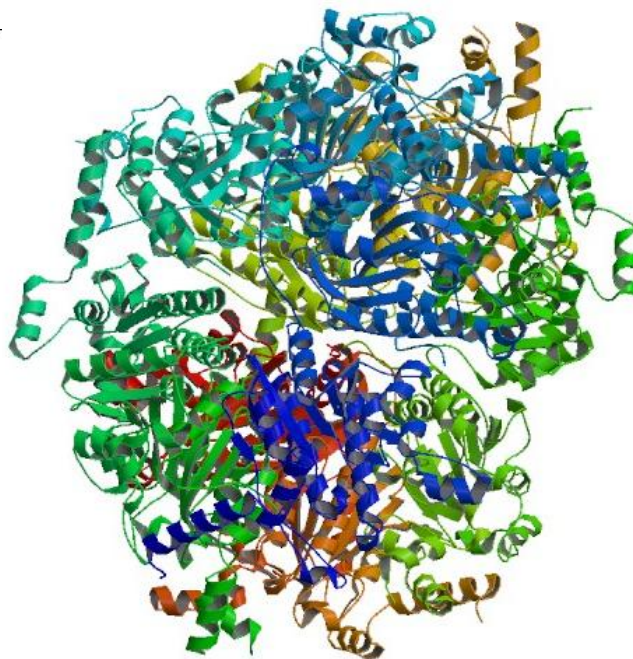
Ismert 3D szerkezetű fehérjék

a baktérium túléléséhez nélkülözhetetlen enzimek
(RS-PDB)

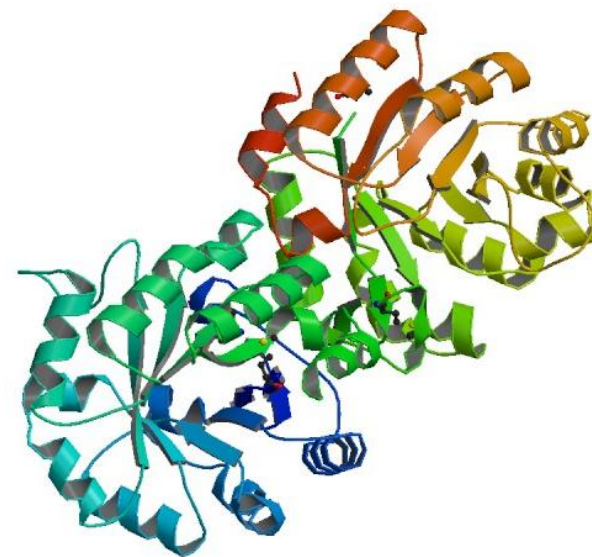
Szabadka, Z., Grolmusz, V., *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* **2006.** 1:5755-8



M. tub. dUTPáz (nukleotid metabolizmus)
(EC 3.6.1.23; Rv2697; PDB kód: 2py4)
Varga, B., et al. **2009**



2bzs karboxi-transzferáz
(EC 6.4.1.3; Rv3280; PDB kód: 2bzs)
Holton, S.J. et al. *FEBS Lett* **2006.** 580: 6898.



PriA enzim (hisztidin és triptofán bioszintézis)
(EC 5.3.1.16; Rv 1603; PDB kód: 1qo2)
Lang, D. et al. *Science* **2000.** 289: 1546.