



# A TILDIPIROZIN, EGY ÚJ MAKROLID ANTIBIOTIKUM HATÁSMECHANIZMUSA

Stephen Douthwaite<sup>1</sup>, Jacob Poehlsgaard<sup>1</sup> és Ralf Warrass<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry & Molecular Biology, University of Southern Denmark [Biológiai és Molekuláris Biológiai Tanszék, Dél-Dániai Egyetem], Campusvej 55, DK-5230 Odense M, Dánia

<sup>2</sup> Drug Discovery, Intervet Innovation GmbH, a member of the MSD Animal Health Group [Gyógyszer-innováció, Intervet Innovációs Rt., az MSD Állategészségügyi Csoport tagja], Zur Propstei, D-55270 Schwabenheim, Németország

## ÖSSZEFOGLALÁS

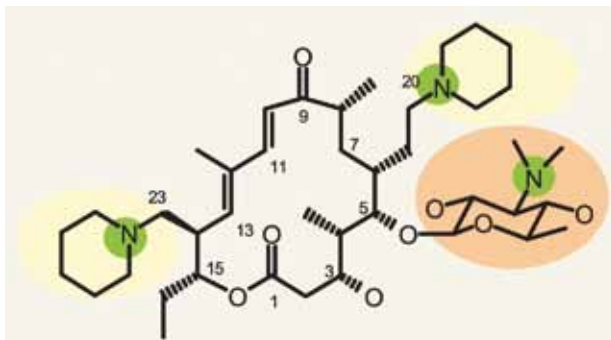
Az MSD Animal Health a közelmúltban az Európai Unióra érvényes forgalomba hozatali engedélyt kapott a Zuprevo<sup>®</sup> nevű gyógyszernek a szarvasmarha légzőszervi betegsége kezelésére és megelőzésére történő alkalmazására. A tildipirozin hatóanyag az első kereskedelmi forgalomba került tribázikus, 16 tagú gyűrűvel rendelkező makrolid. A tildipirozin nagyfokú oldhatóságát, gyors szöveti eloszlását, a tüdőszövetben való nagyarányú felhalmozódását és a szarvasmarha légzőszervi betegségével összefüggésbe hozható baktériumokkal szembeni kitűnő antibakteriális aktivitását a molekula három bázikus központja által mutatott rugalmas lipofil–hidrofil tulajdonságnak tulajdonítják. A tildipirozin azáltal éri el antimikrobiális hatását, hogy hatékonyan áthatol a baktériumok sejtfalán és hozzákötődik a molekuláris célponthoz, vagyis a baktérium riboszómájához. Kémiai lábnyom kísérletekkel és molekuláris modellezéssel összehasonlítottuk a tildipirozin és más makrolid antibiotikumok (a tilozin, a tilmikozin és a tulatromicin) riboszómákhoz való kötődését. Azt találtuk, hogy a kötődésben közös kölcsönhatási helyek játszanak szerepet, ugyanakkor azonban a vizsgált makrolidok között egyértelmű különbségek vannak, és mindegyik molekula egy sajátos, csak rá jellemző kötődési mechanizmussal rendelkezik. Egy in vitro transzkripció/transzláció próbában a tildipirozin a riboszómális peptidszintézis hatékony gátlását mutatta, és 0,23 (±0,01) μM IC<sub>50</sub> értéke e molekula jobb strukturális illeszkedését tükrözte. E tekintetben a tildipirozin szignifikánsan jobbnak bizonyult, mint például a tilmikozin, melynek IC<sub>50</sub> értéke 0,36 (± 0,02) μM volt.

A makrolidok a természetes előfordulású vegyületek egyik nagy családját alkotják, melynek tagjai egy sor terápiás tulajdonsággal rendelkeznek, melyek közül a legrészletesebben jellemzett és jelenleg a legfontosabb az antimikrobiális aktivitásuk. Kémiaileg a makrolidokat egy 12–16 atomból álló makrolakton gyűrű alkotja, melyeken maximum három cukorkötőhely található. A kórházakban és a gyakorlatban legsikeresebben használt makrolidok a természetes előfordulású ósvegyületek kémiai származékai, melyek jobb stabilitással, hatékonysággal, biztonsággal és kényelmes alkalmazhatósággal rendelkeznek. E származékok közül a legújabb a tildipirozin, egy új kémiai egység (NCE) a szarvasmarha és a sertés légzőszervi betegségeinek kezelésére. Kimutatták, hogy a tildipirozin különlegesen hatásos a Gram-negatív kórokozó baktériumok – így a *Mannheimia*

*haemolytica*, a *Pasteurella multocida*, a *Histophilus somni*, a *Bordetella bronchiseptica*, az *Actinobacillus pleuropneumoniae* és a *Haemophilus parasuis* – okozta légúti fertőzések ellen.

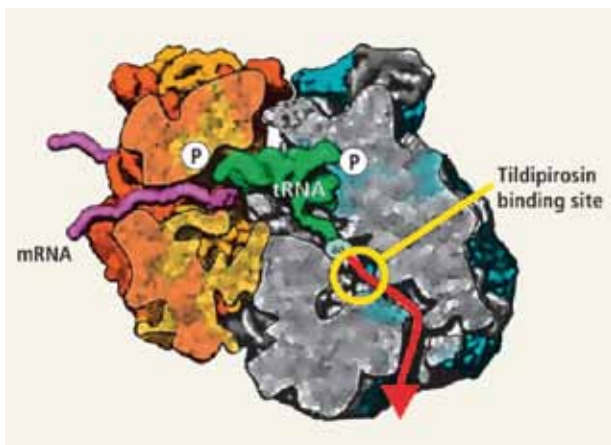
Jelenleg a tildipirozin a kereskedelemben kapható egyetlen 16 tagú tribázikus makrolid. A tildipirozin kémiai szerkezete megőrizte a természetes előfordulású vegyület, a tilozin tilonolid makrolakton magvát, de több más szempontból – a legnyilvánvalóbban a két piperidin szubsztituens jelenléte alapján – különbözik a tilozintól (1. ábra). Az egyik piperidin csoport a tilonolid gyűrű 20-as pozíciójában adta hozzá a molekulához, míg a másik a 23-micinóz cukrot helyettesíti. Emellett az 5-ös pozíciójű szénatomnál (C5) található mikaminóz-mikaróz diszacharidot megrövidítették a mikaróz cukor eltávolítása érdekében.

Az így kapott szerkezet három bázikus centrumot tartalmaz, melyek pKa értékei 9,8, 8,8 és 8,1. A tildipirozin szerkezete lipofil és hidrofil jellemzőket egyaránt mutat, a környezet pH-jának és a membránokkal és fehérjékkel folytatott kölcsönhatásnak megfelelően változó mértékben. Ez több előnyös tulajdonsággal – többek között nagyobb oldhatósággal, a szövetekbe való jobb behatolással és a fertőzés helyén (a tüdőszövetben) való felhalmozódással – ruházza fel a molekulát. Emellett a tildipirozinnak a Gram-negatív baktériumok külső membránján való hatékony áthatolása egyike azoknak a tulajdonságoknak, melyek a gyógyszeret különösen hatásossá teszik az olyan kórokozók ellen, mint az *M. haemolytica* és a *P. multocida*.



1. ábra: A tribázikus, 16 tagú gyűrűvel rendelkező makrolid, a tildipirozin kémiai szerkezete

Míg a sejtekbe való jobb behatolás fontos tulajdonság, egy sikeres antimikrobiális vegyületnek a baktériumanyagcsere hatékony gátlására is képesnek kell lennie. A többi makrolid antibiotikumhoz hasonlóan a tildipirozin is a transláció folyamatát – vagyis az új peptidok és fehérjék baktérium-riboszóma általi szintézisét – gátolja (lásd a 2. ábrát).



2. ábra: A baktérium-riboszóma szerkezete. A „P” a peptidiltranszferközpontot jelöli a riboszóma 50S egységén belül, ahol az egyes aminosavak a tRNS-ről áttevődnek a növekvő peptidláncra. A vörös nyíl azt az alagutat jelöli, amelyen keresztül a kialakulóban lévő peptidlánc elhagyja a riboszómat. A sárga kör a tildipirozin kötődési helyét jelzi. Poehlsgaard, J. és Douthwaite, S. (2005): Antibiotic targets on the bacterial ribosome [Antibiotikum-célpontok a bakteriális riboszómán]. Nature Reviews Microbiology 3: 870–881. című cikke alapján adaptálva.

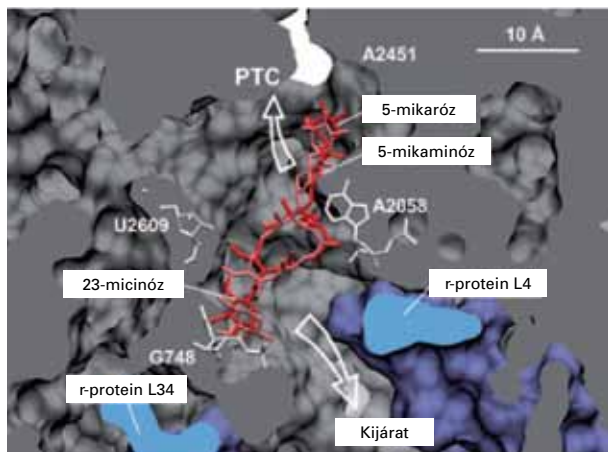
Az *Escherichia coli* Gram-negatív baktérium riboszómáival végzett kísérletben, *in vitro* translációs rendszerben kimutattuk, hogy a tildipirozin már 0,23  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50} = 0,23 \pm 0,01 \mu\text{M}$ ) koncentrációban a fehérjeszintézis 50%-os gátlását eredményezte, míg a tilmikozin – egy másik 16 tagú makrolid antibiotikum – esetében ehhez 0,36  $\mu\text{M}$  koncentrációra volt szükség ( $\text{IC}_{50} = 0,36 \pm 0,02 \mu\text{M}$ ) (lásd az 1. táblázatot).

16 tagú makrolidok	$\text{IC}_{50}$ * (átlag $\pm$ szórás)
Tildipirozin	0,23 $\pm$ 0,01 $\mu\text{M}$
Tilozin	0,36 $\pm$ 0,02 $\mu\text{M}$

\* az a koncentráció, amelynél a fehérjeszintézis 50%-os mértékben gátolt

1. táblázat: A riboszomális peptidszintézis gátlása, egy *E. coli* riboszómával végzett csatolt transzkripció/transzlációs rendszerben meghatározva

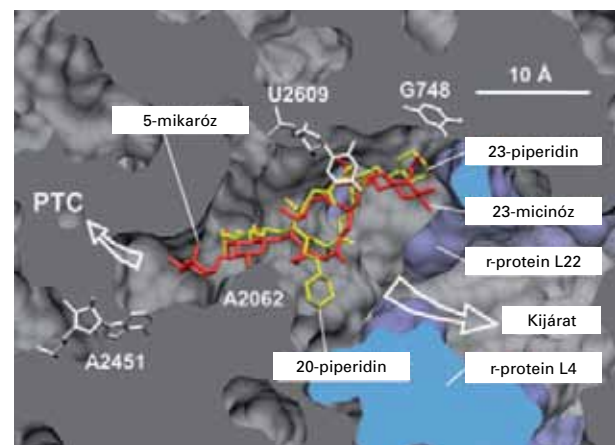
Annak a megállapítása, hogy a tildipirozin hatékonyan gátolja a fehérjeszintézist, a következő kérdéseket vetette fel: milyen molekuláris kölcsönhatásokba lép a tildipirozin a riboszómán található gátlási helyén, illetve ezek a kölcsönhatások vajon különböznek-e a többi makrolid antibiotikumok esetében megfigyelhetőktől? E kérdéseket két lépésben közeleltettük meg: először is kémiai lábnym technikával feltérképeztük a riboszóma szerkezetén belül azokat a helyeket, ahol a makrolid gyógyszer kifejti a hatását, majd ezekkel az adatokkal komputeres molekuláris dinamikai szimulációkat végeztünk annak láthatóvá tétele érdekében, hogy a gyógyszerek hogyan foglalják el a riboszómán lévő kötőhelyüket, és azon milyen orientációban helyeződnek el. A tilozin esetében rendelkezésre áll a riboszomális kötőhelyhez kötődött gyógyszer nagyfelbontású kristályszerkezete (PDB: 1K9M). Ezt az információt arra használtuk fel, hogy igazoljuk és validáljuk a molekuláris dinamikai szimulációs módszerünket. A tilozin riboszómához kötődésére vonatkozóan független módon kifejlesztett szimulációkat összehasonlítottuk a 3. ábrán bemutatott kristályszerkezettel, és ez az összevetés figyelemre méltó mértékben egyező adatsorokat mutatott.



3. ábra: A makrolid kötőhely a riboszomális csatornában. A kísérleti megközelítés elvi helyességének bizonyítása. A tilozin (lazacszínű, PDB: 1K9M) kristályszerkezetére „ültetve” látható a komputerrel kicsinyített tilozin kötőhely (vörös színnel). A lábnyomvizsgálattal és kristályszerkezeti vizsgálatokkal meghatározott fontos nukleotidok meg vannak számozva és világoszürke színnel vannak feltüntetve; a makrolid kötőhelyhez közel helyeződő riboszomális fehérjék (r-fehérjék) is fel vannak tüntetve. A felső nyíl az alagút peptidil-transzferáz centrumnál (PTC) helyeződő bejáratára mutat, míg az alsó nyíl azt az útvonalat jelöli, amelyet az újonnan szintetizált peptidlánc az alagút kijáratá felé haladva megtesz. A skálát a 10 ångström méretű vonal jelzi.

A lábnyom-meghatározási vizsgálatok azt mutatták, hogy a tildipirozin, tilmikozin és tilozin makrolid antibiotikumok a *Pasteurella* és az *E. coli* riboszómáknak ugyanabban a régiójában kötődnek; az ilyen típusú vizsgálatok standard modelljeként az utóbbit használják. Minden makrolid kölcsönhatásba lép a riboszomális RNS-sel, a nagy riboszomális alegység alagútjában helyeződő A2058 és A2059 nukleotidoknál. Ez a megfigyelés a más makrolid vegyületek hatásmechanizmusára vonatkozó korábbi vizsgálatok [például Poulsen és munkatársai (2000): *J. Mol. Biol.* 304: 471–481.] eredményei alapján várható volt; a szomszédos nukleotidoknál azonban olyan különbségek voltak, melyek alapján a tildipirozin és a többi vizsgált makrolid kötődését meg lehetett különböztetni.

A tildipirozin-molekula két piperidingyűrűje egyedülálló kölcsönhatásokra nyújt lehetőséget (4. ábra). Fontos, hogy a 20-piperidin egy olyan helyen található a riboszóma alagút lumene felé orientált formában, amelyet nem foglal egyetlen más makrolid antibiotikumban megtalálható szubsztituens sem. Ebből a pozícióból a 20-piperidin potenciálisan blokkolni képes az újonnan szintetizált peptidlánc növekedését, miközben az lefelé halad az alagúton. Ez a modell egybevág az  $IC_{50}$  adatokkal, melyek szerint a tildipirozin a tilmikozinnál hatékonyabban képes gátolni a bakteriális riboszóma fehérjeszintézisét, ami azt jelzi, hogy ez az új, tribázikus 16 tagú gyűrűvel rendelkező makrolid szerkezetileg jobban illeszkedik az általa célba vett molekulához.



4. ábra: A tilozin (vörös színnel) és tildipirozin (sárga színnel) komputerrel kiszámított kötődése más szögből nézve. Az ábrán fel vannak tüntetve a két makrolidot egymástól megkülönböztető fontos alkotóelemek.