

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A glikogén-foszforiláz inhibitorok új alkalmazása:
nátrium-glükóz kotranszport gátlása vesében**

Dr. Sipos Ádám

Témavezető: Dr. Docsa Tibor



DEBRECENI EGYETEM
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2022

A glikogén-foszforiláz inhibitorok új alkalmazása: nátrium-glükóz kotranszport gátlása vesében

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Sipos Ádám okleveles gyógyszerész

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Jelátviteli folyamatok sejt- és molekuláris biológiája programja) keretében

Témavezető: Dr. Dócsa Tibor, adjunktus

Az értekezés bírálói:

Dr. Agócs Attila, PhD
Dr. Bak István, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, Akadémikus
tagok: Dr. Agócs Attila, PhD
Dr. Bak István, PhD
Dr. Mótyán János András, PhD
Dr. Nagy Veronika, PhD

Az értekezés védésének időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK, Élettudományi Központ
F015-16 terem
2022. augusztus 26, 11:00 óra

Bevezetés

Cukorbetegség (diabétesz mellitusz) az egyik leggyakoribb betegség, az elmúlt 20 évben több mint háromszorosára nőtt az érintett betegek száma, ezért a diabétesz a 21. század egyik leggyorsabban növekvő egészségügyi kihívása. A cukorbetegség számának növekedését társadalmi-gazdasági, demográfiai, környezeti és genetikai tényezők együttes kölcsönhatása segíti elő. A cukorbetegség egy olyan súlyos, hosszú távú (krónikus) betegség, amely akkor fordul elő, ha a vérben emelkedett a glükóz koncentrációja. Ennek oka lehet, hogy a szervezet nem képes elegendő mennyiségű inzulint előállítani, vagy az előállított inzulin nem tudja hatékonyan kifejteni a hatását. Az inzulinhiány, ha hosszú távon kezeletlen marad, több szervi károsodást, életveszélyes egészségügyi komplikációkat okozhat, mint retinopátia, vakság, veseelégtelenség, szív- és érrendszeri betegségek, neuropátia, stroke, lábszár fekély stb. Amennyiben sikerül a cukorbetegséget megfelelően kezelni, akkor ezek a súlyos szövődmények késleltethetők, vagy teljes mértékben megelőzhetők.

Két fő típusát különböztetjük meg az 1-es és 2-es típusú cukorbetegséget. Az 1-es típusú cukorbetegséget autoimmun reakció okozza, melynek során a test immunrendszere támadja meg a hasnyálmirigy inzulintermelő béta-sejtjeit. Az 1-es típusú cukorbetegségben szenvedő embereknek napi inzulin injekciókra van szükségük a megfelelő vércukorszint fenntartásához. A megfelelő napi inzulinkezelés, a vércukorszint rendszeres ellenőrzése, támogatás és oktatás révén egészséges életet élhetnek és késleltethetik, megelőzhetik a cukorbetegséggel járó szövődményeket. Az 1-es típusú cukorbetegség bármely életkorban kialakulhat, de leggyakrabban gyermekeknél és fiataloknál fordul elő. Tipikus tünetei a túlzott szomjúság (polidipszia), gyakori vizelés (poliuria), fáradtság, állandó éhség, hirtelen súlyvesztés, ágyba vizelés és homályos látás.

A 2-es típusú cukorbetegség során test sejtjei nem képesek teljes mértékben reagálni az inzulinra, így több glükóz marad a vérben, melyet inzulin rezisztenciának is nevezünk. Ebben az állapotában csökken a hormon hatékonysága, és ezért növekszik az inzulintermelés. Idővel a hasnyálmirigy béta-sejtjei nem tudnak lépést tartani a kereslettel, és nem megfelelő inzulintermelés alakul ki. Leggyakrabban az idősebb felnőtteknél tapasztaljuk, de növekvő elhízás, testi inaktivitás és nem megfelelő étrend miatt egyre inkább gyermekeknél és fiatalabb felnőtteknél is előfordul. A 2-es típusú diabétesznek hasonlóak a tünetei, mint az 1-es típusú cukorbetegségnek, de a megjelenése kevésbé drámai. A 2-es típusú cukorbetegség kezelésének fontos része az egészséges életmód, mely magába foglalja a rendszeres testmozgást, egészséges étrendet, a dohányzás abbahagyását és az egészséges testsúly fenntartását. Ha az életmód

megváltoztatásának kísérletei nem elegendőek a vércukorszint szabályozásához, orális gyógyszeres kezelés szükséges. Ha az orális antidiabetikumok nem képesek megfelelően szabályozni a vércukorszintet, szükség lehet inzulin injekciókra is.

Glikogén anyagcsere

A napi glükóz felhasználás nagy része aerob úton az agyban történik. A fennmaradó rész legnagyobb részét a vörösvérsejtek, a vázizom és a szívizom hasznosítja. Testünk glükózt nyerhet közvetlenül az étrendből vagy aminosavakból, laktátból glükoneogenezis útján. Ebből a két elsődleges forrásból nyert glükóz vagy kering a véráramban, vagy a szervezet polimer formában, glikogénben tárolja.

A glikogén olyan elágazó láncú glükóz polimer, amelyet α -(1,4)- és az elágazásoknál α -(1,6)-glikozidos kötések kötnek össze. Sejtekben a glikogén glikoszómában, fehérje és glikogén komplexében található. Leginkább a máj és az izmok raktároznak glikogént, de egyéb szövetekben is megtalálható. A máj az egyetlen olyan szövet, amely képes a glikogénből felszabadított glükózt a véráramba juttatni, így szabályozva a vércukorszintet, így a máj glikogén raktárai tekinthetők a vércukorszint fő pufferének. Más szövetek is képesek szintetizálni és lebontani a glikogént, de ezt a glükózt csak a sejteik saját energiaigényeinek fedezésére használják. A glikogén homeosztázis magában foglalja a glikogén szintézisének (glikogenezis) és a glikogén bomlásának (glikogenolízis) összehangolt szabályozását. A két folyamat reciprok szabályozással működik. A glikogenolízist serkentő hormonok (glükagon, kortizol, adrenalin, noradrenalin) egyidejűleg gátolják a glikogenezist. Ezzel szemben az inzulin, amely stimulálja a glikogenezist, miközben gátolja a glikogenolízist.

A glikogén szintézis kulcsenzime a glikogén-szintáz (GS). α -1,4 kötések kialakítására képes, ehhez UDP-glükózt használ szubsztrátként. A lebontás kulcsenzime a glikogén foszforiláz (GF), melynek aktivitását a foszforilációs állapota szabályozza. A foszforiláz feladata foszforolitikusan lebontani a glikogént az α -(1,4) kötések hasításával. A reakció terméke glükóz-1-foszfát. Normál körülmények között a GF dimer szerkezetű és fontos szerepet tölt be a vércukorszint szabályozásában, ezért egyik lehetséges célpontja a gyógyszerkutatásoknak. Számos kutatócsoport tervezett vegyületeket, melyek az enzim gátlásán keresztül csökkenthetik a vércukorszintet. A dimer enzimröntgenkristallográfiás vizsgálatai megerősítették, hogy egy-egy alegységén 5 ligand kötőhely található. Elsősorban az aktív centrumhoz és a nukleotid kötőhelyekhez kapcsolódó, specifikusan tervezett molekulák gátolhatják hatékonyan az enzim aktivitását.

Glikogénanyagcsere szabályozásában résztvevő kinázok aktivitását főként a cAMP és Ca^{2+} irányítja. A glükagon cAMP-n keresztül stimulálja a GF foszforilációját. A glükagon aktiválja az adenilát-cikláz, mely cAMP-t termel. A keletkezett cAMP aktiválja a cAMP-függő protein kinázt, amely foszforilálja a foszforiláz kinázt. Utóbbi pedig a GF-t foszforilálja, és aktív enzim (GFa) képződik és beindul a glikogénlebontás. Megemelkedett Ca^{2+} koncentráció is stimulálja a glikogén lebontást, mert foszforiláz kináz aktivitását növeli. Így hat a vazopresszin, az adrenalin, az oxitocin, és az angiotenzin 2 is. A foszfatázok is képesek befolyásolni a glikogén lebontást, hiszen defoszforilációval inaktiválják a GFa-t, aktiválják a GS-t, beindítva a glikogénszintézist.

Glükóz transzporterek

Emlős sejtekben a glükóz transzportját a sejtmembránban található glükóz transzporterek biztosítják. A transzportereket szerkezetileg és funkcionálisan 2 típusra oszthatjuk: Glükóz transzporterek (GLUT), melyek facilitált diffúzióval működnek, és a nátrium-glükóz kotranszporterek (SGLT), amelyek aktív transzporttal szállítják a glükózt a koncentráció-gradiens ellenében nátriumionnal kötötten. A GLUT-ok azonossá teszik a plazmamembrán mindkét oldalának a glükóz koncentrációját, mivel glükóz gradiens a hajtóerejük, azonban az SGLT-k képesek két különböző glükóz koncentrációt létrehozni a membrán két oldala között, mert nátriumiongradiens a hajtóereje a glükózfelvételnek.

SGLT-k a membránfehérjék egyik nagy családját alkotják. Az SGLT fehérjéknek hat humán izoformáját különböztetjük meg. Ezek közül a SGLT1 és az SGLT2 a legjobban ismert, mivel kulcsszerepet játszanak a glükóz és a nátriumion transzportjában a bél és vese hámsejtek membránján keresztül. SGLT1 javarészt a vékonybélben glükóz felszívódásáért, míg az SGLT2 a vesében a glükóz reabszorpciójáért felelős. Figyelembe véve az SGLT1 és az SGLT2 élettani funkcióit, ésszerűen a gyógyszerkutatások célpontjai lettek. 1987-ben arról számoltak be, hogy a florizin, mely SGLT1 és SGLT2 természetben előforduló inhibitora, enyhíti a cukorbetegség tüneteit hasnyálmirigy eltávolításon átesett patkányokban. Későbbiekben a florizin szerkezetét alapul véve kezdtek el SGLT2 inhibitorokat fejleszteni, és sikerült is olyan vegyületeket találni, amelyeket már engedélyeztek is.

Humán SGLT2 K_M -értékei glükózra 2 mM és nátriumionra 25 mM, és az SGLT1-től eltérően az SGLT2 alacsony affinitású, nagy kapacitású glükóz-transzporter. Vesében SGLT2 és az SGLT1 továbbítja a proximális kanyarulat csatorna apikális membránján keresztül a glükózt a sejtek belsejébe, és GLUT2 és GLUT1 útján távozik a bazolaterális membránon át. SGLT2 emberekben és a rágcsálókban a proximális tubulus felső részében (S1 és S2

szegmensben), míg az SGLT1 a proximális tubulus alsó részében (S3 szegmensben) expresszálódik. Euglikémia (artériás vércukor koncentráció 5.5 ± 0.5 mmol/l) esetén a filtrált glükóz viaszszívását 80% vagy annál magasabb arányban az SGLT2 végzi, míg az SGLT1 a fennmaradó glükóz reabszorpciójáért felelős. Előbbiek mellett, a glükóz és a nátriumion aránya is különbözik a két transzporter között: az SGLT2 1:1 arányban, míg az SGLT1 1:2 arányban szállítja a glükózt és a nátriumiont. Amikor SGLT2 farmakológiai gátlását idézzük elő, a glükóz mennyisége megnő a proximális tubulus disztális részében, és ekkor SGLT1 próbálja kompenzálni a glükóz reabszorpcióját. Ezért az SGLT2 gátlókkal kezelt euglikémiás emberek frakcionált glükóz-reabszorpciója csak 40-50%-ra csökken.

SGLT2 inhibitorok

Jelenlegi hiperglikémiás szerek a diabétesz patofiziológiai hatását, étvágy szabályozást, tápanyagok felszívódását és kiválasztását célozzák meg. A hiperglikémiás szerek a következő mechanizmusokkal csökkentik a vércukor szintet: a metformin gátolja a máj glükoneogenezisét; a szulfonilkarbamid-származékok és a glukagon-szerű peptid 1 (GLP-1) analógok és dipeptidil-peptid 4 (DPP) inhibitorok növelik a hasnyálmirigyben az inzulin szekrécióját; és tiazolidindionok fokozzák az inzulinérzékenységet. Azonban, a vércukorszintet orális antidiabetikus szerekkel gyakran nehéz optimális tartományon belül tartani. Ha egyetlen szer alkalmazásával nem sikerül megfelelő eredményt elérni, akkor kombinált terápia ajánlott, többféle, különböző hatásmechanizmussal rendelkező gyógyszer felhasználásával. A hipoglikémiás gyógyszerek használatának ellenére a cukorbetegknél a glikémiás kontroll továbbra is problémát okoz, ezért új gyógyszerek kifejlesztésére van szükség a halálozások, a szövődmények csökkentése, és az életminőség javítása érdekében. A kombinált terápiákon túl a gyógyszertervezés új megközelítése a kettős vagy több célpontú vegyületek keresése, amelyek több biológiai makromolekulára is hathatnak. A 2-es típusú diabétesz összefüggésében nemrégiben felülvizsgálták az ilyen többcélú gyógyszerek kifejlesztését. A piacon a legújabb antidiabetikus gyógyszerek a nátrium-függő glükóz kotranszporter 2 (SGLT2) inhibitorok, amelyeket gliflozinoknak neveznek. A gliflozinok csökkentik a glükóz renális felszívódását, növelik a glükóz koncentrációját a kiürített vizeletben, ezáltal csökken a vércukorszint cukorbeteg betegek. Jelenleg hét forgalomban lévő SGLT2 gátló áll rendelkezésre orális antidiabetikumokként a 2-es típusú cukorbetegségben való alkalmazásra.

A gliflozinokat önmagában, vagy más orális antidiabetikus gyógyszerekkel kombinálva alkalmazzák. SGLT2 inhibitoroknak az SGLT2 szelektivitásuk eltérő, mert az SGLT1-et is gátolják. Az SGLT2/SGLT1 szelektivitás 1000-szeres vagy annál magasabb a dapagliflozin, az

empagliflozin, a luseogliflozin, ertugliflozin és a tofogliflozin esetében, míg a canagliflozin és az ipragliflozin szelektivitása alacsonyabb, 190. illetve és 250-szeres. A szotagliflozint, az SGLT2 és az SGLT1 kettős inhibitorát az Európai Gyógyszerügynökség jóváhagyta, az amerikai szervezet azonban nem engedélyezte az inzulin kiegészítéseként a 1-es típusú cukorbetegségben. A gyógyszer kettős hatású, tompítja és késlelteti a glükóz felszívódását a gyomor-bél traktusból, és a glükóz visszaszívódását a vese proximális tubulusában. Preklinikai vizsgálatokban diabéteszes állatmodellekben az SGLT2-inhibitorok csökkentették az éhomi és nem éhomi vércukorszintet, a HbA1c szintet, a vérnyomást, és javították a glükóz intoleranciát. Az SGLT2 gátlószerekkel végzett metaanalízisek kimutatták, hogy a gliflozinokkal kezelt 2-es típusú diabétesz és szív- és érrendszeri betegséggel rendelkezők körében csökkent a halálozás és a kórházi ápolás ideje, és bármilyen okból bekövetkezett halálozások száma, amikor a vizsgálati gyógyszert hozzáadták a szokásos ellátáshoz. A legfrissebb tanulmányok arról számoltak be, hogy az SGLT2 inhibitorok vesevédő hatással rendelkeznek a diabéteszes nefropátiás állat modellekben, és a vesevédő hatását klinikai vizsgálatokban is kimutatták.

A gliflozint szedő betegeknél ritkán kialakulhat diabéteszes ketoacidózis, amely a cukorbetegség egyik súlyos szövődménye, és életveszélyes lehet. Ezen esetek egy részében a ketoacidózis úgy alakult ki, hogy a betegek vércukorszintje nem volt olyan magas, mint várták.

Kémiaiailag a már engedélyezett gliflozinek C-glükopiranozilarilmetil(het)arének. A florizin farmakodinamikai és farmakokinetikai tulajdonságainak javítása érdekében, számos szerkezet-aktivitás összefüggést vizsgáltak a vegyület alapvázának módosításaival. Ennek eredménye lett számos O- és N-glikozid vegyület, melyek közül végül C-glükozil szerkezet lett a legmegfelelőbb. Miután véletlenül felfedezték a glikozil- és benzil csoportok rendkívül előnyös meta elhelyezkedését a proximális aromás gyűrűn, ez az alapváz vált a további szerkezet-aktivitás összefüggést vizsgáló kísérletek vezető struktúrájává, melyen a cukorrész, az aromás gyűrűk, és közöttük levő metilén-híd cseréjével, módosításával vizsgálták az újonnan szintetizált molekulák hatását. Míg a disztális aromás csoport cseréjét kiterjedten vizsgálták, amelynek eredménye a már forgalmazott kanagliflozin és ipragliflozin lett, sokkal kevesebb tanulmány foglalkozott a proximális benzol egység heterociklusos vegyülettel történő helyettesítésével. Az ismert szerkezetek közé tartoznak a tiofén, a pirrol, a tiazol, a piridin, a piridazin és a pirazin gyűrűk, amelyek IC_{50} értékeik alacsony nM-tól alacsony μM tartományig megtalálhatóak. Az IC_{50} értékek erősen függenek a heterociklusos csoporttól. A fenolos -OH csoport bevezetése a proximális gyűrűn orto helyzetében több esetben is előnyösnek bizonyult, kiemelve a hidrogénkötés-kötést alkotó csoport lehetséges szerepét ebben a régióban. Tervezték a proximális benzolgyűrű további cseréjét, mivel a heterociklus lényeges hatással lehet a

molekulák hatékonyságára. Előreláthatólag az imidazol- és 1,2,4-triazolszármazékok H-kötéseket képezhetnek az előbbi fenolos -OH helyzetéhez közel. Továbbá, figyelembe véve, hogy a glükózil-bifenil-származék gátolja az SGLT-ket, így ezeknek a vegyületeknek a tanulmányozását is tervbe vették. Emellett sok hasonló szerkezettel rendelkező származék glikogén-foszforyláz hatékony gátlószere is, melyek korábban a 2-es típusú cukorbetegség elleni küzdelem másik célpontjának bizonyultak. Ezek a vegyületek rendelkezhetnek SGLT-GP kettős gátló hatással, melyet korábban még nem vizsgáltak.

Célkitűzések

A cukorbetegség széles körben elterjedt, és a betegek száma a mai napig növekszik. A cukorbetegség leggyakoribb tünete a hiperglikémia, amelynek csökkentése a betegség kezelésének egyik legfontosabb része. Az orális hipoglikémiás gyógyszerek körében található néhány új gyógyszer, amelyek csökkentik a magas vércukorszintet, ilyen a nátrium-glükóz kotranszporter 2 inhibitorok (SGLT2). Az SGLT2 inhibitorok általános szerkezete Sebastian Vidal összefoglaló cikke alapján tartalmaz egy glükopiranóz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot metilén híd köt a benzolgyűrűhöz.

Kutatócsoportom több mint 20 éve azonosít glikogén-foszforiláz (GF) gátlószereket, de ezek a vegyületek nem váltak klinikumban alkalmazott gyógyszerekké. Munkatársaink számos glükózanalog inhibitorot szintetizáltak, amelyek hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett egy heteroatomás gyűrűt, például benzol helyett pirimidint, oxadiazolt és triazolt, tartalmaz a molekula

Ezért munkám legfontosabb céljait a alábbiakban fogalmazom meg.:

- Az újonnan szintetizált lehetséges glikogén-foszforiláz-gátlószerek azonosítása és tesztelése;
- Új sejtvonalak létrehozása, amelyek stabilan, a vad típusú sejteknél nagyobb mennyiségben termelik az SGLT1 és 2 fehérjéket, ezáltal alkalmasak a lehetséges SGLT1 és 2 gátlószerek azonosítására és gátlási állandójuk meghatározására;
- Minél több potenciális SGLT 1 és 2 gátlószert azonosítani a sejtes rendszerek segítségével és gátlási állandójuk meghatározása;
- Felülvizsgálni a korábban már azonosított GF inhibitor vegyületeket, melyeknek a szerkezete hasonlóságokat mutat az SGLT inhibitorok általános szerkezetével, meghatározni ezen vegyületek gátlási adatait az SGLT1 és 2 fehérjékre sejtes rendszerben.

MÓDSZEREK

Vázizom glikogén foszforiláz b enzim preparátum nyúl vázizomból

Homogén GFb-t nyúl vázizomból Fischer és Krebs szerint állítottunk elő, háromszor átkristályosítottuk, és a kristályokat TEM pufferben (40 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 10 mM ME, pH=6,8) oldottuk. A nukleotidokat (elsősorban AMP-t) Norit A cellulóz kezeléssel távolítottuk el. A preparátumok specifikus enzimaktivitása 48-55 E/mg volt 16 mM G-1-P, 1 % glikogén és 1 mM AMP jelenlétében. A homogenitást SDS-poliakrilamid gélelektroforézissel ellenőriztük, és egyetlen kb. 95 kDa molekulatömegű fehérje festődését észleltük.

Tisztított izom glikogén foszforiláz aktivitásának meghatározása

A tisztított glikogén foszforilázokkal végzett kinetikai méréseket az irodalomból ismert módszer alapján végeztük. Az enzim aktivitását a glikogén szintézis irányába (az *in vivo* folyamattal ellentétesen) mértük. A vázizom és máj GFa aktivitását különböző koncentrációjú (2-16 mM) G-1-P, és állandó koncentrációjú (1 %) glikogén jelenlétében határoztuk meg 50 mM trietanol-amin, 100 mM KCl, 1 mM EDTA (pH=6,8) puffer jelenlétében. Vázizom GFb esetében 1 mM AMP-t (mint aktivátort) is tartalmazott az inkubációs elegy. Az aktivitást 30°C-on határoztuk meg és az inkubációs időt úgy állítottuk be, hogy a szubsztrátnak (G-1-P) legfeljebb 20 %-a alakuljon át. Egységnyiinek tekintettük a GF azon mennyiségét, amely egy perc alatt 1 μ mol foszfát átalakulását katalizálja 30°C-on.

Glikogén foszforiláz gátlószerek vizsgálata: K_i és IC_{50} meghatározása

A vizsgált vegyületek (lehetséges GF inhibitorok) gátlási állandóinak meghatározásához a Dixon-féle ábrázolást használtuk. A feltevésünk az volt, hogy a glükózból szintetizált molekulák a GF-hez kötődnek követve a Michaelis-Menten kinetikát. A Michaelis-Menten egyenlet egy hiperbola, amelyből az enzimreakció maximális sebessége (V_{max}) és a Michaelis-Menten (K_m) állandó meghatározható. Az állandók grafikus meghatározásának egyik lehetősége az eredeti egyenlet linearizálása, az úgynevezett Lineweaver-Burk ábrázolás. Ez a linearizálás azon alapul, hogy az eredeti egyenlet reciprokát vesszük, az így kapott egyenes tengely metszeteiből már pontosabban határozhatók meg az enzimreakció állandói. Ha az enzimreakció sebességét több különböző inhibitor- és szubsztrát-koncentrációnál is megmérjük, akkor a linerizált Lineweaver-Burk ábrázolásnál is egyeneseket kapunk a gátlószer többféle koncentrációjának megfelelően. Az így kapott egyenesek meredekségét a hozzájuk tartozó inhibitor-koncentráció függvényében ábrázolva egy új görbét kapunk (ún. Dixon-

diagram), aminek az x-tengely metszete adja a gátlási állandót (K_i). A mérési adatok számítógépes kiértékelésével (GraphPad Prism) határoztuk meg a gátlási állandókat.

Olyan vegyületek esetén, amelyek még nagy koncentrációban sem gátolják jól a GF enzimet a maximálisan elérhető aktivitás 50 %-os gátlásához szükséges inhibitor-koncentráció (IC_{50}) meghatározása az elterjedt módszer. A mérés lényege azonos a K_i meghatározásával, a különbség annyi, hogy az IC_{50} meghatározásához egyetlen szubsztrát-koncentráció mellett változtatjuk az inhibitor koncentrációját és az 50 %-os reakciósebességhez szükséges gátlószer koncentrációját nevezzük IC_{50} -nek.

Sejt kultúra

TSA201 (humán embrionális vese) sejteket 25 mM glükóz tartalmú tápoldatban tartottuk, mely tartalmazott 10 % FBS-t, és 1,5 % L-glutamint. Az overexpresszióval létrehozott sejtvonalak tápoldata tartalmazott még 10 μ g/ml puromycint. A sejteket T-75-ös sejtenyésző flaskában tartottuk 37 °C-on 5% CO_2 tartalmazó inkubátorban. Passzálás során tripszint használtunk, és foszfát pufferrel mostuk a sejteket.

Lentivirális transzfekció

100 ezer sejtet raktunk **ki** 24 lyukú plate lyukaiba, és 24 óráig inkubátorban tartottuk 37 °C-on. Következő napon lecseréltük a sejtek a tápoldatát újra, mely 8 μ g/ml hexadimetrin bromidot, és a megfelelő lyukak a lentivirális vektort tartalmazott. 24 óra múlva lecseréltük a sejtek tápoldatát friss médiumra. 3 nap múlva a sejteket összegyűjtöttük, és T-25 tenyésztő flaskába helyeztük át. 5. napon 10 μ g/ml puromycint adtunk hozzá a sejtek tápoldatához, melyet a továbbiakban minden alkalommal hozzáadtunk a sejtek frissmédiumához. Ezt követően 2 naponta friss médiumra cseréltük a sejtek tápoldatát, amíg a szelekció teljesen végbe nem ment a kontroll sejtekhez viszonyítva.

Western blot

Sejteket 60 mm-es petri csészében tenyésztettük. Sejtek összegyűjtése előtt foszfát pufferrel mostuk, majd jégen 100 μ l TET lízis pufferrel összegyűjtöttük. A lizátumot 45 percig inkubáltuk jégen, és 3-szor vortexeltük, majd -80 °C-on tároltuk. A lizátumok kiolvasztása után megmértük a fehérje tartalmukat, mintapuffert hozzá adva főztük a mintákat 10 percig 100°C-on. A mintában található fehérjéket SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfát - poliakrilamid gélelektroforézis) módszerrel választottuk el. 4-16%-os gradiens gélre vittük fel a mintákat. Az elektroforézis 80 volton elfo pufferben futott. A gélelektroforézis után a gélről a fehérjéket PVDF (polivinilidén-fluorid) membránra transzferáltuk át, melyhez transzfer puffert

használtunk 60 percig konstans 0,35 ampererősséggel. Blottolás után a nem specifikus antitest kötődések megelőzése érdekében 5%-os BSA oldattal (szarvasmarha szérum albumin) blokkoltuk a membránt 1 órán keresztül. Blokkolás után elkészítettük a SGLT1, SGLT2, GAPDH antitestek oldatait 1 %-os BSA oldatban, és a membrán megfelelő részleteit belehelyeztük a megfelelő oldatokba. Egy éjszakán át inkubáltuk a membrán részleteket 4 °C-on. Másnap a membrán darabokat 3-szor TBST oldattal mostuk, majd TBST oldatban oldva a megfelelő másodlagos antitestben inkubáltuk 1 órán keresztül. Inkubáció után 2szer mostuk TBST oldattal, majd 1szer TBS oldattal. A másodlagos antitestek tormaperoxidáz kapcsoltak, ezért kemilumineszcens szubsztrát tartalmú oldattal detektáltuk a vizsgált fehérjét. Az eredményeket ChemiDoc Touch Imaging System segítségével hívtuk elő. Az adatokat Image Lab szoftverrel analizáltuk.

Fehérje mérés

Fehérje koncentráció meghatározására BCA módszert használtunk. 96 lyukú plate-ben végeztük a kísérleteket. Egy lyukba 25 µl mintát mértünk, melyhez 100 µl BCA reagenst adtunk hozzá. 30 percig 37 °C-on inkubáltuk, ezt követően fotométerben 562 nm-en mértük az abszorbancia értékeket.

Glükózfelvétel mérés

25 ezer overexpresszió nélküli és SGLT1/2 overexpressziót tartalmazó TSA201 sejtet raktunk ki poli-L-lizinnel előkezelt 96 lyukú platekre. Következő nap a sejtek médiumát lecseréltük, és cukormentes médiumra cseréltük, mely tartalmazott FBS-t, L-glutamint, és a tesztelni kívánt vegyület. Az éheztetés után a sejtek médiumához 100 µM 2-NBDG-t adtunk, és fél óráig inkubáltuk. inkubáció után eltávolítottuk a felülúszót, 2-szer mostuk foszfát pufferrel, és KH₂PO₄ lízis puffert adtunk hozzá, és -20 °C-on tároltuk a mintákat. Kiolvasztás után a mintákat szuszpendáltuk, és fluoriméter segítségével mértük a fluoreszcens jelet (gerjesztési hullámhossz: 485 nm, emissziós hullámhossz: 538 nm). Ez követően mértük a minták fehérje tartalmát, amellyel normalizáltuk a sejtek glükózfelvételét.

SGLT1 és SGLT2 IC₅₀ számítás

Miután kiválasztottuk az optimális koncentráció tartományt, mindegyik vegyületet teszteltük legalább 4 különböző koncentrációval (0,1 és 1000 µM). Overexpresszió nélküli sejtvonal glükóz felvétel értékeit kivontuk az overexpresszált sejtvonal értékeiből, tehát az overexpresszált kontrollból kivonva az eredeti kontrollt kapjuk a 100 %-ot. Minden számításhoz a GraphPad Prism szoftvert használtuk. Az adatokat logaritmikus skálán ábrázoltuk inhibitor

koncentráció függvényében. Az IC_{50} értékeket nem lineáris regresszió analízissel számítottuk szigmoidális dózis-válasz görbékből.

Citotoxicitás mérés

TSA201 sejteket használtunk, melyeknek az életképességét fluoreszcens CyQUANT assay segítségével mértünk. 25 ezer sejtet raktunk a 96 lyukú plate lyukaiba. Következő nap eltávolítottuk a sejtek felülúszóját, és friss teljes médiumra cseréltük, mely tartalmazta a vizsgálni kívánt molekulákat (1 mM) és a doxorubicint (2 ng/ml) negatív kontrollként. Pozitív kontroll csak DMSO-t tartalmazott. 4 óra inkubáció után eltávolítottuk a felülúszót, és mostuk a sejteket foszfát pufferrel, majd lefagyasztottuk a plateket. Következő nap kiolvastottuk a plateket, és 200 μ l CyQUANT reagenst adtunk a lyukakhoz. Fénytől védve 5 perc szobahőmérsékleten történő inkubáció után fluoriméterrel mértük a fluoreszcens jelet (gerjesztési hullámhossz: 480 nm, emissziós hullámhossz: 520 nm). A kapott értékeket a kontrolhoz viszonyítva ábrázoltuk.

Eredmények és megbeszélésük

C-β-D-glükopiranozil-azol vegyületek szerkezet – gátlás vizsgálata

Az elmúlt évtizedek tudományos fejlődése új lehetőségeket nyitott új potenciális gyógyszer molekulák kutatására. Számítástechnika felhasználásával létrejött a szerkezet és ligandum alapú tervezés. Korábban vizsgált vegyületek szerkezeti összefüggéseit felismerve Joseph M. Hayes és munkatársai számítógépes szimulációval olyan új C-β-D-glükopiranozil-azol vegyületeket modelleztek, amelyeket korábban még nem szintetizáltak, és nem vizsgáltak GF inhibitorokként. A szimuláció során a vegyületeket az aktív centrumhoz való kötődési erejük alapján rangsorolták. A modellezett molekulák közül hét vegyület lett kiválasztva, melyeknek a szintetizálását a Debreceni Egyetem Szerves Kémiai Tanszékén Dr. Somsák László munkacsoportja végezte. Az elkészült vegyületek nyúl vázizom glikogén foszforiláz b-n végzett mérési, elemzési feladatai a mi feladatunk volt, és összehasonlítani a szimulációval kapott értékeket az in vitro kísérleti eredményekkel.

1. táblázat. 7 kiválasztott C-β-D-glükopiranozil-heterociklus szerkezete (A továbbiakban a vegyületek kódját – amelyet a szintézist végző munkatársak alkalmaztak - használjuk és csak a fontosabb szerkezeteket említjük kémiai névvel.)

Kód	Szerkezet	Kód	Szerkezet
5c		12a	
12b		12c	
13a		13b	
13c			

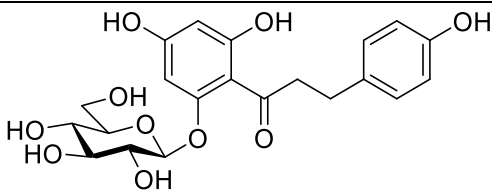
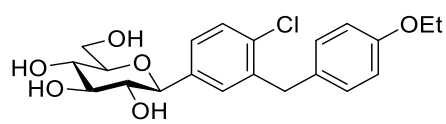
Hasonlóan a korábban vizsgált glükóz származék inhibitorokhoz, az általunk vizsgált vegyületek is kompetitív gátlószereknek bizonyultak, amelyet a vegyületek Dixon-diagramjai bizonyítanak, hiszen diagramok egyeneseseinek metszés pontjai az x tengely negatív tartományában találhatóak, amely a kompetitív gátlás jellemzője.

A vizsgált vegyületek közül a leghatékonyabbnak jósolt 5c vegyület volt képes legerősebben gátolni a GFb-t ($K_i = 1,97 \mu\text{M}$), de gátló hatása elmaradt a korábban vizsgált analógok nanomol gátlási értékeitől. A 13b imidazol-származék ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$) gátlóképessége a számításoknak megfelelően alakult, azonban a 13a ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$) és a 13c ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$) számolt értékei elmaradtak a mért értékekhez képest, utóbbi eltéréseknek az oka a szimuláció modell készletének beállításaiiban keresendő. A tiazol-származékok közül a 12b mért értéke ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$) hasonló a szimulációs értékhez képest, de 12a fenil-származék ($K_i = 326 \mu\text{M}$) és 12c 1-naftil-származék ($K_i = 540 \mu\text{M}$) vegyületek sokkal kevésbé gátolják a GFb-t, mint vártuk.

SGLT1 és 2 IC₅₀ meghatározás

Glikogén foszforiláz inhibitorokból sajnos nem született a klinikumban alkalmazott gyógyszer. Azonban S. Vidal összefoglaló cikke alapján (Donnier-Maréchal M, Vidal S: Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013 - 2015). Expert Opin Ther Pat. 2016;26(2):199-212.) a már forgalomban lévő SGLT2 inhibitorok általános szerkezete tartalmaz egy glükopiranoz gyűrűt, melyhez C-glikozid kötéssel kapcsolódik egy benzolgyűrű, emellett még egy aromás csoportot, melyet metilén híd köt a benzolgyűrűhöz. Munkatársaim számos glükózanalog inhibitorot szintetizáltak, amelyek hasonló szerkezettel rendelkeznek, mint a forgalomban kapható SGLT2 inhibitorok, de az első aromás gyűrű helyett heteroatomás gyűrűt: pirimidint, oxadiazolt vagy triazolt, tartalmaz a molekula. Ezért a benzolgyűrű helyett heteroaromás csoportot tartalmazó molekulák vizsgálatát tűztem ki célul, mint lehetséges SGLT inhibitor.

2. táblázat: SGLT1 és 2 gátlásra tesztelt vegyületek

Kód	Szerkezet	Kód	Szerkezet
17		18	

Kód	Szerkezet	Kód	Szerkezet
19a		19b	
19c		20a	
20b		20c	
21a		21b	
21c		21d	
22		23a	
23b		23c	
24			
25a		25b	

Kód	Szerkezet	Kód	Szerkezet
26a		26b	
27a		27b	
28a		28b	
29a		29b	

A vegyületek SGLT gátló hatásának mérésére két új stabil sejtvonalat hoztunk létre lentivirális vektor segítségével, melyek nagy mennyiségben expresszálják az SGLT1 és SGLT2 fehérjét. A transzfekció eredményét Western blot technikával ellenőriztük. Az eredmények azt igazolták, hogy jelentősen megemelkedett mindkét membrántranszport fehérje mennyisége.

Emellett a transzfekció után a sejtek glükózfelvételét is vizsgáltuk. A sejteket, mint a későbbiekben is 2-NBDG-vel kezeltük. A felvett glükóz mennyisége közel duplájára nőtt mindkét sejtvonal esetében. A sejtvonalakat dapagliflozin segítségével validáltuk, továbbá megvizsgáltuk a florizin, SGLT1 és 2 inhibitor hatását. A kezelt csoport glükózfelvetele jelentősen lecsökkent a kezeletlen csoport által felvett glükóz mennyiségéhez képest.

A kísérleteinkhez felhasznált glükóz származék inhibitorokat Somsák László és kutatócsoportja biztosította számunkra. A vizsgált molekuláinknak, melyek gátló hatással rendelkeztek, megvizsgáltuk a citotoxicitását is. Egyik vegyület esetében sem tapasztaltunk citotoxicitást.

A vizsgált vegyületeket 2 csoportra osztottuk, az egyik csoport tagjai újonnan szintetizált vegyületeket, a másik csoport már korábban glikogén foszforiláz gátlásra vizsgált vegyületeket tartalmazta. Az első csoport tagjai között azonosítottunk mikromolár tartományban gátolni képes vegyületeket (19a, 20a, 22 és 23c). Ezen vegyületek gyengébb gátló hatást mutattak, mint az ismert C-glükozil-arán típusú inhibitor, dapagliflozin (18), de aktivitásuk meghaladta a

florizinét (17). Emellett megerősítettük korábbi megfigyelésünket, amely szerint a C-glükozil(het)arén típusú SGLT2 inhibitorok proximális aromás gyűrűjének heterociklusokkal történő helyettesítése csökkenti a gátlást, amelynek mértéke erősen függ a heteroaromás gyűrű szerkezetétől.

A benzil-szubsztituált oxadiazol vegyületekben az oxadiazolgyűrű jelenléte nem befolyásolta szignifikánsan a gátló hatást (19a és 20a). A heterociklusos oxadiazol oxigénatomjának H-kötésre képes NH-csoporttal történő cseréje, (megfelelő 1,2,4-triazolt eredményezve) a gátlás 20-30-szoros gyengüléséhez vezetett (23a vs. 19a és 20a). Egy fenilgyűrű bejuttatása az 1,2,4-triazol N1-atomjára jelentősen növelte a hatékonyságot (23c vs. 23a), míg egy hidroxetilcsoport azonos helyzetbe való bejuttatása a gátlás teljes elvesztését okozta (23a vs. 23b). A 22 (imidazol) vegyület összehasonlítva a 23a-val (1,2,4-triazol), amely szintén tartalmaz NH csoportot, ~20-szor hatékonyabbnak bizonyult.

Az NH-csoport szerepe ellentmondásosnak tűnik, mivel a 22 vegyület erősebb, míg a 23a gyengébb inhibitor. Feltételezzük, hogy ez a 23a, 1,2,4-triazol három lehetséges tautomerformájának eredménye lehet, amelyek közül csak egy kötődhet a fehérjéhez, míg a 22 vegyületben található imidazol esetében a formálisan létező tautomerek lényegében megegyeznek egy lehetséges protonálódás következtében.

A gátlóhatás emellett nagymértékben függ az inhibitormolekula disztális aromás gyűrűjének szubsztitúciójától. Az 1,2,4- és 1,3,4-oxadiazolok esetében csak a szubsztituálatlan származékok (19a. és 20a.) gátolnak, míg egy metoxi- vagy klór-csoport bevezetése a benzolgyűrű para-helyzetébe, például a 19b, 20b, illetve 19c és 20c esetében, a gátlás teljes elvesztéséhez vezetett.

A pirimidin-sorozatban a (21a) benzil-származék mellett a 4-metoxi-benzil (21b) származék is gátló hatással rendelkezik mikromol tartományban. Azonban a 21c vegyület, amely 4-klór-benzil származék, gátló aktivitással nem rendelkezik. A disztális benzolgyűrű 2-naftilcsoporttal történő helyettesítése is egy gátló hatással nem rendelkező (21d) molekulát eredményezett.

Az eddig tárgyalt vegyületek (17-24) nem rendelkeznek jelentős nyúl vázizom GFb enzim gátló hatással, azonban a 25–29-ös vegyületek munkacsoportunk által már korábban vizsgált GF-inhibitorok csoportja. A vegyületeket a nem gátló anyagoktól az alacsony nanomól tartományban gátolni képes GF inhibitorokig választottuk ki. Ezeknek a vegyületeknek is megvizsgáltuk az SGLT1/2 gátló hatását. 25-29 vegyületek molekulái disztális aromás csoportként 2-naftil (25b – 29b) és fenil-csoportot (25a – 29a) tartalmaztak. A mérési eredményekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a 27 tiazolok mindkét vizsgált

transzporterrel szemben hatástalannak bizonyultak. A többi vegyületnek változó volt gátlóképessége, amely a heterociklusos csoport fontosságának szerepét jelzi.

A vizsgált vegyületek nagy része az SGLT2-t jobban gátolta, mint az SGLT1-et 2–27 szelektivitási tartományban. Két kivétel volt, a 26b és a 29b vegyületek, mindkettő 2-naftil szubsztituált, jobban gátolták az SGLT1-et. Két összehasonlításban, a 25a – 25b és a 28a – 28b, a 2-naftil-származékok ~ 7 , illetve 26-szor erősebb gátolták az SGLT2-t, mint az SGLT1-et.

A 2-(-D-glükopiranozil)4(5)-(2-naftil)-imidazol 28b vegyület, 3,5 μM SGLT2 IC_{50} értékével, a legjobb inhibitornak bizonyult, figyelembe véve a GF nanomol gátlását, a 28b vegyület egy több célpontú vegyület, amely kiindulópontja lehet egy több célmolekulán hatni képes antidiabetikus gyógyszernek. További kiterjedt számítási és szintetikus munkára lesz szükség a kettős cél hatékonyságának optimalizálásához.

Mindkét tanulmány jól mutatja, hogy hiába hódít egyre nagyobb teret magának a modern számítógépes molekulatervezés, az in vitro és in vivo kísérletek nem kerülhetők meg még a legprecízebb beállítások mellett sem. In vitro és in vivo rendszerekben a molekulák, makromolekulák szerkezetét nagymértékben befolyásolja a környezetük, ilyen komplex hatásokat nem lehet teljes mértékben modellezni, ezért gyakran egyszerűsített rendszert alkalmaznak. Ezáltal mindkét tanulmány bizonyítja, hogy a számítógépes molekulatervezést gyorsíthat a potenciális vegyületek azonosításában, de ön magában nem elég új gyógyszer molekulák kifejlesztésére, az in vitro kísérletek nem kerülhetők meg.

Összefoglalás

Az utóbbi évtizedben a tudomány gyors fejlődése megteremtette a lehetőségét, hogy a kutatók *in vitro* és *in vivo* kísérletek nélkül számítógép segítségével (*in silico*) gátlószereket tervezzenek. J. M. Hayes és munkatársai ilyen számítógépes szűrést végeztek, hogy lehetséges aktív centrumon keresztül gátolni képes glikogén foszforiláz inhibitor molekulákat azonosítsanak. A vizsgált vegyületek közül a 7 legígéretesebb molekula ki lett választva, melyeket Somsák László és munkacsoportja megszintetizált.

Jelen munkám egyik célja, hogy elvégezzük a kiválasztott vegyületek kinetikai méréseit, és összehasonlítsuk a számítógéppel kapott eredményeket az *in vitro* kísérletek során kapott eredményekkel. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a mért K_i -vel rendelkező vegyületek kompetitív módon gátolják az enzim aktív centrumát. A szimuláció által legjobb gátlószernak jóslott 5c vegyület rendelkezett a legalacsonyabb mért K_i értékkel ($1,97 \mu\text{M}$), de a számítógépes számítások előrejelzéseitől elmaradt. A 13b ($K_i = 4,58 \mu\text{M}$) 12b ($K_i = 26,2 \mu\text{M}$) erőssége megfelelt a számításoknak megfelelően azonban a 13a ($K_i = 68,6 \mu\text{M}$) és a 13c ($K_i = 71,1 \mu\text{M}$) a várt értéktől elmaradt. A 12a ($K_i = 326 \mu\text{M}$) 12c ($K_i = 540 \mu\text{M}$) vegyületek sokkal gyengébb inhibitoroknak bizonyultak, mint azt a számítások után vártuk.

Munkám másik részében glükóz analóg inhibitor vegyületek SGLT1 és 2 gátlóképességét vizsgáltam. A vizsgált vegyületek kiválasztásánál figyelembe vettük, hogy az orvosi gyakorlatban használt SGLT2 inhibitorok szerkezetéhez hasonló glikogén foszforiláz inhibitorok is képesek lehetnek gátolni az SGLT2 fehérjét. A vizsgálat elvégzéséhez lentivirális transzfekcióval létre hoztunk SGLT1 és SGLT2-t fehérjét overexpresszáló stabil sejtvonalakat. A transzfekció sikerességét Western blot, és 2-NBDG felvétel segítségével bizonyítottuk. Továbbá a sejtvonalakat dapagliflozin segítségével validáltuk. A tesztelt vegyületek nem mutattak citotoxicitást.

A vizsgált vegyületeket 2 csoportra osztottuk, egyik csoport tagjai újonnan szintetizált vegyületek, a másik csoport korábban glikogén foszforiláz gátlásra vizsgált vegyületek. Az első csoport tagjai között néhány új SGLT-inhibitor azonosítottunk, amelyek IC_{50} értékei mikromol tartományban volt, de elmaradtak az ismert C-glükozil-arén típusú inhibitorok gátlóképességéhez képest. A proximális aromás csoport, oxadiazol vagy triazolra történő cseréje a gátlás 20-30-szoros gyengüléséhez vezetett (23a vs. 19a és 20a). Egy fenilgyűrű bejuttatása az 1,2,4-triazol N1-atomjára jelentős hatékonyság javulást eredményezett (23c vs. 23a), míg egy hidroxil-etilcsoport azonos helyzetbe kapcsolása a gátlás teljes elvesztését okozta

(23a vs. 23b). A 22 (imidazol) a 23a-val (1,2,4-triazol) összehasonlítva, amely szintén tartalmaz NH-csoportot, ~20-szor hatékonyabbnak bizonyult. Második csoportban a tiazolt tartalmazó vegyületek nem mutattak gátló hatást. A vegyületek többsége az SGLT2-t jobban gátolta, mint az SGLT1-et, kivétel a 26b és a 29b vegyületek, melyek az SGLT1-et gátolták jobban. Továbbá a 25a – 25b és a 28a – 28b összehasonlításban, a 2-naftil-származékok erősebb gátolták az SGLT2-t, mint az SGLT1-et. A 28b vegyület, 3,5 μM SGLT2 IC_{50} értékével, a legjobb inhibitornak bizonyult, és figyelembe véve a GF nanomol gátlását, a 28b vegyület egy több célpontú vegyület, amely kiindulópontja lehet további antidiabetikus vizsgálatokban.



Nyilvántartási szám: DEENK/342/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Sipos Ádám

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

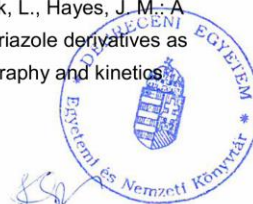
1. **Sipos, Á.**, Szennyés, E., Hajnal, É., Kun, S., Szabó, E. K., Uray, K., Somsák, L., Docsa, T., Bokor, É.: Dual-Target Compounds against Type 2 Diabetes Mellitus: proof of Concept for Sodium Dependent Glucose Transporter (SGLT) and Glycogen Phosphorylase (GP) Inhibitors. *Pharmaceuticals*. 14 (4), 1-27, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ph14040364>
IF: 5.863 (2020)
2. Barr, D., Szennyés, E., Bokor, É., Al-Oanzi, Z. H., Moffatt, C., Kun, S., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Davies, M. P., Mathomes, R. T., Snape, T. J., Agius, L., Somsák, L., Hayes, J. M.: Identification of C-[béta]-d-Glucopyranosyl Azole-Type Inhibitors of Glycogen Phosphorylase That Reduce Glycogenolysis in Hepatocytes: in Silico Design, Synthesis, in Vitro Kinetics, and ex Vivo Studies. *ACS Chem. Biol.* 14 (7), 1460-1470, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acscchembio.9b00172>
IF: 4.434





További közlemények

3. Docsa, T., Bhattarai, D., **Sipos, Á.**, Wade, C. E., Cox, C. S., Uray, K.: CXCL1 is upregulated during the development of ileus resulting in decreased intestinal contractile activity. *Neurogastroenterol. Motil.* 32 (3), 1-12, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.13757>
IF: 3.598
4. Kun, S., Kánya, N., Galó, N., Páhi, A., Mándi, A., Kurtán, T., Makleit, P., Veres, S., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Somsák, L.: Glucopyranosylidene-spiro-benzo[b][1,4]oxazinones and -benzo[b][1,4]thiazinones: Synthesis and Investigation of Their Effects on Glycogen Phosphorylase and Plant Growth Inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 67 (24), 6884-6891, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00443>
IF: 4.192
5. Szabó, E. K., Kyriakis, E., Psarra, A. M. G., Karra, A. G., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Stravodimos, G. A., Katsidou, E., Skamnaki, V. T., Liggri, P. G. V., Zographos, S. E., Mándi, A., Király, S. B., Kurtán, T., Leonidas, D. D., Somsák, L.: Glucopyranosylidene-spiro-imidazolinones, a New Ring System: Synthesis and Evaluation as Glycogen Phosphorylase Inhibitors by Enzyme Kinetics and X-ray Crystallography. *J. Med. Chem.* 62 (13), 6116-6136, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.jmedchem.9b00356>
IF: 6.205
6. Szennyés, E., Bokor, É., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Somsák, L.: Synthesis of C- β -D-glucopyranosyl derivatives of some fused azoles for the inhibition of glycogen phosphorylase. *Carbohydr. Res.* 472, 33-41, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2018.11.003>
IF: 1.841
7. Kun, S., Begum, J., Kyriakis, E., Stamati, E. C. V., Barkas, T. A., Szennyés, E., Bokor, É., Szabó, E. K., Stravodimos, G. A., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Gergely, P., Moffatt, C., Patraskaki, M. S., Kokolaki, M. C., Gkerdi, A., Skamnaki, V. T., Leonidas, D. D., Somsák, L., Hayes, J. M.: A multidisciplinary study of 3-(β -D-glucopyranosyl)-5-substituted-1,2,4-triazole derivatives as glycogen phosphorylase inhibitors: computation, synthesis, crystallography and kinetics reveal new potent inhibitors. *Eur. J. Med. Chem.* 147, 266-278, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.095>
IF: 4.833





8. Kun, S., Bokor, É., **Sipos, Á.**, Docsa, T., Somsák, L.: Synthesis of New C- and N-β-d-Glucopyranosyl Derivatives of Imidazole, 1,2,3-Triazole and Tetrazole, and Their Evaluation as Inhibitors of Glycogen Phosphorylase.
Molecules. 23 (3), 1-17, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/molecules23030666>
IF: 3.06
9. Szennyey, E., Bokor, É., Langer, P., Gyémánt, G., Docsa, T., **Sipos, Á.**, Somsák, L.: The first general synthesis of 2-C-(β-D-glucopyranosyl)pyrimidines and their evaluation as inhibitors of some glycoenzymes.
New J. Chem. 42 (21), 17439-17446, 2018.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1039/C8NJ04035D>
IF: 3.069

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 37,095

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
10,297**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.02.07.

