

# MÁSODLAGOS ANYAGCSERETERMÉKEK = SZEKUNDER METABOLITOK



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

1

## Szekunder metabolitok

Metabolitok: az anyagcsere során keletkező kis méretű közti- és végtermék molekulák.

Az anyagcserét és a metabolitokat két csoportra (elsődleges = primer és másodlagos = szekunder) osztják.

Az elsődleges anyagcsere folyamatai és molekulái közvetlenül részt vesznek a normális növekedésben, létfenntartásban és energiatermelésben (anabolizmus és katabolizmus). Hiányukban az élőlény általában elpusztul.

A másodlagos anyagcsere folyamatai és molekulái nem vesznek részt közvetlenül ezekben a folyamatokban, célszerűségük, hasznosságuk nehezen értelmezhető. Nem létfontosságúak, megjelenésük csak bizonyos életszakaszokban jellemző.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

2

## Szekunder metabolitok

... a másodlagos anyagcsere termékei, amelyek az elsődleges anyagcsere termékeiből kedvezőtlen (pl. tápanyaghiányos) körülmények között, a növekedés késői, korlátozott fázisában képződnek.

A primer és szekunder metabolizmus közötti kapcsolatot a kulcsenzimek, „átjárók” jelentik, mennyiségük és aktivitásuk szabályozza a szekunder metabolitok termelését. → génmanipulációt ezeken érdemes végezni.



## Szekunder metabolizmus

Szénforrás szabályozás: katabolit represszió – ha bőségesen van hozzáférhető C-forrás, akkor az elsődleges anyagcsere pörög, nincs termékképzés. →

- glükóz limit (adagolás apránként), vagy
- lassan metabolizálható C-forrás, pl. poliszacharidok (keményítő, dextrin), laktóz, növényi olajok.

Nitrogén szabályozás: változó, de a sok N általában a növekedésnek kedvez → elsődleges anyagcsere

- Az ammónium sók gyakran represszálják a termékképzést, inkább szerves N-forrás (szójaliszt, kukoricalekvár)
- fed batch – adagolással alacsony szinten tartani a koncentrációt.



## Szekunder metabolizmus

### Foszfor szabályzás:

- befolyásolja mikroba növekedési sebességét, anyagcseréjét, szénhidrát égetésének sebességét
  - bizonyos koncentráció felett negatívan szabályoz, (hozzájárul a gyors C égetéshez)
  - túl nagy koncentrációja a szintetáz enzimek képződését gátolja
- alacsony indulási P koncentráció, csak annyi, hogy a szaporodási szakasz végére elfogyjon.

### Enzim indukció:

- A kulcsenzimek némelyike indukálható speciális tápanyaggal pl: metionin → cephalosporin



# TUMORELLENES BIOTECHNOLÓGIAI HATÓANYAGOK



## A DNS-RE HATÓ (RÁKELLENES) METABOLITOK

### Közös tulajdonságok:

- citosztatikusak (humán sejtek osztódását gátolják)
- a DNS-sel lépnek kölcsönhatásba valamilyen módon
- gyorsan osztódó szövetekre hatnak elsősorban, ezért a daganatokon kívül károsítják:
  - a vérképző szerveket
  - ivarsejteket
  - hajhagymákat
  - nyálkahártyákat
  - immunrendszert (az idegsejteket nem!)
- terápiás indexük (legkisebb mérgező adag/legkisebb hatásos adag) alacsony

A hatás szerinti csoporton belül 5 fő szerkezeti csoport



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

7

## AKTINOMICINEK

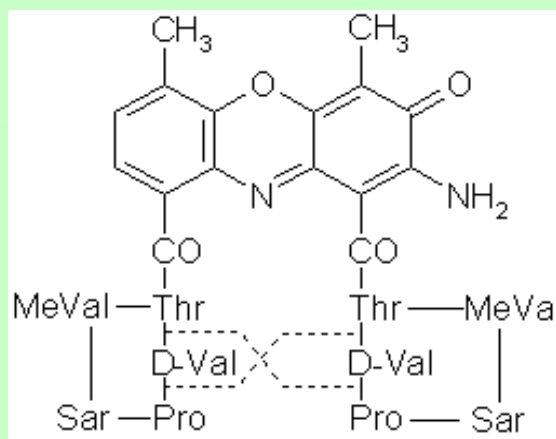
Szerkezet: fenoxazin-ciklopeptidek, H-hidak stabilizálják

MeVal = metil-valin

Sar = szarkozin

### Tulajdonságok:

- oxigén-, szabad gyök-fény- és hőérzékeny
- oldhatóság: vízben, alkoholban jó, éterben rossz
- színesek (ez itt vörös)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

8

## AKTINOMICINEK 2.

**Bioszintézis:** a ciklopeptidek tiotempláton képződnek, az alapváz a triptofán bomlástermékeiből indul, két egyforma aromás vegyület dimerje.

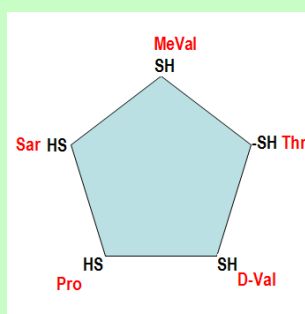
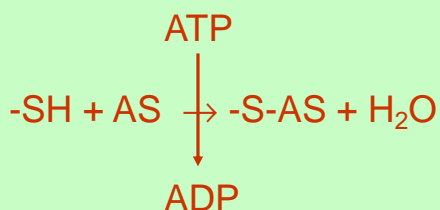
**Gyártás:** fermentáció, de különleges intézkedésekkel. Az anyag nagyon toxikus, pora vagy aeroszolja belélegezve, vagy a bőrön át is ártalmas. Az egész folyamatot, a feldolgozást is beleértve teljesen zárt rendszerben hajtják végre (**CONTAINMENT**). A legvégén, ahol már nem lehet zárni, a dolgozók „úrhajós” védőruhában dolgoznak.

**Toxicitás:** vörös csontvelő, gyomor és béltünetek, vesekárosítás. Reverzibilis.



## A ciklopeptid antibiotikumok bioszintézise

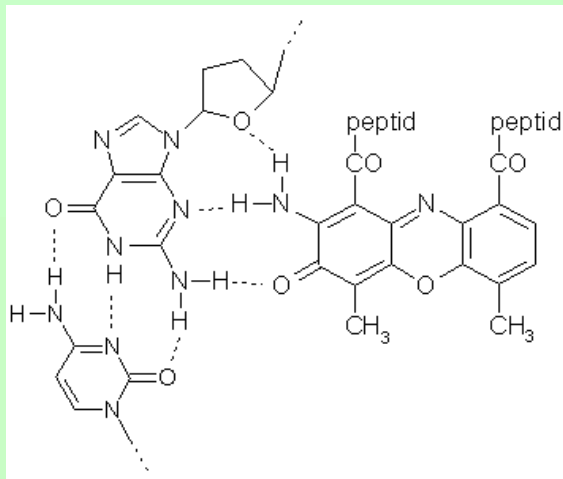
**NEM-riboszomális** fehérjeszintézis, a peptid egy multienzim komplex (**tio-templát**) felszínén képződik. Annyi kötőhely van, ahány aminosav kapcsolódik. Minden kötőhely specifikusan felismeri a megfelelő aminosavat, és egy –SH csoporton **tio-észter** formában köti meg (ATP igény, aktiválás), majd az aminosavak között létrejön a peptidkötés.



## AKTINOMICINEK 3.

Támadáspont: a DNS-re kötődik, két egymás melletti guanin közé, sok H-híddal. Gátolja a kiírást, kis koncentrációban a mRNS szintézist, nagyobbban a DNS másolást

Az alapváz a guaninokkal párhuzamosan áll ↓



## AKTINOMICINEK 4.

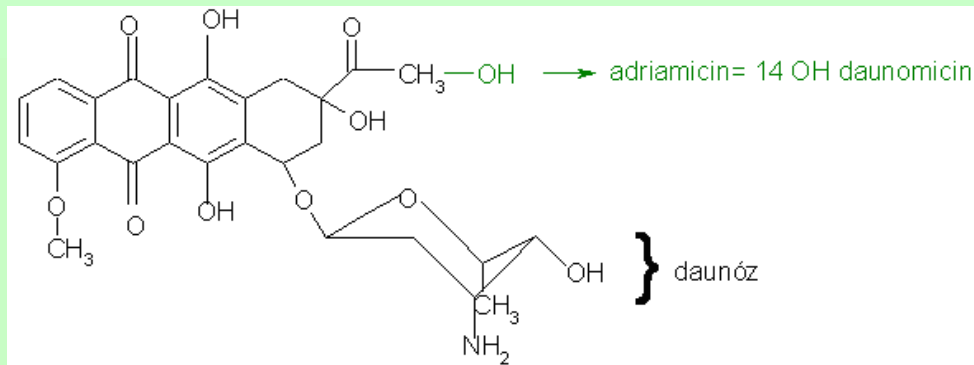
Zöld: G-C pár  
Kék: A-T pár  
Piros: aktinomycin  
Sárga: cukor-foszfát lánc



## ANTRACIKLINEK (daunomicin, adriamicin = doxorubicin)

*Str. peuceoticus*, (1963, 1969)

Szerkezet:



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

13

## ANTRACIKLINEK 2.

Tulajdonságok:

- vörös kristályos anyag
- hidrokloridját (.HCl) hozzák forgalomba (aminocukor)
- maró, hólyaghúzó anyag
- kémiai módosítással létrehozott származékainak hatása mind gyengébb

Bioszintézis:

A tetraciklinekkel analóg poliketid típusú bioszintézis

Előállítás:

fermentációval



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

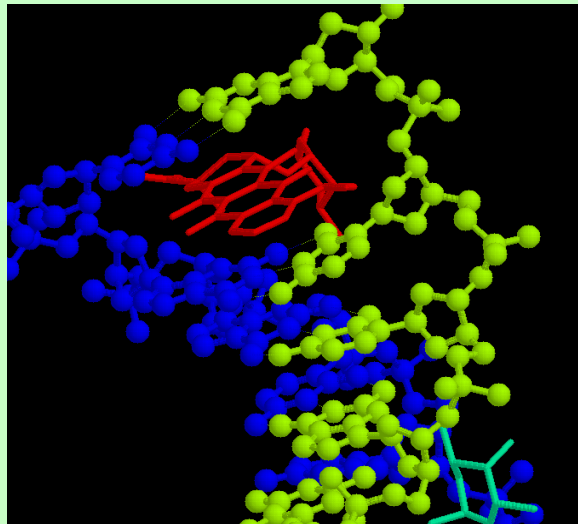
14

## ANTRACIKLINEK 3.

### Hatás:

A DNS láncok közé ékelődik, a cukor a dezoxiribózfoszfat láncokhoz köt.

60-100 bázispáronként talál egy alkalmas kötődési helyet.



## ANTRACIKLINEK 4.

Hatás: a rákötődött antraciklinek sok enzim hozzáférését akadályozzák:

- Polimerázok: gátolja az átírást RNS-re, DNS-re, különösen az rRNS-re
- DN-ázok: a DNS „túl stabil”, nem bontható
- Topoizomerázok: a topoizomerázok a replikáció során elvágják, majd összeligálják a DNS egyik szálát, ezzel is akadályozza a duplikációt.





## ANTRACIKLINEK 5.

### Hatásspektrum:

leukémia, szarkómák, Hodgkin-kór, neuroblastoma, stb.

### Toxicitás:

- az általános + szívelégtelenség (tachycardia, arhythmia, stb)
- ha a bőrre kerül, hólyaghúzó hatású (másodfokú égéshez hasonló tünetek: hólyagok stb.)
- az Adriamicin kevésbé toxikus

### Felhasználás:

infúzióban, erősen hígítva (mert az érfalat is károsítja)

Terápiás indexe kicsi



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

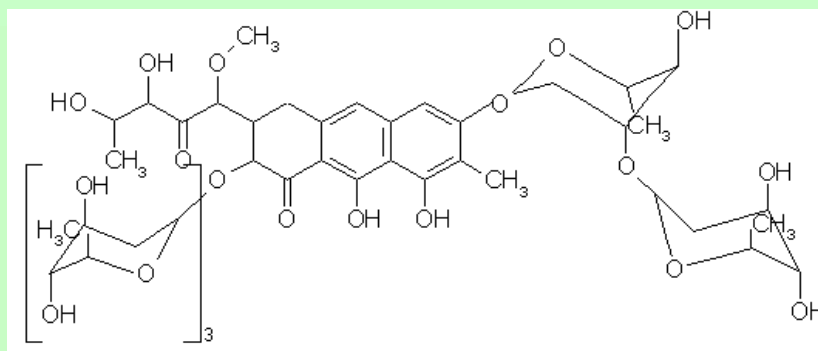
17

## CHROMOMICINEK

MITRAMICIN (*Str. argillaceus*, *Str. tanashiensis*, 1962)

OLIVOMICIN (*Str. olivoreticuli*, 1962)

Szerkezet: az aglikon (cukor nélküli rész) = chromomicin + 5 db mikaróz



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

18

## CHROMOMICINEK 2.

### Tulajdonságok:

- sárga, kristályos anyag
- pH = 4 alatt hidrolizál
- kétértékű ionokkal kelátot képez, a vas-kelátja oldhatatlan, ezért biológiailag inaktív, a Ca- és Mg-kelát oldható

### Hatásspektrum:

malignus hypercalcaemia ellen → leviszi a kalcium szintet  
→ zavarja a véralvadást is

### Toxicitás:

az általános + máj- és veseműködési zavarok

### Felhasználás:

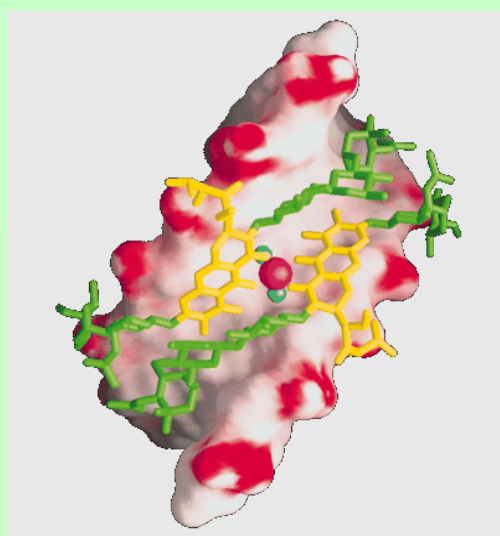
infúzióban, erősen hígítva



## CHROMOMICINEK 3.

### Támadáspont:

Komplexet képez a DNS-sel: két DNS spirál,  $Mg^{2+}$ , + mitramicin dimer →  
Az aglikon a guaninhoz, a cukrok a foszfátlánchoz kötődnek,  
Gátolja a transzkripciót DNS-re és RNS-re egyaránt, de a reverz transzkriptázokat nem



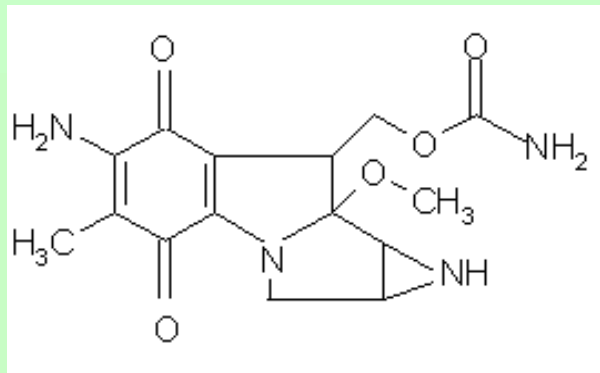
## MITOZÁNOK

### MITOMICIN C (*Str. caespitosus*, 1956)

Szerkezet: (ezt hozzák forgalomba, de ez még nem aktív)

#### Tulajdonságok:

- vörös, kristályos anyag
- bomlékony, oxidáló hatásra, fényre érzékeny
- alkoholban jól oldódik, vízben alig



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

21

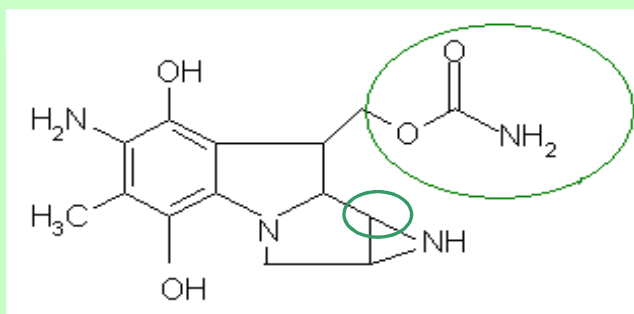
## A MITOMICIN AKTIVÁLÁSA

Szöveti enzimek aktiválják, szelektív, kettős alkilezőszerré válik.

Toxicitás: általános + bőrkiütést okoz

#### Alkalmazás:

emésztőcsatorna rákjai, pikkelysömör, melanómák (veszélyes áttételek) ellen  
Intravénás injekcióban

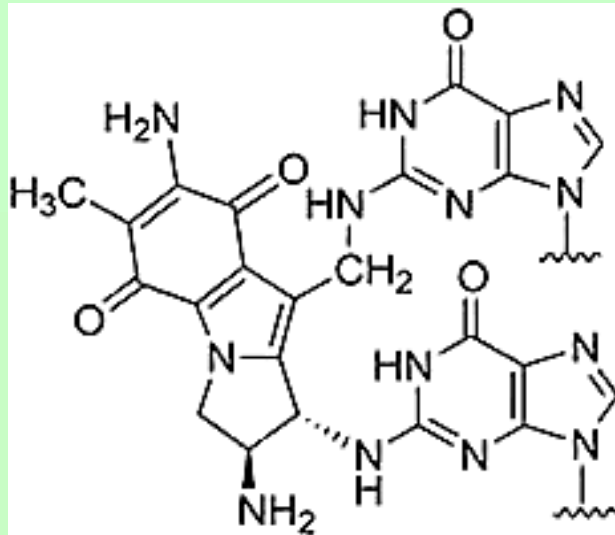


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

22

## A MITOMICIN KÖTŐDÉSE

A DNS két, külön szálon fekvő guaninjával reagál, kovalens keresztkötéseket hoz létre.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

23

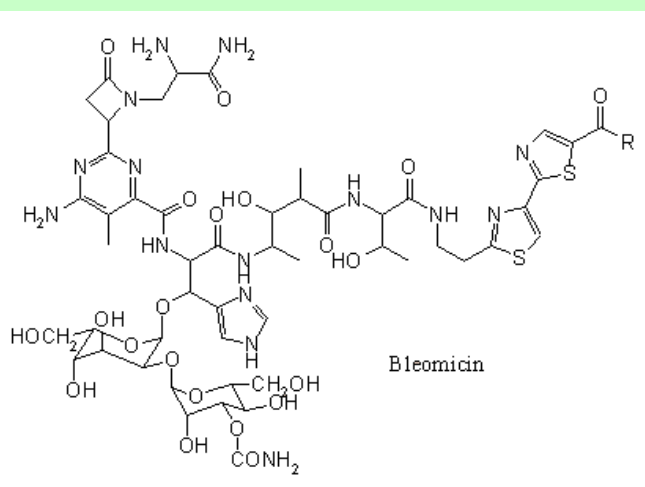
## BLEOMICINEK

*Str. verticillus*, 1956

Szerkezet: szokatlan aminosav-származékokból áll

Tulajdonságok:

- krémszínű kristályok
- higroszkópos
- vízben jól oldódik
- redox érzékeny (SH vegyületek,  $H_2O_2$ , aszkorbinsav, nehézfémionok inaktíválják)

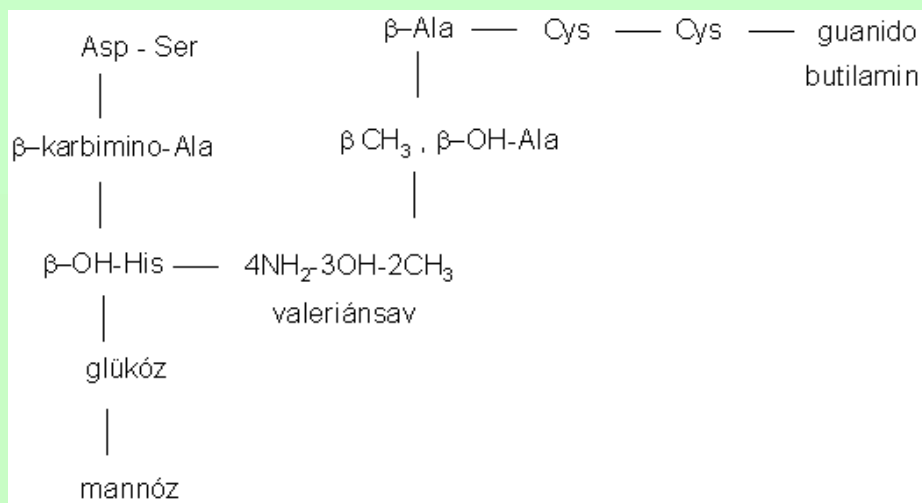


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

24

## BLEOMICINEK 2.

### Bioszintézis:



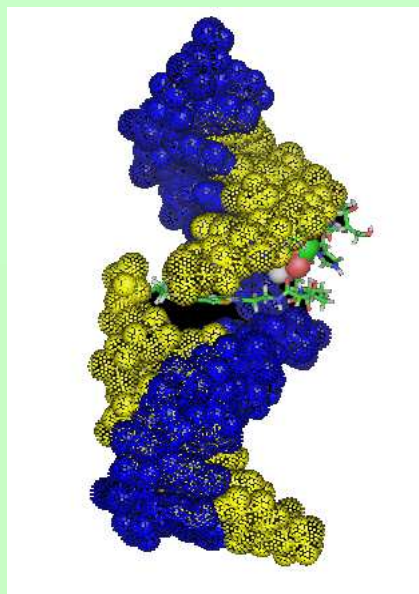
## BLEOMICINEK 3.

### Hatás:

- Beilleszkedik a DNS kettős spirál kisebbik hajlatába
- Gátolja a timidin beépülését a DNS-be
- Jelenlétében a DNS fragmentálódik

### Alkalmazás:

- csak parenterálisan
- nincs immunosuppresszív hatása, mert a nyirokszövetek enzimeit lebontják



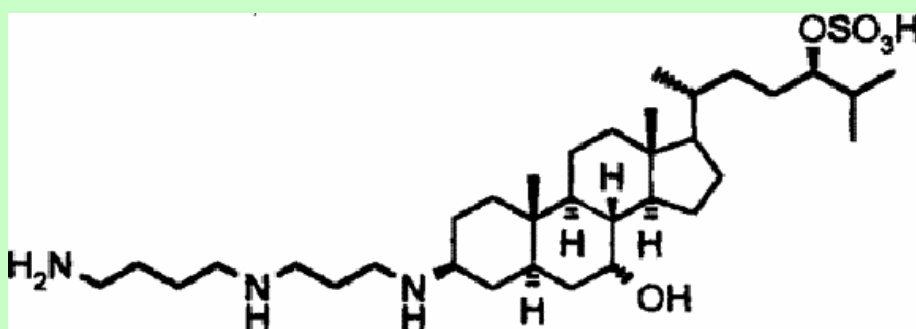
## SQUALAMIN

1992-ben izolálták a *Squalus acanthias* (cápa fajta) májából

Tulajdonságok:

vízoldható, ellenálló molekula, nem bomlékony

Szerkezet: szteránvázás, ikerionos



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

27

## SQUALAMIN 2.

Bioszintézis:

epealkoholokhoz hasonló, poliamin módosítással, prekursoroként szerepelhetnek a szteroidalkoholok.

Előállítás: szintetikusan

Hatás:

Közvetlenül gátolja az endothel (érfal) sejtek aktivációját, mozgását és szaporodását, így a tumor vérellátását csökkenti (a tumornak a gyors szaporodáshoz megfelelő vérellátással kell rendelkeznie)

mikroba-, tumor-, angiogenezis- (érfal regeneráció, különböző növekedési faktorok hatására) gátló hatású



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

28

## SQUALAMIN 3.

### Hatásspektrum:

Gliómák (agydaganat), kóros érfalnövekedés okozta betegségek (rák, diabeteszes retinopátia (vaksághoz vezethet), fibrodysplasia ossificans progressiva (genetikai betegség: a nagyobb izmokban folytatódik a csontok képzése ez mozgáskorlátozottsághoz vezet), tüdőrák, petefészekrák, egyéb tumorok, melanóma, emlő-, agyi tumorok

### Felhasználás/Alkalmazás:

Kemoterapikumokkal (pl. Cytosan) kombinálva

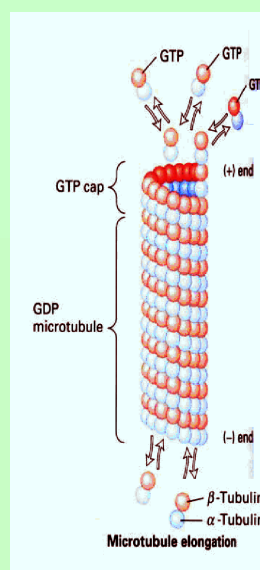


## MIKROTUBULUSOKRA HATÓ TUMORELLENES SZEREK

A mikrotubulus kb. 25 nm vastag üreges képződmény, egy jobbmenetes rövidmenetű és egy balmenetes hosszúmenetű helixből áll. Alapegysége, a tubulin nem egységes, megkülönböztetünk  $\alpha$ - és  $\beta$ -tubulint, ezek heterodimer párt alkotnak.

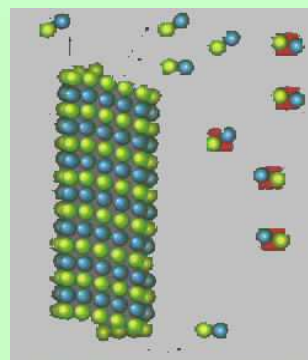
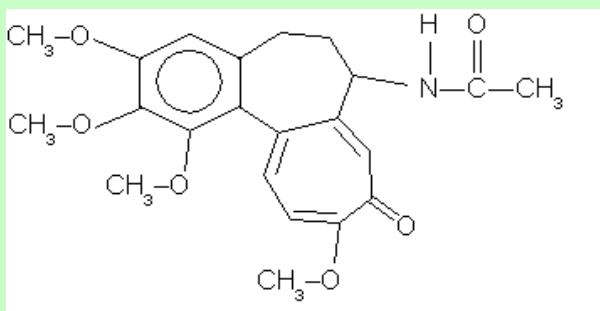
Molekulasúlya kb. 50 kD

A polimerizáció-depolimerizáció egyidejűleg folyik, kémiailag GTP és  $Mg^{2+}$  szükséges hozzá.  $37^{\circ}C$  körül a polimerizáció, míg alacsonyabb hőmérsékleten a depolimerizáció a jellemző.



## A MT POLIMERIZÁCIÓT BEFOLYÁSOLÓ SZEREK

**Colchicin:** őszi kikericsből (*Colchicum autumnale*) izolálható antimitotikum; a MT polimerizációt gátolja. Gyógyszer, de tumorok ellen nem alkalmazzák túlságosan erős mellékhatásai miatt. Kis adagokban köszvény és reuma ellen adják. In vitro kísérletekben bevált inhibitor. Ültetvényeken természetik, magját extrahálják.

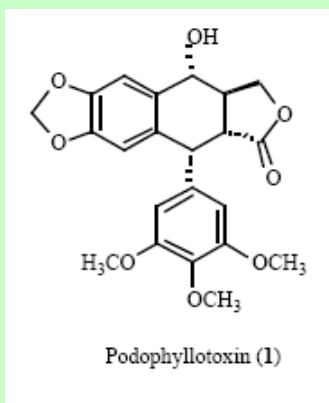


BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

31

## PODOFILLOTOXIN

**Podofillotoxin:** a amerikai mandragora (*Podophyllum peltatum*) rizómájában található lignán



Kompetitív a tubulinkötésben a kolhicinnel, de nem pontosan ugyanoda köt, inkább sztérikus átfedés van.

Egyéb hatásai: hánytató, bőrizgató, szemölcsirtó



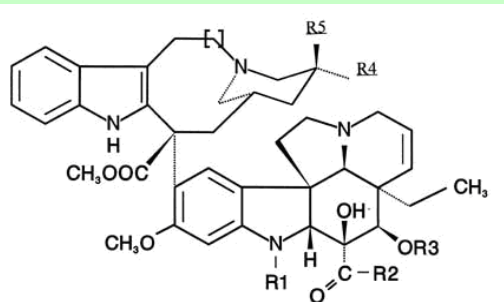
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

32



## VINCA ALKALOIDOK

Rózsameténgből (*Catharantus roseus*, régi nevén *Vinca roseus*) származó vincristin, vinblastin, és ezek szintetikus származékai; MT polimerizációt gátló antimitotikus szerek.



	R1	R2	R3	R4	R5	[ ]
vincristine	CHO	OCH <sub>3</sub>	OCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	--
vinblastine	CH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCOCH <sub>3</sub>	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH	--



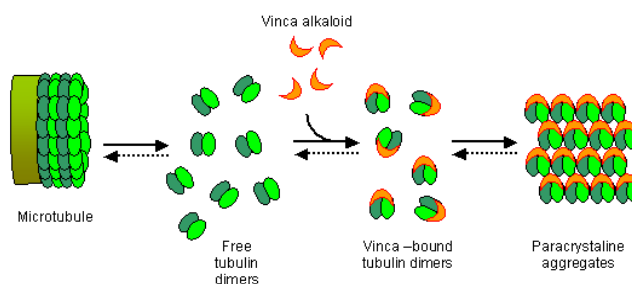
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

33

## A VINCA ALKALOIDOK HATÁSA

A vinca alkaloidok sejtspecifikus ágensek, melyek az osztódó sejteket blokkolják a mitózis folyamatában (metafázisban).

Specifikusan képesek a tubulinhoz kötődni, a heterodimer tubulin béta egységével irreverzibilisen asszociátumot képeznek. Ettől a dimerek összekapcsolódva nem spirált alkotnak, hanem „kikristályosodnak”. Húzófonalak hiányában a sejt osztódása megáll.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

34

## A VINCA ALKALOIDOK ALKALMAZÁSA

Alkalmazás: limfómák, tüdőrák, áttételes tumorok esetén.

Mellékhatások: az általános, + a vinkrisztin esetében idegrendszeri tünetek.

A gyógyászati alkalmazásuk során főleg intravénásan, infúzióban adagolják (szulfátsók formájában). Jelentős szövetirritáló hatásuk van.

Metabolizmusuk főleg a májban megy végbe. Számos metabolitját azonosították, mindegyiknek csökkent a biológiai aktivitása.

Kiürülés: kb. 24 óra alatt, a vinchristin eliminációja lassabb Adagját testfelületre számolják ki (mg/m<sup>2</sup>)



## A VINCA ALKALOIDOK ELŐÁLLÍTÁSA

A vinblastin és vinchristin mennyisége a *Catharantus roseus*-ban kicsi, mindössze 0,0005%, ezért az extrahált termék ára magas.

Más utak:

Növényi szövettenyésztés: kalluszban és szuszpenzióban is működik, de rossz kihozattal.

Alegység kapcsolás: A vinblastin két monomer egységből épül fel, a catharantinból és a vindolinból. A vindolin koncentrációja a *C. roseus*-ban kb. 0,2%, jóval nagyobb, mint a catharantiné. Tehát célszerű a vindolint a növényből extrahálni, és catharantint szövettenyésztésben előállítani, majd ezeket enzi-mes, vagy kémiai úton összekapcsolni.



## TAXOL

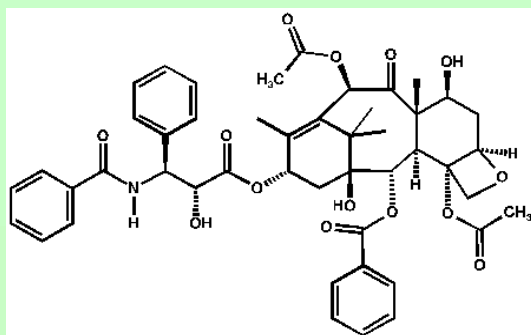
Taxol: az oregoni tiszafa (*Taxus brevifolia*) kérgéből izolálható; MT stabilizáló antimitotikum)



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

37

## A TAXOL TULAJDONSÁGAI



Vízben rosszul oldódik, szerves oldószerekben jól. A szervezetbe ezért emulzióban viszik be.

Alkalmazása: petefészek-, méh- és emlődaganatok, agyi tumorok, tüdőrák.

Hatása: sztöchiometrikusan kapcsolódik a beépült tubulinhoz, azaz nem a mikrotubulusok felépülését, hanem lebomlását akadályozza. Kombinálható a polimerizációgátlókkal.



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

38

## A TAXOL ELŐÁLLÍTÁSA

A természetes források nagyon korlátozottak, mert a tiszafa igen lassan nő (több száz év), és a kérgében nagyon kis mennyiségben (50-150 mg/kg) fordul elő a taxol, a tűlevelében még kevesebb, 15-50 mg/kg van. Egy beteg kezeléséhez három öreg tiszafát kellene feldolgozni.

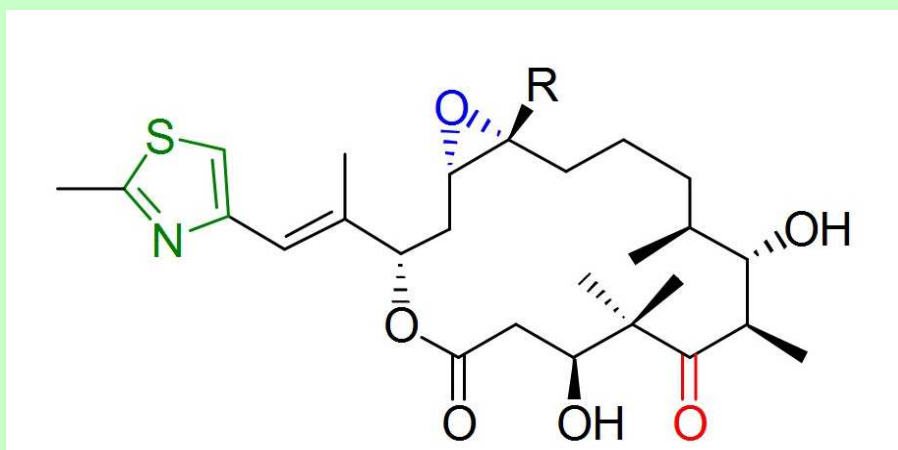
Alternatív eljárások:

- félszintézis más taxánvázás anyagokból
- totálszintézis: megoldható, de drága (négy C\*)
- tűlevelek extrakciója (megújul, nem kell a fát kivágni)
- növényi szövettenyésztés



## EPOTILON(ok)

EPOxy + TlazoL + ketON = EPOTILON



## EPOTILON(ok)

1987-ben fedezték fel, egy talajbaktérium, a *Sorangium celulosum* (*Myxobacteria*) termeli.  
(De heterológ expresszióval más törzsekkel is lehet termeltetni.)

Erős citotoxikus hatása van az eukariótákra – a *Mucor* fajokra és az állati sejtekre.

Makrolakton = nagy (16 tagú) gyűrű,  
lakton = a gyűrű intramolekuláris észterkötéssel zárul.



## HATÁS

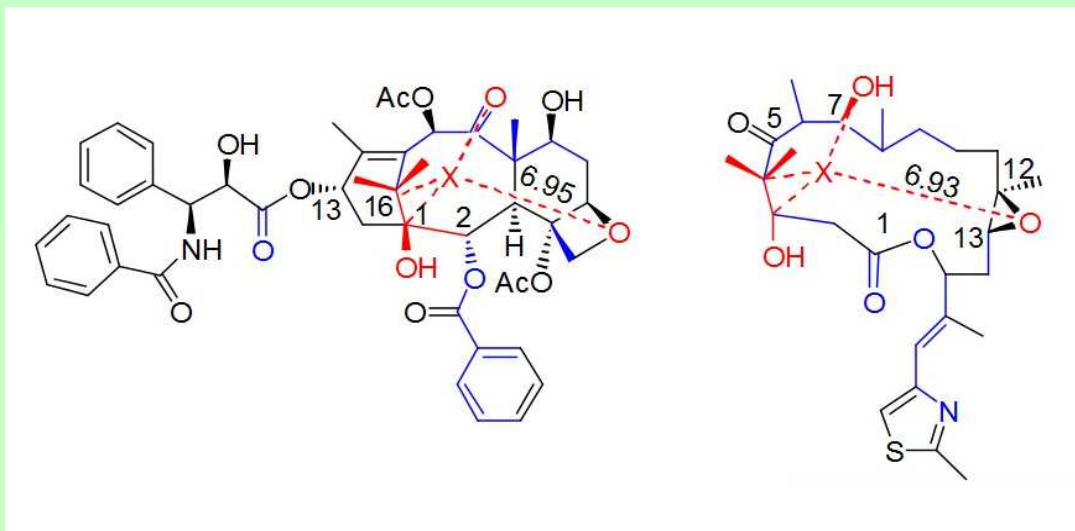
A hatásmechanizmus teljesen analóg a Taxollal.  
A már beépült tubulinhoz kapcsolódik, a mikrotubulusok lebomlását akadályozza. Ezzel megállítja a mitotikus sejtosztódást, a sejtciklus megakad, a sejtek elpusztulnak.

Ugyanazon a ponton kötődnek, kompetitíven leszorítják egymást.

A két molekula hasonlósága ábrán is bemutatható:



## SZERKEZETANALÓGIA



## HATÁS

Az azonos hatásmechanizmus mellett az epotilonoknak több előnye is van a Taxollal szemben:

- Jobb a vízoldhatóságuk, ezért nem kell segédanyagokat alkalmazni
- Egyszerűbb a szerkezetük, könnyebb előállítani és származékot képezni.
- Kevésbé károsítja a makrofág sejteket
- Kisebb koncentrációban hatékony →
- Több taxol-rezisztens tumor sejtvonal ellen is hatásos



## IN VITRO HATÉKONYSÁG IC50 értékek (nM)

Cancer Cell Line	Epo A	Epo B	Taxol
A549 (Lung)	2.67	0.19	3.75
T-24 (Bladder)	3.77	0.25	4.40
MCF-7 (Breast)	1.49	0.42	2.53
<b>MCF-7/ADR (Breast, MRM/MDR)</b>	<b>27.50</b>	<b>2.92</b>	<b>9105</b>
PC-3M (Prostate)	4.27	3.8	6.71
HCT-116 (Colon)	2.51	0.42	1.96
A-431 (Epidermoid)	2.35	0.26	1.66
KB-31 (Epidermoid, parental)	2.10	0.71	2.90
<b>KB-8511 (Epidermoid, MDR)</b>	<b>1.90</b>	<b>0.89</b>	<b>994</b>
1A9 (Ovarian, parental)	2.00	0.06	5.11
<b>1A9PTX-10 (Ovarian, tubulin mutation)</b>	<b>-</b>	<b>18.4</b>	<b>82.5</b>



## BIOSZINTÉZIS

A *Sorangium cellulosum* 2:1 arányban termeli az A és B molekulát.

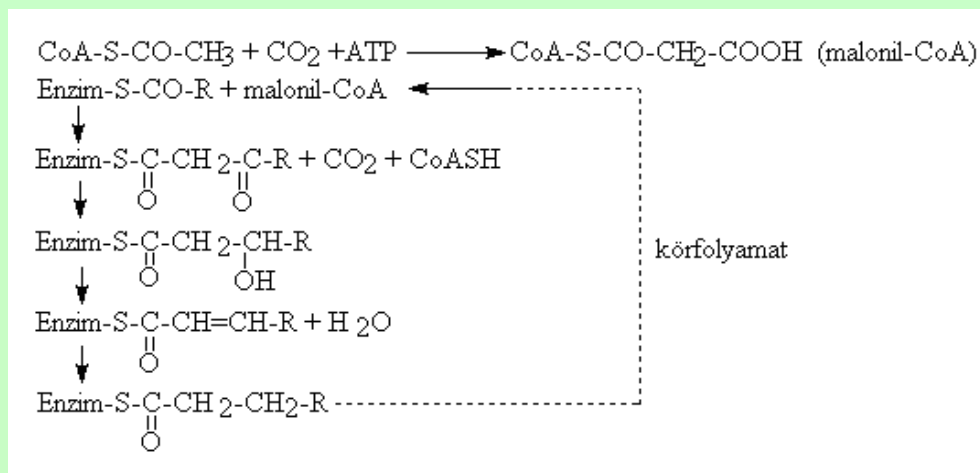
Sok lépéses bioszintézis, három fő szakaszának moduljai (gén/enzimcsoport):

- Egy nem-riboszomális peptid szintetáz (ciszteinből és Ac-CoA-ból létrehozza a tiazol gyűrűt)
- Kilenc poliketid szintetáz egység (létrehozza a szénláncot)
- Egy citokróm P450 monooxygenáz (epoxidálás)



## POLIKETID BIOSZINTÉZIS

= a zsírsavszintézis reakciói:



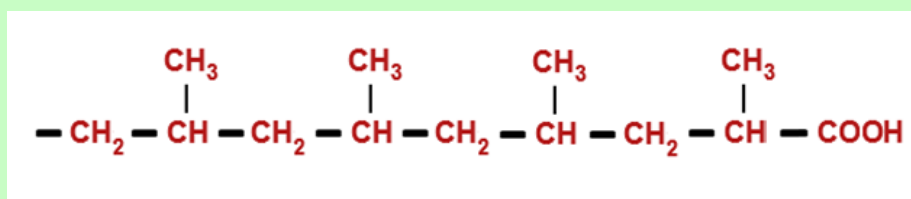
BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

47

## POLIKETID BIOSZINTÉZIS

A szekunder metabolizmusnál nem mindig megy végig a redukció, hanem valamelyik lépcsőn megáll (=O, -OH, C=C).

Ha Ac-CoA helyett propionil-CoA épül be, abból köztitermék-ként metil-malonil-CoA lesz, ami összeépülve metil-csoportokat eredményez a szénláncon („szögesdrót” szerkezet):



BME Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudomány Tanszék

48



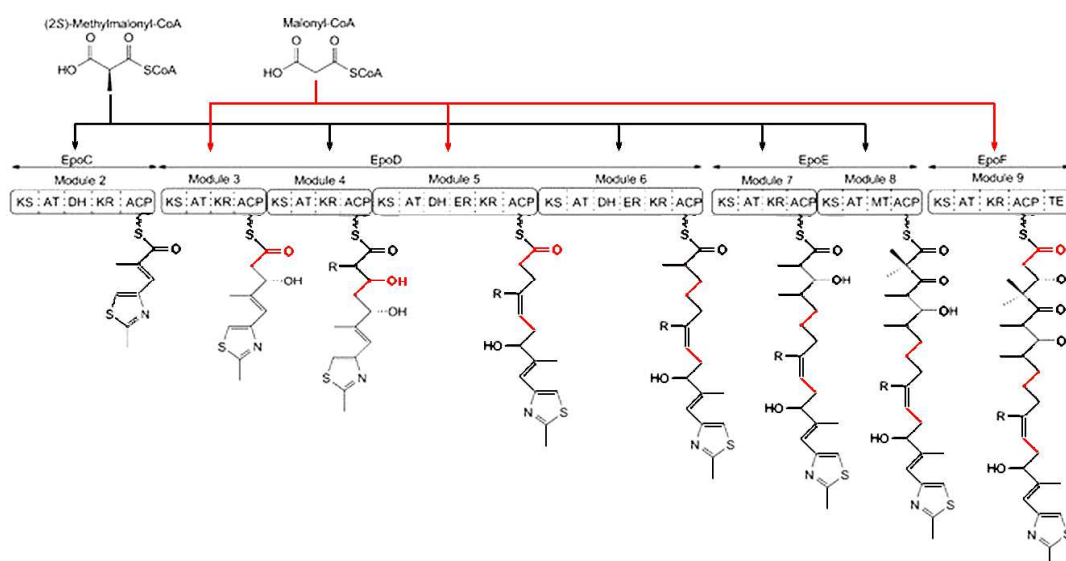
## EPOTILON BIOSZINTÉZIS

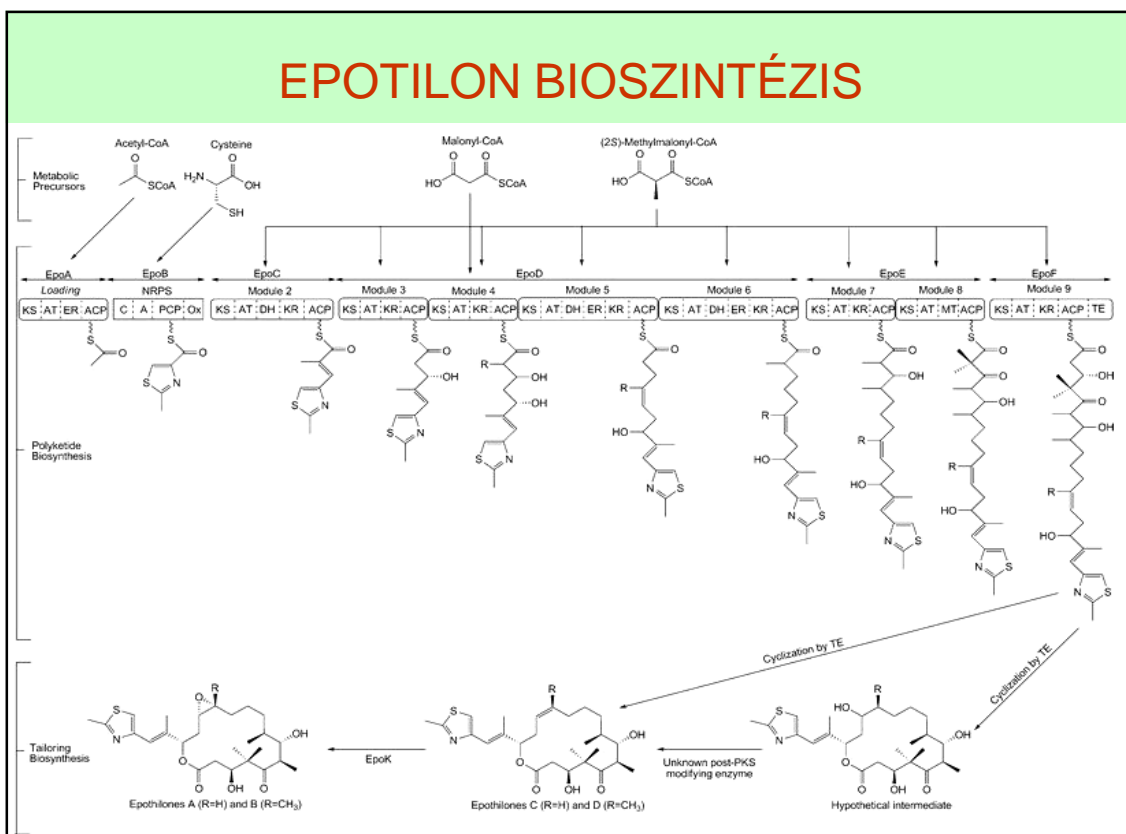
Az epotilonok esetében a 16 C-atomos lánc öt metilmalonil-CoA-ból és három malonil-CoA-ból épül össze. A létrejövő nyolc ketocsoportból kettő egyáltalán nem redukálódik, háromból –OH csoport lesz, egy esetben áll meg a folyamat kettős kötésnél, és csak két esetben jut el a telített szénláncig →

A poliketid bioszintézis nem egyedülálló, sok más szekunder metabolit is e lépések kombinációjával jön létre (tetraciklinek, eritromicin, rifamicin, stb).



## EPOTILON BIOSZINTÉZIS





## EPOTILONok

Az *in vivo* kísérletek (egér, klinikai) eredményei nem olyan jók, mint a sejtvonalakkal mértek.

Prostata tumor esetében jó eredmények.

Nagyon kicsi a terápiás index (káros dózis/hatásos dózis), problémás az adagolás.

Több származékot állítottak elő és vizsgálnak, ezek közül néhány a klinikai II és III fázisban van.

Jó helyettesítője/kiegészítője a taxolnak, de még dolgozni kell rajta.

