



Uniwersytet Jagielloński
WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
Gronostajowa 7, 30-387 Kraków

Prof. dr hab. Adam Dubin

Kraków, 20 sierpień 2016 r.
Fax: (+12) 664-6915
e-mail: adam.dubin@uj.edu.pl
tel.: +507 006 557

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Marcina Skoreńskiego

Tytuł rozprawy:

Synteza estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów wirusowych proteaz serynowym

Wprowadzenie i stan wiedzy

Infekcje wirusowe zaraz po chorobach serca oraz chorobach nowotworowych stanowią istotny odsetek przyczyn śmierci. Szacuje się, że obecnie na świecie zakażonych jedynie wirusem HCV (ang. *Hepatitis C virus*) jest ponad 170 milionów osób, a co roku przybywa ok. 4 miliony zakażeń. Ponieważ terapia wirusowego zapalenia wątroby typu C z zastosowaniem kombinacji leku o szerokim spektrum działania np. rybowiryny oraz pegylowanych interferonów alfa jest skuteczna jedynie u połowy pacjentów celem jest poszukiwanie efektywnych i bardziej specyficznie działających leków takich jak na przykład inhibitory NTPazy/helikazy, kinazy kazeinowej CK2 czy proteazy serynowej AS3/4A - enzymów zaangażowanych w replikację wirusa. Przedstawiona do recenzji rozprawa Pana mgr inż. Marcina Skoreńskiego zatytułowana: „Synteza estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów wirusowych proteaz serynowym” wpisuje się więc dobrze w zapotrzebowanie. Przeprowadzone badania są podbudowane wcześniej opublikowanym już dorobkiem doktoranta a w szczególności opracowaną wydajną metodą syntezy estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych [*Tetrahedron Letters* (54,2013,1566)] oraz zainteresowaniami i dotychczasowym dorobkiem promotora prof. dr hab. Józefa Oleksyszyna. Estrы diarylowe kwasów 1-alkilofosfonowych i ich peptydowe pochodne są znanymi od wielu lat pseudonieodwracalnymi, specyficznymi i selektywnymi inhibitorami

serynowych proteaz (*Oleksyszyn i Powers, B.B.Res.Comm. 161(1989)142-149, Biochemistry 30(1991)485-93*) a ich nieodwracalny charakter doskonale wpisuje się w projektowanie potencjalnie skutecznych leków także o możliwym zastosowaniu w terapii infekcji wirusowych. Dodatkowym atutem podjęcia tego typu badań jest fakt, że żaden z wcześniej opracowanych inhibitorów proteazy serynowej NS3/4A wirusa zapalenia wątroby typu C: boceprevir, telaprevir, simeprevir, viniprevir, gazoprevir nie działa w sposób nieodwracalny a ich zastosowanie kliniczne sprzyjało występowaniu zmutowanych szczepów o wysokiej lekooporności.

Ogólna charakterystyka pracy

Oceniany doktorat to 196 stronicowe opracowanie napisane po polsku i posiadające tradycyjny układ tekstu, zilustrowane 46 rysunkami, 21 tabelami oraz charakterystyką i wzorami 213 zsyntetyzowanych związków i udokumentowane 148 pozycjami cytowanej literatury, z których ponad połowę opublikowano po roku 2005.

Krótki, 35 stronicowy wstęp rozpoczyna się od schematycznego przedstawienia statystyki występowania zakażenia wirusem wątroby typu C (HCV) a następnie przybliży czytelnikowi charakterystykę wirusowych proteaz serynowych HCV, wirusa Zachodniego Nilu (WNV) oraz wirusów rodziny *Herpesviridae* i ich dotychczas poznanych inhibitorów.

Pomimo, że tą część pracy czyta się bardzo dobrze ponieważ jest nie tylko szczegółowo przemyślana ale i przystępnie napisana poprawnym językiem to mam jednak kilka następujących drobnych uwag:

- szkoda, że autor nie rozwinął nieco tematu poprzez choćby ogólne omówienie strategii dotychczas stosowanych terapii antywirusowych, poszukiwań efektywnych inhibitorów innych enzymów wirusowych takich jak choćby inhibitorów replikacji wirusa HCV (np. NTPazy/helikazy czy kinazy kazeinowej CK2),
- na str. 12 cytowana za podręcznikiem biochemii maksymalna wartość przyspieszenia reakcji enzymatycznej 2×10^{11} wydaje się wyraźnie zaniżona bo na przykład dla ureazy wynosi ona wg. Garreta i Grishama 1×10^{14} ,
- na str. 15 wypadało zacytować historyczne już ale bardzo znaczące prace prof. Mariusza Jaskólskiego z Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza oraz Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu i dr Alexandera Włodawera z Narodowego Instytutu Raka w USA, którzy blisko 30 lat temu ustalili pierwszą strukturę przestrzenną białka retrowirusa HIV (Nature

337,1989,576; *Science* 243,1989,928 i *Science* 245,1989,616) i dzięki temu kilka lat później wprowadzono pierwszy racjonalnie zaprojektowany lek antywirusowy,

- na str. 17 w miejsce „wejście cząstki wirusa” bardziej poprawne wydaje się użycie określenia „wniknięcie na drodze endocytozy”,
- niefortunne jest zastosowanie na str. 23 określenia „aparat katalityczny enzymu” w miejsce centrum aktywnego enzymu,
- zastosowane w tekście na str. 25 oznaczenia liczbowe inhibitorów proteazy NS3/4A dopuszczonych do użytku w terapii HCV (grazoprevir(9) i paritaprevir (10) pokrywają się z numeracją inhibitorów będących w drugiej fazie klinicznej (asunaprevir (9) i aovaprevir (10).

Cel pracy oraz uzyskane wyniki

Zasadniczym celem pracy było zaprojektowanie, synteza i uzyskanie specyficznych, selektywnych i pseudonieodwracalnych fosfonowych inhibitorów wirusowych proteaz serynowych. Autor skupił się na badaniu estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów proteazy NS3/4A wirusa zapalenia wątroby typu C oraz jego mutantów. Dodatkowo przebadano hamowanie aktywności proteazy NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu oraz proteazy istotnej w cyklu życiowym wirusów rodziny *Herpesviridae*.

Cel badań jest dobrze dobrany z uwagi na zapotrzebowanie i na dotychczasowe nieliczne próby podjęte w tym kierunku. Dodatkowym atutem możliwości praktycznego wykorzystania tego typu związków w rozwoju leku jest fakt, że chodzi o inhibitory pseudonieodwracalne i wysoce selektywne i specyficzne na które jest zapotrzebowanie kliniczne.

Innowacyjność i aplikacyjność jest w ostatnich dziesięcioleciach priorytetem polityki badań naukowych. Cele badawcze oraz przeprowadzone badania wpisują się więc bardzo dobrze w ten trend.

Obowiązkiem recenzenta jest zwrócenie uwagi na nieprecyzyjne stwierdzenia użyte na str. 39 sugerujące cytuję, że proteaza NS2/4A jest „ekspresjonowana przez ludzki wirus zapalenia wątroby typu C” oraz podobne określenie użyte dla proteazy wirusów rodziny *Herperviridae*. Oczywiście nie można mówić w tym wypadku o ekspresji enzymu przez wirusy a jedynie o przekazywanie informacji genetycznej kodującej sekwencje proteinaz, a wirus choć specyficzny gatunkowo nie jest ludzki a jedynie wywołuje zapalenie wątroby typu C u naczelných.

Rozdział III zatytułowany *Badania własne* podzielony został na trzy podrozdziały opisujące odpowiednio projektowanie, syntezę i własności:

- fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych i ich peptydowych pochodnych oraz określanie ich biologicznej aktywności jako inhibitorów typowych serynowych enzymów proteolitycznych oraz proteiny NS3/4A wirusa zapalenia wątroby typu C,
 - fosfonowych analogów argininy i lizyny jako inhibitorów proteazy NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu
- oraz
- peptydowych pochodnych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów proteazy rodziny *Herpesviridae*.

Każdy podrozdział zakończony jest krótkim podsumowaniem i wnioskami końcowymi. Ta część pracy jest wyczerpująco opisana poprawnym zrozumiałym językiem. Całość rozdziału 3 zakończona jest dodatkowym krótką dyskusją uzyskanych wyników.

Opracowano syntezę oraz przeprowadzono charakterystykę ponad 213 związków w tym:

- fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkanofosfonowych,
- dipeptydu Boc-Val-Pro-OH, fosfonowych dipeptydów oraz fosfonowanego analogu lizyny oraz argininy,
- tripeptydowych pochodnych fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych,
- estrów diarylowych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych.

Przebadano pod kątem aktywności inhibitorowej względem proteazy NS3/4A wirusa HCV co najmniej 61 związków, oraz względem proteazy NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu co najmniej 20 związków.

Ta część pracy jest też bardzo klarowna, dobrze udokumentowana i wzorowo opracowana. Cała robiąca dobre wrażenie rozprawa doktorska jest zakończona krótkim, jednostronicowym podsumowaniem.

W twojej części rozprawy zauważyłem kilkanaście drobnych błędów natury redakcyjnej z których chciałbym jedynie wypunktować trzy istotniejsze w celu uniknięcia ich powielania:

- w tabeli 7 omyłkowo oznaczono inhibitory klasy I jako II,
- na str. 58 podano omyłkowo tabelę 7 zamiast 8,
- na str. 93 zamiast związku o numerze 188 powinien być 189.

Główną część rozprawy stanowi 84 stronicowy rozdział V – „Część eksperymentalna” charakteryzujący szczegółowo etapy syntezy produktów pośrednich i końcowych oraz zawierający krótki opis zastosowanej procedury. Podano wyczerpującą charakterystykę otrzymanych związków poprzez zamieszczenie informacji o wydajności procesów syntezy,

temperatury topnienia uzyskanych związków i ich parametry pomiarów MS i NMR. Dodatkowo opisano przeprowadzone na substratach syntetycznych testy enzymatyczne oraz pomiary stabilności kompleksu proteaza NS3/4A z inhibitorem 132R oraz rozpuszczalności w płynach fizjologicznych.

Dane zebrane w tabelach 5-11 oraz 13-16 charakteryzują poprzez podane wartości stałych inhibicji oraz stosunku stałej szybkości asocjacji do stałej inhibicji wydajność przebadanych inhibitorów. Najaktywniejszym inhibitorem genotypu 1a proteazy NS3/4A HSV otrzymanym poprzez zaawansowane badanie zależności struktura-aktywność, wykazujący się też wysoką selektywnością względem przebadanych serynowych proteaz ludzkich neutrofilii, okazał się inhibitor 132R zawierający w swej strukturze dimetylocyklopropyloprolinę o $K_i = 44 \text{ nM}$ i $k_2/K_i = 79\,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Z fosfonowych analogów lizyny oraz argininy najaktywniejsza względem enzymu NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu była pochodna 189 o $K_i = 500 \text{ nM}$ i $k_2/K_i = 21\,000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Podczas realizacji planowanych celów opracowano też dwie nowe metody syntezy fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych o zwiększonej w porównaniu do estrów aromatycznych rozpuszczalności oraz metodę syntezy peptydowych pochodnych tych estrów.

Lektura rozprawy doktorskiej nasuwa oczywiście pytania. Być może uda się przedyskutować podczas obrony chociaż jedno z nich podane poniżej.

Czy rozpuszczalność i stabilność uzyskanych w pracy wydajnych i selektywnych inhibitorów serynowych proteinaz wirusowych pozwana sugerować ich ewentualne użycie terapeutyczne i czy prowadzono wstępne próby toksyczności na liniach komórkowych?

Ogólne odczucie

Praca jest napisana przejrzyście i właściwie nie mam zasadniczych uwag krytycznych co do strony merytorycznej jak i redakcyjnej. Z sześciu dotychczas opublikowanych prac doktoranta o sumarycznym współczynniku przebiccia ok. 13, cztery z Jego pierwszym autorstwem wiążą się z tematyką będącą zagadnieniem przedstawionej rozprawy doktorskiej. Opracowany wydajny sposób syntezy, wytwarzania i zastosowania peptydowych pochodnych difenylowych estrów kwasów 1-amino-alkanofosfonowych został zabezpieczony patentem podobnie jak przeciwwirusowe preparat farmaceutyczny w zastosowaniu do wirusowego

zapalenia wątroby typu C. Dodatkowo trzy inne zgłoszenia patentowe dotyczą fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkanofosfonowych, difenylowych fosfonowych analogów kwasu glutaminowego i ich peptydowych pochodnych oraz fosfonowych analogów lizyny i argininy w zastosowaniu do hamowania aktywności proteolitycznej proteazy NF2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu a cztery inne testom diagnostycznym detekcji białek Map i Efb. To wszystko daje świadectwo, że praca poddana skrupulatnemu oglądowi recenzentów obroniła się już sama. Niewątpliwym osiągnięciem jest uzyskanie:

- inhibitora 132R o okresie półtrwania niezwykle stabilnego kompleksu z proteazą wirusową NS3/4A pomiędzy 60-80 godzin podczas gdy dla komercyjnych leków bocepreviru i telapreviru wynoszą one odpowiednio 4 i 23,
- fosfonowego analogu lizyny oraz argininy z grupa guanidynofenyloalaniny w pozycji para (związek 189) o niezwykle trwałym kompleksie z proteazą NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu,

Należy zaznaczyć, że podczas realizacji pracy opracowano też dwie nowe, wydajne metody syntezy fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych oraz ich peptydowych pochodnych.

Podsumowanie oceny

Rozprawę doktorską Pana mgr inż. Marcina Skoreńskiego oceniam wysoko tak pod względem merytorycznym jak i redakcyjnym. Praca opisuje cały szereg rzetelnych i solidnie wykonanych eksperymentów i świadczy o dojrzałości doktoranta a prezentowane wyniki mają charakter nowatorski i poznawczy.

Stwierdzam, że przedłożona rozprawa spełnia wszystkie warunki przewidziane art.13 ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (o zmianie ustawy – Prawo o szkolnictwie wyższym) oraz tradycją dla prac doktorskich i wnioskuję do Wysokiej Rady Wydziału Chemicznego Politechniki Wrocławskiej o dopuszczenie Pana mgr inż. Marcina Skoreńskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

W moim odczuciu przedstawiona rozprawa doktorska jest zdecydowanie ponad przeciętna i jako taka zasługuje na wyróżnienie. Dlatego z pełnym przekonaniem zwracam się z takim wnioskiem do Wysokiej Rady Wydziału.

Prof. dr hab. Adam Dubin