

## Streszczenia pracy doktorskiej

Marcin Skoreński

„Synteza estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako inhibitorów wirusowych proteaz serynowych”

Realizacja pracy doktorskiej obejmowała syntezę inhibitorów trzech wirusowych proteaz serynowych: NS3/4A, ekspresjonowanej przez wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), NS2B/NS3 ekspresjonowanej przez wirus Zachodniego Nilu (WNV) oraz proteaza ekspresjonowana przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*.

Przeprowadzenie intensywnych badań na podstawie zależności struktura- aktywność (SAR) fosfonowych inhibitorów proteazy NS3/4A doprowadziło do identyfikacji wysoce aktywnych pochodnych wykazujących silne właściwości inhibitorowe względem wirusowej proteazy, dodatkowo wykazujących wysoką selektywność względem ludzkich enzymów proteolitycznych. Najaktywniejszym inhibitorem otrzymanym w trakcie realizacji pracy była pochodna, która wykazywała wartości stałych inhibicji  $K_i = 44 \text{ nM}$  i  $k_2/K_i = 79\,850 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  wobec genotypu 1a oraz  $K_i = 65 \text{ nM}$  i  $k_2/K_i = 60\,850 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  wobec genotypu 1b proteazy NS3/4A. Związek ten tworzy niezwykle stabilny kowalencyjny kompleks z wirusową proteazą.

Badanie aktywności fosfonowych analogów lizyny oraz arginy pozwoliło na zidentyfikowanie, wysoce aktywnych, nieodwracalnych inhibitorów proteazy z WNV- NS2B/NS3. Najaktywniejsza pochodna,  $\text{Cbz-(4-GuPhe)}^P(\text{OPh})_2$ , wykazywała  $K_i = 18 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $k_2/K_i = 114 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Rozbudowanie inhibitora o fragment peptydowy skutkowało poprawieniem aktywności, wyrażający się w 185-krotnym wzroście wartości  $k_2/K_i$  oraz 36-krotnym spadkiem wartości  $K_i$  ( $\text{Cbz-Lys-Arg-(4-GuPhe)}^P(\text{OPh})_2$ ,  $K_i = 0,5 \text{ }\mu\text{M}$ ,  $k_2/K_i = 21\,110 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ).

Prace nad inhibitorami proteazy ekspresjonowanej przez wirusy z rodziny *Herpesviridae* były utrudnione ze względu na fakt niedostępności wirusowego enzymu. Dlatego, otrzymane pochodne postanowiono przebadać pod kątem zdolności inhibicji replikacji wirusa w testach komórkowych. Badania te zostały wykonane w Zespole dr. hab. Krzysztofa Pyrcia oraz podczas stażu na Uniwersytecie w Padwie pod opieką prof. Davide Abate. Przetestowane pochodne wykazywały umiarkowaną aktywność w testach komórkowych. Najbardziej aktywny inhibitor wykazywał  $\text{EC}_{50} = 175 \pm 22 \text{ }\mu\text{M}$ .

Dodatkowo podczas realizacji pracy opracowano dwie nowe, wygodne oraz wydajne metody syntezy fluoroalkilowych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, które stanowią nową grupę nieodwracalnych inhibitorów proteaz serynowych. Związki te wykazywały zwiększoną rozpuszczalność w porównaniu do odpowiadających im estrów aromatycznych kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, jednak kosztem zmniejszonej aktywności inhibitorowej wobec proteaz serynowych.

Kolejnym aspektem pracy było opracowanie nowej metody syntezy peptydowych pochodnych estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych. Metoda opierającą się na zastosowaniu peptydowych amidów w reakcji amidoalkilowania stanowi alternatywną metodę dla znanych obecnie metod syntezy. Szczególnie korzystne wydaje się zastosowanie jej w syntezie pochodnych zawierających w swej strukturze długi łańcuch peptydowy.

*„Synthesis of 1-aminoalkylphosphonate esters as inhibitors of viral serine proteases”*

The dissertation described synthesis of inhibitors of three viral serine proteases: NS3 / 4A expressed by hepatitis C virus (HCV), NS2B / NS3 expressed by West Nile virus (WNV) and the proteases expressed by the Herpesviridae viruses.

Intensive structure-activity relationships (SAR) studies of phosphonic inhibitors of NS3/4A protease has led to the identification of highly active derivatives having potent inhibitory effects of the viral protease. The most active inhibitor obtained in the course of the study was derived which showed inhibition constants of  $K_i=44$  nM and  $k_2/K_i = 79\ 850\ M^{-1}s^{-1}$  against genotype 1a and  $K_i = 65$  nM and  $k_2/K_i = 60\ 850\ M^{-1}s^{-1}$  against genotype 1b protease NS3/4A. This compound forms a very stable covalent complex with viral protease.

Phosphonic analogues of lysine and arginine was identified as highly active, irreversible inhibitors of the WNV protease- NS2B/NS3. The most active derivative  $Cbz(4-GuPhe)^P(OPh)_2$ , showed a  $K_i= 18\ \mu M$ ,  $k_2/K_i = 114\ M^{-1}s^{-1}$ . Inhibitor with extended peptide fragment exhibited improved activity, in 185- fold increase in the value of  $k_2 / K_i$  and a 36-fold decrease in  $K_i$  values ( $Cbz-Arg-Lys-(4-GuPhe)^P(OPh)_2$ ,  $K_i=0.5\ \mu M$ ,  $k_2/K_i= 21110\ M^{-1}s^{-1}$ ).

Work on inhibitors of protease expressed by Herpesviridae viruses were difficult due to the unavailability of viral enzyme. Therefore, the obtained derivatives were tested for their ability of inhibiting viral replication in a cell-based assay. These studies were performed by the Ph.D. Krzysztof Pyrc team and during an internship at the University of Padua under the supervision of prof. Davide Abate. Tested derivatives showed moderate activity in cell-based assays. The most active inhibitor showed  $EC_{50} = 175 \pm 22\ \mu M$ .

Additionally, two new, convenient and efficient methods of synthesis of fluoroalkyl esters of, were developed. This group of compounds are new group of irreversible serine protease inhibitors with increased solubility compared to the corresponding aromatic ester of 1- aminoalkylphosphonates

Another aspect of this work is developing of a new synthesis method of peptide derivatives of of 1-aminoalkylphosphonate esters.