

Chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowa z podstawnikiem dansylowym oraz jej zastosowanie

Przedmiotem wynalazku jest chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowa z podstawnikiem dansylowym oraz jej zastosowanie do leczenia i profilaktyki opryszczki typu 1, poprzez hamowanie replikacji wirusa HSV-1.

Wirus opryszczki typu 1 (herpes simplex virus 1, HSV-1) to otoczkowy, neurotropowy wirus posiadający materiał genetyczny w formie dwuniciowego DNA. Jest to jeden z najszerzej rozpowszechnionych patogenów ludzkich, szacuje się, że jego nosicielami może być nawet 90% populacji (Fatahzadeh M., Schwartz R.A., *J Am Acad Dermatol.* 2007, 57, 737-763). Zazwyczaj HSV-1 wywołuje infekcje w obrębie śluzówki jamy ustnej, rzadziej bywa również powiązany z zakażeniami w rejonie narządów płciowych. Infekcja łatwo przenosi się poprzez kontakt bezpośredni, np. całowanie czy stosunek seksualny. Objawy zakażenia są zwykle łagodne i ograniczają się do wypełnionych płynem pęcherzyków i owrzodzeń (tzw. „zimno”). HSV-1 bywa jednak również przyczyną schorzeń znacznie poważniejszych - wirusowe zapalenie rogówki może prowadzić do ślepoty, zaś wirusowe zapalenie mózgu nawet do śmierci (Farooq A.V., Shukla D., *Surv Ophthalmol.* 2012, 57, 448-462; Tyler K.L., *Herpes* 2004, 11, Suppl. 2:57A-64A; Whitley R.J., *Antiviral Res.* 2006, 71, 141-148).

Infekcja zaczyna się w komórkach nabłonkowych, skąd wirus przemieszcza się do jądra neuronu rdzeniowego wykorzystując transport retrogradowy. We wnętrzu neuronu wirus przechodzi w stan utajony (latentny); infekcja taka jest bezobjawowa, ale utrzymuje się do końca życia pacjenta. Wirus może ulec reaktywacji, która może być samoistna lub występować w odpowiedzi na czynniki stresowe, takie jak gorączka, menstruacja, czy światło słoneczne; stan układu odpornościowego pacjenta decyduje o częstotliwości nawrotów (Arvin A.M., *Human herpesviruses biology, therapy, and immunoprophylaxis*, New York: Cambridge University Press 2007). Zdolność do przechodzenia w stan latencji jest najbardziej charakterystyczną cechą rodziny *Herpesviridae* (Wilson A.C., Mohr I., *Trends Microbiol.* 2012, 20, 604-611)

Aktualnie stosowane terapie przeciw infekcjom herpeswirusowym bazują na stosowaniu analogów nukleozydów - acyklowiru oraz jego pochodnych. Działanie tych związków opiera się na zakłócaniu procesu syntezy wirusowego DNA, w konsekwencji czego nie powstają nowe, zakaźne wiriony, a rozprzestrzenianie infekcji zostaje powstrzymane. Podstawową wadą leków tego typu jest ich niska biodostępność, choć

nowocześniejsze pochodne acyklowiru, jak gancyklowir czy walacyklowir częściowo rozwiązują ten problem (Mubareka S., Leung V., Aoki F.Y., Vinh D.C., *Expert Opin Drug Safety* 2010, 9, 643-658). Do leczenia szczepów opornych na analogi nukleozydów stosowany jest foscarnet, wykorzystujący inny mechanizm hamowania aktywności wirusowej polimerazy DNA, jednak zaobserwowano już pojawianie się szczepów wirusa opryszczki opornych również wobec tego inhibitora (Blot N., Schneider P., Young P., Janvresse C., Dehesdin D., Tron P., Vannier J.P., *Bone Marrow Transplant.* 2000, 26, 903-905).

Coraz częstszym celem dla nowych związków przeciwwirusowych na przestrzeni ostatnich 20 lat stają się proteazy wirusowe. Znalazły one już zastosowanie kliniczne przede wszystkim jako jedna z głównych składowych skojarzonej terapii antyretrowirusowej (HAART) (Hughes P.J., Cretton-Scott E., Teague A., Wensel T.M., *P&T* 2011, 36, 332-345). Mniej znanym, lecz również istotnym przykładem zastosowania inhibitorów proteaz wirusowych w klinice są inhibitory proteazy NS3/NS4a wirusa zapalenia wątroby typu C (McCauley J.A., Rudd M.T., *Curr Opin Pharmacol.* 2016, 30, 84-92). Związki o podobnym mechanizmie działania opracowano także dla ludzkiego rinowirusa oraz koronawirusa SARS (Patick A.K., Brothers M.A., Maldonado F., Binford S., Maldonado O., Fuhrman S., Petersen A., Smith G.J., Zalman L.S., Burns-Naas L.A., Tran J.Q., *Antimicrob Agents Chemother.* 2005, 49, 2267-2275; Yang S., Chen S.J., Hsu M.F., Wu J.D., Tseng C.T., Liu Y.F., Chen H.C., Kuo C.W., Wu C.S., Chang L.W., *J Med Chem.* 2006, 49, 4971-4980). Próby opracowania tego typu inhibitorów podjęto również dla wirusów z rodziny *Herpesviridae*, lecz nigdy nie przeprowadzono dla nich badań klinicznych (Shimba N., Nomura A.M., Marnett A.B., Craik C.S., *J Virol.* 2004, 78- 6657-6665; Tong L., Qian C., Massariol M.J., Déziel R., Yoakim C., Lagacé L., *Nat Struct Biol.* 1998, 5, 819-826).

Proteaza VP24 wirusa HSV-1 jest produktem ORF UL26. Gen ten jest rzadkim wśród wirusów przypadkiem nakładania się jednostek transkrypcyjnych – mniejsza jednostka UL26.5 jest w całości zawarta wewnątrz większej jednostki UL26 (Liu F.Y., Roizman B., *J Virol.* 1991, 65, 5149-5156; Liu F.Y., Roizman B., *J Virol.* 1991, 65, 206-212). Powstająca poliproteina jest następnie cięta w miejscu R (pomiędzy 247 a 248 aminokwasem), oraz miejscu M (pomiędzy 610 a 611 aminokwasem) (DiIanni C.L., Drier D.A., Deckman I.C., McCann P.J., Liu F., Roizman B., Colonno R.J., Cordingley M.G., *J Biol Chem.* 1993, 268, 2048-2051). W wyniku pierwszego cięcia powstaje serynowa

proteaza VP24, zaś drugie generuje główne białko rusztowania kapsydu wirusowego VP21.

Owo rusztowanie jest niezbędne na początkowym etapie formowania kapsydu wirusowego. Na dalszych etapach rusztowanie jest usuwane, co umożliwia pakowanie do wnętrza materiału genetycznego wirusa (Knipe D.M., Howley P.M., *Fields Virology*, 6 wyd. Philadelphia, PA: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health; 2013). Jeśli rusztowanie nie zostanie usunięte dojrzewanie kapsydów nie zachodzi, a nowe, zakaźne wiriony nie są produkowane. Udowodniono, że wirus pozbawiony genu proteazy VP24 nie jest zdolny do replikacji (Gao M., Matusick-Kumar L., Hurlburt W., DiTusa S.F., Newcomb W.W., Brown J.C., McCann P.J., Deckman I., Colonna R.J., *J Virol.* 1994, 68, 3702-3712).

W chwili obecnej brak jest doniesień o skutecznych inhibitorach proteazy VP24 wirusa opryszczki. Inhibitory takie opracowano dla proteazy wirusa mięsaka Kaposiego, jednak ich skuteczność stwierdzono tylko w testach biochemicznych, nie sprawdzono natomiast ich wpływu na replikację wirusa (Shimba N., Nomura A.M., Marnett A.B., Craik C.S., *J Virol.* 2004, 78, 6657-6665).

Istotą wynalazku jest chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym o wzorze 1.

Wynalazek dotyczy również chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym o wzorze 1 do zastosowania jako lek, zwłaszcza do leczenia i profilaktyki opryszczki typu 1 poprzez hamowanie replikacji wirusa HSV-1.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest bliżej w przykładach wykonania oraz na rysunku, na którym na:

fig. 1 przedstawiono schemat otrzymywania chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym o wzorze 1,

fig. 2 przedstawiono strukturę rentgenograficzną chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym,

fig. 3 przedstawiono cytotoksyczność chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym. Żywotność komórek została przedstawiona jako % wartości próbki kontrolnej, nie traktowanej inhibitorem,

fig. 4 przedstawiono przeciwwirusową aktywność chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym. Ilość DNA wirusowego w pożywce została wyznaczona metodą real-time PCR,

fig. 5 przedstawiono aktywność przeciwwirusową chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym. Ilość DNA wirusowego w pożywce została wyznaczona metodą real-time PCR (A), natomiast liczbę funkcjonalnych cząstek wirusa wyznaczono metodą testu lysinkowego (B),

fig. 6 przedstawiono mechanizm aktywności przeciwwirusowej chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym. Seria testów funkcjonalnych polegających na dodawaniu inhibitora na różnych etapach infekcji wirusowej pozwala określić, na jakim etapie następuje hamowanie. Aktywność przeciwwirusową przedstawiono jako liczbę kopii DNA wirusowego w mililitrze pożywki (A) oraz liczbę jednostek tworzących lysinkę w mililitrze pożywki (B),

fig. 7 przedstawiono wpływ chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym na rozprzestrzenianie się infekcji HSV-1. Komórki wyznakowano na obecność wirusa (zielony), f-aktyny (czerwony) oraz DNA (niebieski).

Aktywność chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym o wzorze 1 przebadano pod kątem ich zdolności do hamowania proteazy VP24 ekspresjonowanej przez wirusa HSV-1 *in vitro* oraz pod kątem hamowania replikacji wirusa HSV-1 w testach komórkowych.

Przykład 1. Otrzymywanie chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym.

Aminę *egzo*-2-azabicykloalkanową (0,54 mmol) rozpuszcza się w suchym dichlorometanie (20 ml). Następnie dodawany jest chlorek dansylowy (0,54 mmol) oraz wodorotlenek potasu (80% nadmiar molowy, 0,97 mmol). Całość miesza się w temperaturze pokojowej przez 24 godziny. Mieszaninę reakcyjną poddaje się trzykrotnej ekstrakcji w układzie H₂O:CH₂Cl₂. Połączone frakcje organiczne suszy się bezwodnym siarczanem sodu. Po usunięciu środka suszącego rozpuszczalnik organiczny usuwa się pod zmniejszonym ciśnieniem. Otrzymany surowy produkt oczyszcza się wykorzystując technikę chromatografii kolumnowej stosując jako złożo żel krzemionkowy, natomiast jako eluent stosuje się chloroform z 5% dodatkiem metanolu (v/v). Otrzymuje się produkt o Wzorze 1 w postaci żółtego ciała stałego z wydajnością 49%, Temperatura topnienia 61-63 °C. $[\alpha]_D^{20} = +30.2$ (*c* 0,6; CH₂Cl₂). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1.10 (m, 4H); 1.22-1.27 (m, 4H); 1.41 (s, 1H); 2.09 (m, 2H); 2.23 (m, 1H); 2.86 (s, 10H); 3.64 (q, 1H, *J* = 3.0 Hz); 7.07-7.17 (m, 8H); 7.39-7.50 (m; 3H); 8.14-8.16 (m, 1H); 8.22-8.24 (m, 1H); 8.45-8.47 (m, 1H). ¹³C

NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 20.2, 27.1, 27.9, 39.8, 41.6, 45.5, 48.8, 53.0, 62.3, 63.2, 115.2, 118.8, 127.3-130.2, 134.9, 135.9, 144.2, 145.0, 186.0. FT-IR: 635, 789, 1144, 1162, 1316, 1453, 1575, 1613, 2787, 2934, 3309, 3393 cm⁻¹; HRMS (ESI- TOF) m/z: [M+H]⁺ 464.2375; obliczone dla [C₂₇H₃₃N₃O₂S]⁺: 464.2366. Analiza rentgenograficzna produktu przedstawiona została na fig. 2.

Przykład 2. Określenie aktywności chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym wobec proteazy VP24 wirusa HSV-1.

Celem określenia aktywności chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym przeprowadzono pomiar aktywności enzymatycznej proteazy VP24 wirusa HSV-1 przy użyciu techniki HPLC. W tym celu przygotowano rekombinowaną proteazę VP24 wirusa HSV-1 o stężeniu 50 µg/ml w buforze Tris (500 mM NaCl, 50 mM Tris, 2 mM imidazol, 5% glicerol, pH 7,5) które inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej w obecności chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym w stężeniu 100 µM w DMSO. Próbką kontrolną inkubowana była tylko z DMSO. Po tym czasie do próbek dodano substrat proteazy VP24 wirusa HSV-1 (o sekwencji HTYLQASEKFKMW-NH₂) w stężeniu 100 µM w DMSO i przeprowadzono analizę HPLC mieszaniny. Pomiar powtarzano w równych odstępach czasowych. Procent inhibicji wyznaczono na podstawie pola powierzchni sygnału pochodzącego od powstającego produktu dla próbki analizowanej w obecności chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym względem sygnału pochodzącego od powstającego produktu w próbce kontrolnej. Wartości zostały znormalizowane przez odjęcie wartości dla linii bazowej (Tabela 1).

Tabela 1. Zestawienie wyników hamowania proteazy VP24 wirusa HSV-1 przez chiralnych pochodnych 2-azabicykloalkanowych z podstawnikiem dansylowym.

Inhibitor	Czas	% inhibicji	
		12h	24h
Związek wg wynalazku		21,73	20,02

Przykład 3. Wpływ chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym na żywotność komórek.

Cytotoksyczność związku sprawdzono z wykorzystaniem testu XTT. Analiza została przeprowadzona na linii komórkowej Vero E6 (komórki nabłonka nerki *Cercopithecus aethiops*, ATCC CRL-1586), która jest permissywna dla wirusa HSV-1. Test ten opiera się na badaniu aktywności enzymów mitochondrialnych, poprzez określenie ich zdolności do redukcji substratu do barwnego produktu. Żywotność komórek wyznaczono przez pomiar absorbancji przy 450 nm w stosunku do kontroli, którą stanowiły komórki hodowane w pożywce bez dodatków. Komórki hodowano przez 2 dni w pożywce DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementowanej 3% inaktywowanej termicznie płodowej surowicy cielęcej (FBS) oraz penicyliną i streptomycyną, z dodatkiem badanego związku.

W testowanym zakresie stężeń badany związek nie wykazał znaczącej toksyczności względem komórek.

Przykład 4. Wpływ chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym na replikację wirusa opryszczki typu 1 (HSV-1).

Po ustaleniu stężenia związku nie wpływającego toksycznie na komórki zbadano ich wpływ na replikację wirusa HSV-1. Komórki preinkubowano z inhibitorem o stężeniu 10 µg/ml przez 30 min, a następnie, nadal w obecności inhibitora, zakażano wirusem HSV-1, szczerp 17 o TCID₅₀ (tissue culture infective dose, dawka zakażająca 50% hodowli tkankowej) = 400 na mililitr. Po 2 godzinach usuwano niezwiązane cząstki wirusa przez 3-krotne przemycie roztworem PBS i inkubowano, również w obecności inhibitora, przez kolejne 2 dni. Po tym czasie z pożywki komórkowej izolowano DNA wirusowe i wykorzystywano je jako matrycę w reakcji ilościowej real-time PCR (sekwencje starterów: forward 5'-CAT CAC CGA CCC GGA GAG GGA C-3', reverse 5'-GGG CCA GGC GCT TGT TGG TGT A-3', sonda 5'-FAM CCG CCG AAC TGA GCA GAC ACC CGC GC BHQ1-3'). Zdolność związku do hamowania replikacji HSV-1 wyznaczono jako logarytmiczny spadek liczby kopii DNA wirusowego w mililitrze pożywki.

Testowany związek - chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowa z podstawnikiem dansylowym jako inhibitor proteazy VP24 wykazuje działanie przeciwwirusowe i efektywnie hamuje namnażanie się wirusa HSV-1 ok. 10 000-krotnie (4 log).

Przykład 5. Ustalenie skutecznego stężenia chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym .

Aby ustalić skuteczną dawkę chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym wykonano test jak powyżej z wykorzystaniem różnych stężeń inhibitora w zakresie 0,1 – 100 μ M. Wyniki analizowano metodą PCR w czasie rzeczywistym oraz testu łyśinkowego.

Wartość IC_{50} wyznaczona metodą real-time PCR wynosi $3,947 \pm 1,443 \mu\text{g/ml}$, natomiast metodą testu łyśinkowego $4,346 \pm 0,5612 \mu\text{g/ml}$. Wartość indeksu selektywności wyznaczona metodą real-time PCR wynosi $>25,33$, natomiast wyznaczona metodą testu łyśinkowego >23 .

Przykład 6. Mechanizm aktywności przeciwwirusowej chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym.

Mechanizm aktywności przeciwwirusowej inhibitora zbadano przy pomocy serii testów funkcjonalnych opierających się na zastosowaniu inhibitora na różnych etapach infekcji wirusowej:

- *Test I (test inaktywacji)* – czy chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym oddziałuje bezpośrednio z wirusem, czyniąc go niezdolnym do zakażenia komórek?
- *Test II (test interakcji)* – czy chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym oddziałuje bezpośrednio z komórką, czyniąc ją odporną na zakażenie wirusem?
- *Test III (test adsorpcji)* – czy chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylowym zakłóca interakcję wirusa z jego czynnikiem adhezyjnym na powierzchni komórki, uniemożliwiając przyłączenie się wirusa do komórki?

- *Test IV (test składania, pakowania i uwalniania)* – czy chiralna pochodna 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylovym zakłóca późne etapy infekcji wirusowej (np. składanie, pakowanie, uwalnianie) uniemożliwiając powstanie zakaźnych wirionów potomnych.

Ustalono, że zahamowanie replikacji wirusa zachodzi na późnych etapach infekcji. Niewykluczony jest też drugi mechanizm hamowania zachodzący na etapie adsorpcji wirusa.

Przykład 7. Wpływ chiralnej pochodnej 2-azabicykloalkanowej z podstawnikiem dansylovym na rozprzestrzenianie się infekcji HSV-1.

Komórki inkubowano przez godzinę w obecności 10 000-krotnie rozcieńczonego stocku wirusowego lub kontrolnego lizatu komórkowego (mock). Następnie niezwiązane cząstki wirusa usunięto przez płukanie roztworem PBS, na komórki nałożono pożywkę zawierającą inhibitor w stężeniu 10 μ M lub czystą pożywkę jako kontrolę i inkubowano przez kolejne 16 godzin. Po tym czasie komórki utrwalono i poddano barwieniu immunohistochemicznemu na obecność wirusa (przeciwciała anti-VPS HSV), f-aktyny (faloidyna) oraz DNA (DAPI). Preparaty obrazowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego ZEISS LSM 710. Fig. 7 przedstawia pojedyncze przekroje. Widoczne jest znaczne ograniczenie rozprzestrzeniania infekcji HSV-1 przez inhibitor w postaci pochodnych 2-azabicykloalkanowych z podstawnikiem dansylovym w stosunku do kontroli nie traktowanej inhibitorem.

KZECZNIK PATENTOWY
mgr inż. Katarzyna Pańczyka