

1. A kutatási terület rövid összefoglalása

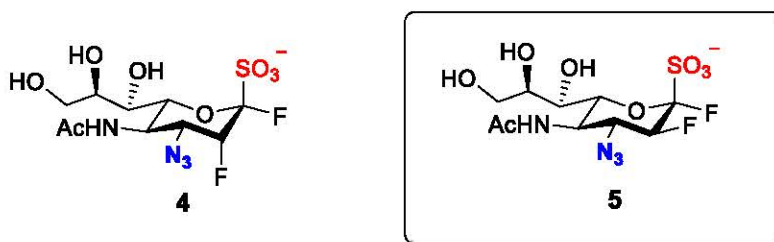
(a kutatás címe, a témaválasztás indoklása, felmerülő kérdések, a projekt társadalmi / tudományos haszna)

Mechanizmus alapú, kovalens hemagglutinin-neuraminidáz inhibitorok fejlesztése humán parainfluenza ellen

A vírusok és a velük kapcsolatba hozható megbetegedések jelentik az egyik legnagyobb veszélyt az emberiség számára. A *Paramyxoviridae* családba tartozó kórokozók komoly orvosi és állatorvosi kockázatot hordoznak, melyek között a humán parainfluenza vírus (*hPIV*) által okozott alsó légúti fertőzések súlyos következményekkel járhatnak csecsemők és kisgyermekes esetében.

Azon megfigyelésen alapulva, hogy egy új-generációs neuraminidáz inhibitor családnak hosszú távú védelmet kell biztosítania és előnyösebb farmakológiai tulajdonságokkal kell rendelkeznie, új szerkezet-alapú tervezésbe kezdtünk a Debreceni Egyetem Gyógyszerészi Kémiai Tanszékén, melyet az USA-beli Komplex Szénhidrátkutató Központtal (CCRC, University of Georgia) szoros együttműködésben végeztünk. A mobilitási projekt megvalósulását a 2020-as tanévre meghirdetett Magyar Állami Eötvös ösztöndíj tette lehetővé.

A **projekt célja** olyan **szialozil-szulfonátok előállítása** volt, melyek nagyobb aktivitással rendelkeznek a az irodalomból már jól ismert BCX2798 ($IC_{50} = 4,8 \mu M$) vegyülethez képest. (**1. Ábra**) A program során sikerrel állítottuk elő a kutatási tervben megjelölt **5** vegyületet és származékait, **melyek stabilizált kovalens addukt létrehozására voltak képesek a kórokozó HN fehérjével**. A projekt komplex, interdiszciplináris jellege miatt a kutatás 6 hónapot vett igénybe, de a teljes biológiai leíráshoz szükséges validálás jelenleg is folyamatban van.



1. Ábra. Tervezett kovalens *hPIV* HN inhibitorok

2. A kutatás menete

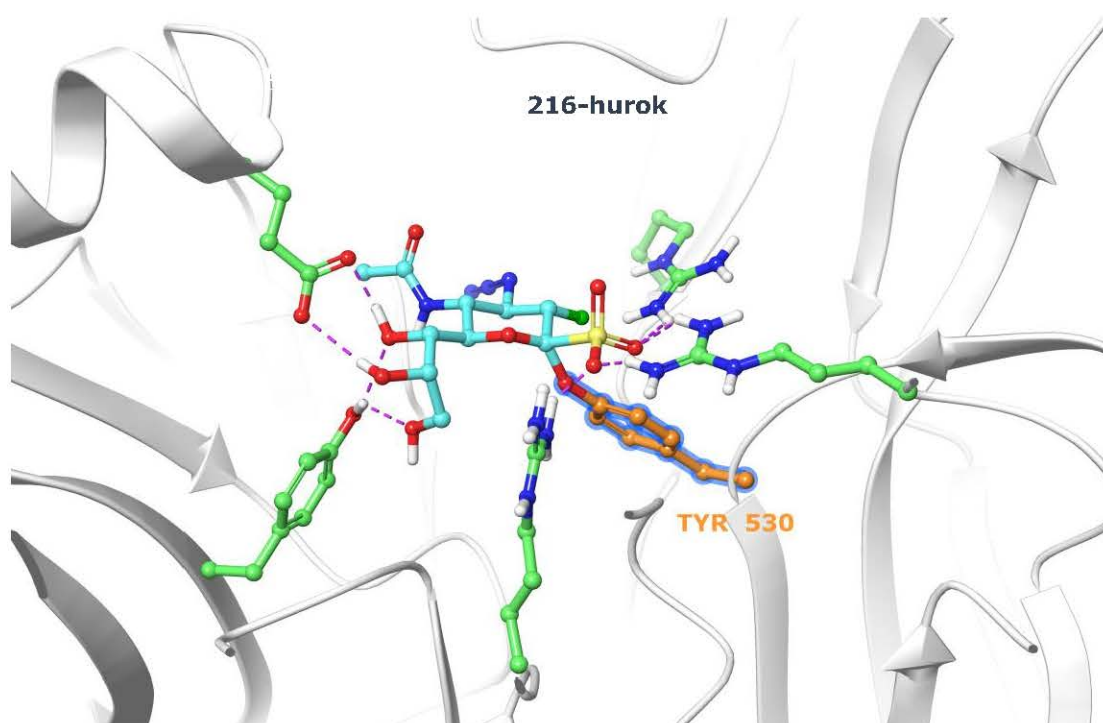
(részfeladatok, időigény, együttműködő partnerek)

a.) Számítógépes molekulamodellelés

(időigény: 1 hónap, együttműködés: Hadházi Ádám, *Robert J. Woods*, *Geert-Jan Boons*)

Kovalens dokkolás:

A **4**-es és **5**-ös ligandumokat a HN receptor aktív centrumához dokkoltuk (Schrödinger: Glide), ahol nukleofil szubsztitúción keresztül, kovalens kötést képez a Tyr530 oldalláncával. (**2. Ábra**) A következő lépésben kialakítottuk a kovalens kötést a reaktív oldallánc és a ligandum között, majd a képződött addukt szerkezetét energia függvényében minimalizáltuk (Schrödinger: Prime) A kapott szerkezetekből ONIOM számításokat indítottunkunk (Gaussian 16).



2. Ábra. Nagy affinitású inhibitorok molekula modellezése:

stabilizált kovalens kötés a hPIV HN Tyr530 oldallánc és egy szulfo-sziálsav molekula (**5**) között

Az ONIOM módszer alkalmazása:

Ebben a folyamatban az energiaminimált kovalens adduktokat két rétegre osztottuk (QM: MM). QM: (a ligandum és a katalitikus aminosavak), MM: (a fennmaradó HN-amino savak)

A számítások (Gaussian 16 és GaussView 6) három szakaszból álltak:

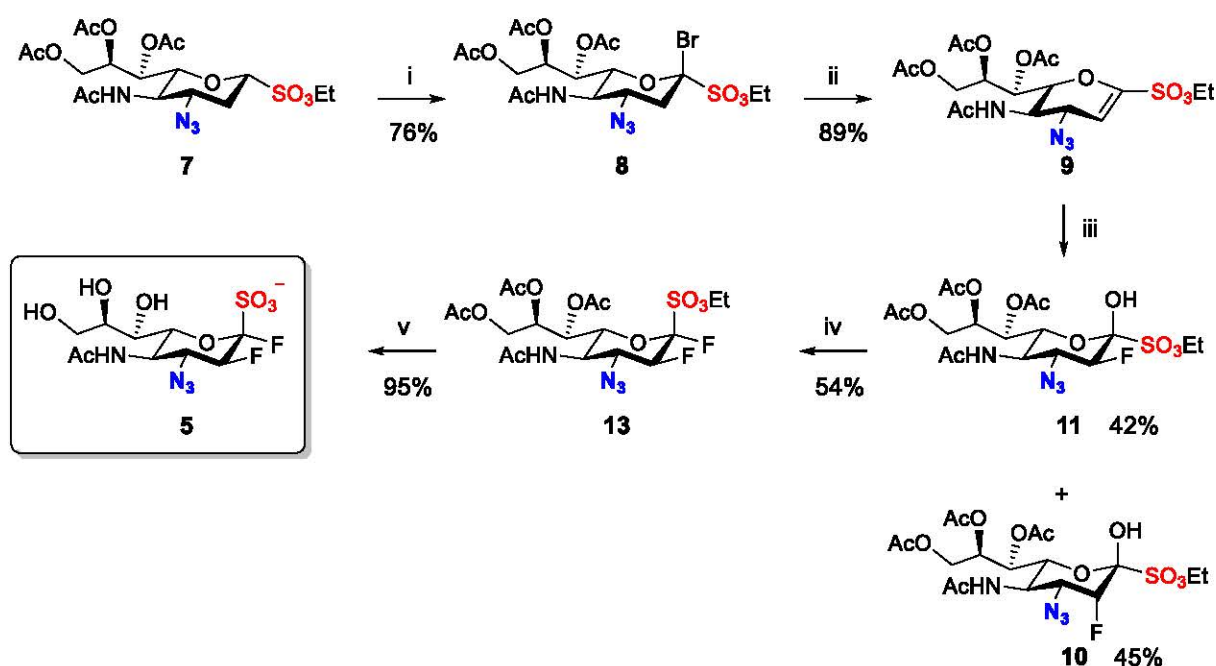
- A kiindulási szerkezeteken geometriai optimalizálást végeztünk.
- IRC (Intrinsic Reaction Coordinate) számításokat futtattunk, TS keresés végett.
- Minden egyes átmeneti állapotra (TS) kiszámítottuk az aktiválási energiát (E_A), végül a legígéretesebb szcaffold-ot választottuk ki a szintézishez. A **4** és **5** epimerek közül az 5-ös

vegyület nagyságrendekkel jobb inhibítornak bizonyult a 2-F funkciós csoport ekvatoriális állása miatt.

b.) Szintetikus szerves kémia – a vegyületek szintézise:

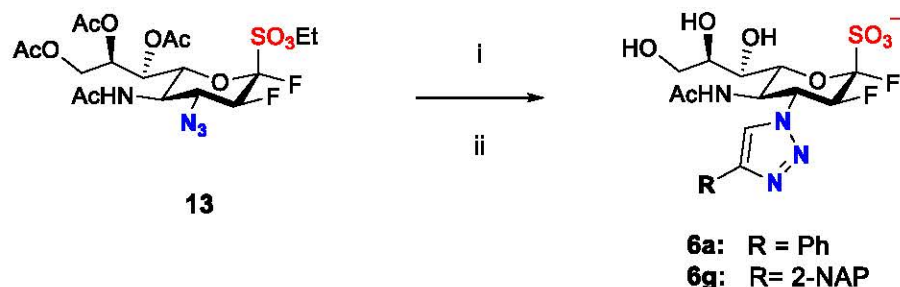
(Időigény: 4 hónap, együttműködés: Hadházi Ádám, *Margaretha Wolfert*, *Geert-Jan Boons*)

A dokkolás és ONIOM számítások alapján, a megfelelő fluoro-szubsztituált szialozil-szulfonátokat az alábbi módon állítottuk elő a feltüntetett hozamokkal (**3. ábra**):



3. Ábra. As **5**-ös vegyület előállítás. i) NBS, DKM, *hν*; ii) DIPEA, DCM; iii) Selectfluor, nitrometán/H₂O (9:1); iv) DAST, DKM, - 40°C to - 10°C; v) NaOH, MeOH/H₂O (1:1), RT, H⁺.

Az aFEP számítások eredményeitől függően, az ígért vezérmolekulát (**13**) azid-alkin cikloaddíciós mechanizmus szerint (Click Chemistry) alakítottuk tovább (**6a-g**) a védőcsoport-hasítás előtt. (**4. Ábra**)



4. Ábra. Szintézisterv az elért aktivitás növelése céljából. Körülmények és reagensek: (i) CuSO₄, nátrium-aszkorbát, MeOH/H₂O (1:1), M.W., 80 °C; (ii) NaOH, MeOH/H₂O (1:1), RT, o/n.

c.) Mikrobiológiai és nagyműszeres (X-ray)validálás

(idő: 2 hónap, együttműködés: Hadházi Ádám, *John Glushka*, *Arunima Singh*, *Geert-Jan Boons*)

A szintetizált 1,2-difluoro származékokat (**5**, **6a**, **6g**) fluoreszcencia-alapú biológiai teszt segítségével validáltuk a hPIV HN neuraminidázgátló hatásuk szempontjából. Alkalmazott szubsztrát: 4-methylumbelliferyl α -D-N-acetylneuraminide (MUN). A vizsgálat rendre az alábbi eredményeket szolgáltatta:

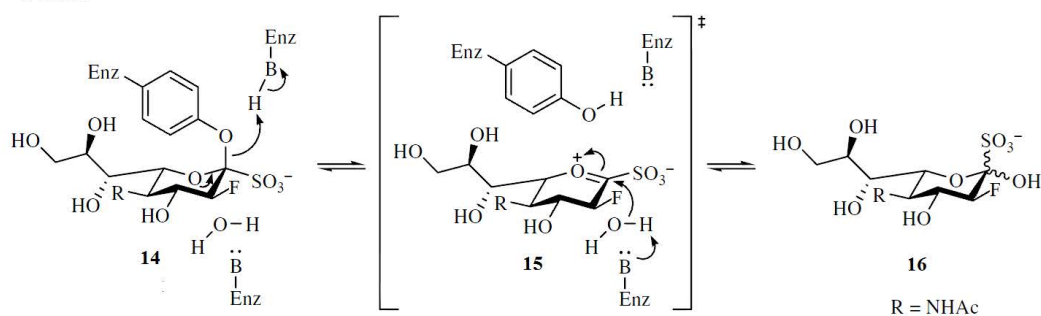
- **5**: IC₅₀ = 0,21 μ M **6a**: IC₅₀ = 0,05 μ M **6g**: IC₅₀ = 0,01 μ M

A fenti eredményeket látva úgy véljük, sikerült igazolni feltevéseinket: az anomer csoport cseréje segít megakadályozni a HN enzim gyors regenerálását, mivel a -SO₃⁻ csoport jelentősen megnöveli a továbbalakuláshoz szükséges átmeneti állapot energiáját. A jelenség hátterében a szulfonáto csoport negatív induktív (-I) és mezomer (-M) effektusa áll. A fluoro- és szulfonáto csoportok szinergikus hatása látható módon tovább növeli az affinitást és növelte a gátlás időtartamát.

3. Eredmények és hasznosulás

Összefoglalásképpen, a projekt újszerűsége három részből áll:

- olyan kovalens hPIV HN inhibitorokat előállításra, amelyek 1000-szer erősebbek (IC₅₀: nM-os tartomány), mint a BCX2798 (**2**, IC₅₀ = 4,8 μ M);
- a fluoro- és a szulfonáto szubsztituensek szinergikus hatása miatt hosszantartó gátlás érhető el (**5. Ábra**)
- kiváló orális biohasznosulás várható az azid funkciós csoport hidrofób derivatizációja miatt



5. Ábra. A mechanizmus alapokon tervezett szulfonát inhibitorok destabilizálják a kötésehasadással járó reakció átmeneti állapotát, így növelik a HN enzim regenerálásához szükséges aktiválási energiát