

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **236446**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **423869**

(22) Data zgłoszenia: **14.12.2017**

(51) Int. Cl.

A61K 31/198 (2006.01)

A61K 31/662 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

(54)

**Zastosowanie fosfonowych analogów lizyny oraz argininy
w leczeniu chorób wywołanych przez wirusa Zika**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

13.08.2018 BUP 17/18

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

11.01.2021 WUP 01/21

(73) Uprawniony z patentu:

POLITECHNIKA WROCŁAWSKA, Wrocław, PL
UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI, Kraków, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:

MARCIN SIĘNCZYK, Wrocław, PL
MARCIN SKOREŃSKI, Jelcz-Laskowice, PL
RENATA GRZYWA, Wrocław, PL
KRZYSZTOF PYRĆ, Kraków, PL
KATARZYNA OWCZAREK, Kraków, PL
JOSE IGNACIO RODRIGUEZ MARTINEZ,
La Carolina, ES

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Katarzyna Paprzycka

PL 236446 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie fosfonowych analogów lizyny oraz argininy w leczeniu chorób wywołanych przez wirusa Zika, jako specyficznych inhibitorów wirusa Zika.

Wirus Zika należy do rodziny *Flaviviridae*, rodzaju *Flavivirus*, (*Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. 2008. Emerg Infect Dis. 14,1232–1239*). Wiele flawiwirusów to istotne patogeny zagrażające życiu i zdrowiu człowieka. Przykładem może być wirus żółtej febry (YFV), wirus dengi (DENV) czy wirus Zachodniego Nilu (WNV). Materiał genetyczny flawiwirusów stanowi dodatnia nić RNA zbudowana z około 11 000 nukleotydów. Wirusowe RNA koduje trzy białka strukturalne (kapsydu, błonowe oraz otoczek) i siedem niestrukturalnych białek (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B i NS5). Po raz pierwszy wirus Zika, został zidentyfikowany w Afryce, jednak rozprzestrzenił się już także w Azji oraz Ameryce Południowej i Środkowej (*Dick, GW, Kitchen, SF, Haddow, AJ, 1952. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 46, 509–520*). Wirus Zika przenoszony jest przez komary z gatunku *Aedes aegypti*. W 75% przypadków infekcja wirusem zazwyczaj przebiega bezobjawowo. W pozostałych przypadkach występują objawy grypopodobne oraz wysypka (tzw. gorączka Zika). Choć dla zdrowego organizmu infekcja wirusem Zika nie stanowi zagrożenia dla życia człowieka, to zakażenie w trakcie ciąży może wiązać się z rozwojem małopłodnia u płodu. Istnieją również doniesienia łączące zakażenie wirusem Zika z rozwinięciem się zespołu Guillaina-Barrego. Niestety, obecnie nie ma dostępnej skutecznej szczepionki przeciwko wirusowi Zika. Dodatkowo nie istnieją żadne doniesienie literaturowe dotyczące aktywności niskocząsteczkowych związków organicznych hamujących replikację wirusa Zika (*Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi PY, Vasilakis N. 2016. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. Antiviral Res. 130,69–80*).

Wirus Zika w swoim genomie koduje proteazę NS3, która wykazuje dużą homologię do analogicznych białek wirusa Dengi (DENV) czy wirusa Zachodniego Nilu (WNV). Wykazano, iż inaktywacja proteazy NS3 prowadzi do inhibicji wzrostu DENV oraz WNV w testach komórkowych (*Chappell KI, Stoermer MJ, Fairlie DP, Young PR. 2008. West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target. Curr Med Chem. 15, 2771–84*).

W literaturze naukowej i patentowej przedstawiono wiele przykładów zastosowania fosfonowych analogów lizyny oraz argininy w postaci estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych jako specyficznych inhibitorów proteaz serynowych. Istnieją również doniesienia o ich aktywności względem wirusowych proteaz serynowych z wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa Zachodniego Nilu (*Skoreński M., Oleksyszyn J, Sieńczyk M.: Antiviral pharmaceutical preparation for use in treatment of hepatitis C, PZ/3138/PCT/AR; Skoreński M., Oleksyszyn J., Sieńczyk M.: Zastosowanie fosfonowych analogów lizyny oraz argininy do hamowania aktywności proteolitycznej proteazy NS2B/NS3 wirusa Zachodniego Nilu, Zgłoszenie Patentowe nr P409664 (02.10.2014)*).

W literaturze patentowej i naukowej nie istnieją doniesienia o fosfonowych analogów lizyny oraz argininy w postaci zastosowaniu estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych, jako inhibitorów proteazy NS3 ekspresjonowanej przez wirus Zika.

Istotą wynalazku jest zastosowanie fosfonowych analogów lizyny oraz argininy w postaci estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych o wzorze ogólnym I w którym Y oznacza grupę aminową lub guanidynową, X oznacza podstawnik pozycji *para*, który może stanowić: atom chloru (-Cl) podstawnik etylowy (-CH₂CH₃), podstawnik *iso*-propylowy (-CH(CH₃)₂), podstawnik metoksyłowy (-OCH₃), podstawnik *tert*-butylowy (-C(CH₃)₂) w leczeniu chorób wywołanych przez wirus Zika, poprzez hamowanie proteazy NS3 ekspresjonowanej przez wirus Zika.

Synteza związków przedstawionych wzorami II-V przebiega zgodnie z metodą opisaną w literaturze (*Sieńczyk M, Oleksyszyn J. 2006. Inhibition of trypsin and urokinase by Cbz-amino(4-guanidinophenyl)methanephosphonate aromatic ester derivatives: the influence of the ester group on their biological activity. Bioorg Med Chem Lett. 16, 2886–90*).

W pierwszym etapie przy zastosowaniu odpowiednich fenoli (4-chlorofenol, 4-etylofenol, 4-izopropylfenol, 4-*tert*-butylfenol, 4-metyloksyfenol) oraz chlorku fosforu (PCl₃) otrzymuje się odpowiednie fosfony trialkylowe, które następnie używa się w reakcji α -amidoalkilowania karbaminianem benzylu oraz 4-nitrobenzaldehydu, które dają fosfonowe nitrowe pochodne fenyloglicyny. Zastosowanie uwodnionego chlorku cyny (SnCl₂) we wrzącym octanie etylu umożliwiło przekształcenie pochodnych

nitrowych w pochodne aminowe. Użycie N,N'-di-Boc-S-etyloizotiomocznika jako odczynnika guanidynującego w obecności chlorku rtęci prowadzi do otrzymania pochodnych guanidynowych.

Struktury prezentowanych związków to fosfonowe, elektrofilowe analogi aminokwasów (diarylowe estry fosfonowych analogów aminokwasów). Związki należące do tej klasy charakteryzuje wysoka specyficzność i absolutna selektywność działania wobec proteaz serynowych. Dodatkowo nie są toksyczne *in vivo* oraz posiadają wysoką (>72h) stabilność w ludzkiej plazmie (Sieńczyk M, Oleksyszyn J. 2009. Irreversible inhibition of serine proteases – design and *in vivo* activity of diaryl alpha-aminophosphonate derivatives. *Curr Med Chem.* 16, 1673–87). Prezentowane fosfonowe aromatyczne analogi lizyny i argininy mogą stanowić nową strategię w zwalczaniu infekcji wywołanych wirusem Zika.

Przedmiot wynalazku został bliżej przedstawiony w przykładach realizacji oraz na rysunku na którym:

Fig. 1 przedstawia wykres przedstawiający zahamowanie replikacji wirusa Zika przez związek WKS 3, w porównaniu do kontroli DMSO.

LRV = logarytmiczny spadek liczby kopii RNA wirusa. Istotność statystyczna została określona przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), gdzie $\alpha = 0,05$.

Fig. 2 przedstawia wykresy cytotoksyczności związku WKS 3 w wybranych hodowlach komórkowych.

A – linia komórkowa Vero; B – pierwotne ludzkie fibroblasty skórne (HSF); C – pierwotne ludzkie fibroblasty płucne (HLF). Istotność statystyczna została określona przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), gdzie $\alpha = 0,05$. Brak oznaczenia wskazuje, że zmiana nie jest istotna statystycznie.

Przykład 1. Aktywność biologiczna związków przedstawionych wzorami II-V

Aktywność związków względem wirusowej proteazy NS3 oraz wpływ związków na replikację wirusa Zika w hodowlach komórkowych przedstawiono w Tabeli 1. Aktywność inhibitorowa związków została wyznaczona przy użyciu rekombinowanej proteazy NS3 wirusa Zika oraz fluorogenicznego substratu zgodnie z metodą przedstawioną przez Gruba i wsp. (Gruba N, Rodriguez Martinez JI, Grzywa R, Wysocka M, Skoreński M, Burmistrz M, Łęcka M, Lesner A, Sieńczyk M, Pyrc K. *Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease, FEBS Lett.* 2016, 590, 3459–3468).

Tabela 1.

Aktywność biologiczna związków przedstawionych wzorami II- V

Związek	Inhibicja proteazy NS3	% zahamowania replikacji wirusa Zika w komórkach Vero
II	$K_i = 64 \mu\text{M}$ $k_2/K_i = 11 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	100%; $C_i = 100 \mu\text{M}$
III	$K_i = 18 \mu\text{M}$ $k_2/K_i = 22 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	100%; $C_i = 100 \mu\text{M}$
IV	5%; $C_i = 100 \mu\text{M}$	10%; $C_i = 10 \mu\text{M}$
V	3%; $C_i = 100 \mu\text{M}$	5%; $C_i = 10 \mu\text{M}$
VI	8%; $C_i = 100 \mu\text{M}$	30%; $C_i = 10 \mu\text{M}$

Przykład 2. Hamowanie aktywności proteolitycznej proteazy NS3 wirusa Zika *in vitro*.

Testy enzymatyczne przeprowadzono w temperaturze 37°C przy użyciu białych płaskodennych mikropłytek 96-cio dołkowych firmy Corning. Do pomiarów wykorzystano spektrofлуorymetr Spectra Max Gemini XPS firmy Molecular Devices, a analizę uzyskanych danych przy użyciu programów SoftMax 5.0.1, Microsoft Excel oraz GraphPad Prism 5.01. Zastosowane stężenie enzymu wynosiło: 0,04 $\mu\text{g/ml}$; użyto substrat: Pyr-Arg-Thr-Lys-Arg-AMC w stężeniu 83 μM . Test przeprowadzono w buforze: 50 mM Tris, 1 mM CHAPS, 20% glicerol, pH 8,5.

W pierwszym etapie przeprowadzono test przesiewowy. W tym celu dokonano pomiaru aktywności inhibitorowej każdego związku w stężeniu 100 μM inkubowanego wstępnie z enzymem przez 15 minut. Następnie dla związków, które wykazały więcej niż 10% inhibicji wyznaczono dokładną wartość

K_i oraz k_2/K_i . Stałą szybkości reakcji pozornie pierwszorzędowej wyznaczano dla siedmiu różnych stężeń inhibitora korzystając z równania:

$$[P] = v_s t + \frac{v_i - v_s}{k_{obs}} [1 - e^{(-k_{obs} t)}]$$

(1)

(następnie wyznaczono stałą szybkości reakcji drugorzędowej wykorzystując równanie:

$$k_{obs} = \frac{k_2 [I]}{K_I + [I]}$$

(2)

P r z y k ł a d 3. Zahamowanie replikacji wirusa Zika w komórkach Vero przez związek przedstawiony wzorem III.

Zbadano zahamowanie replikacji wirusa Zika (ZIKV, ang. *Zika Virus*, szczep H/PF/2013) przez związek przedstawiony wzorem III. W ramach eksperymentu inkubowano komórki linii Vero (*African green monkey kidney normal*) z 20–100 μM roztworami związku przedstawionego wzorem III lub kontrolnym roztworem DMSO w pożywce DMEM z 3% surowicy bydlęcej. Po 1 godzinie inkubacji w 37°C, komórki zainfekowano wirusem Zika o mianie 800 TCID₅₀/ml. Po 2 godzinach inkubacji pożywka hodowlana została usunięta, a komórki zostały przemyte trzykrotnie czystym roztworem PBS i pozostawione w temperaturze 37°C w pożywce zawierającej związek III. Próbkę nadsączy komórkowych zostały pobrane po 72 godzinach od inokulacji wirusem. Z pobranych próbek wyizolowano całkowite RNA, które następnie poddano reakcji odwrotnej transkrypcji, po czym wykorzystano je jako matryce do reakcji PCR. Otrzymane wyniki przedstawiono na *rycinie 1*. Zaobserwowano, że związek przedstawiony wzorem III w stężeniach 20 μM i 40 μM efektywnie zahamował namnażanie się wirusa ZIKA w wykorzystanej linii komórkowej. Stężenia 80 i 100 μM były toksyczne dla komórek, więc wykluczono je z analizy.

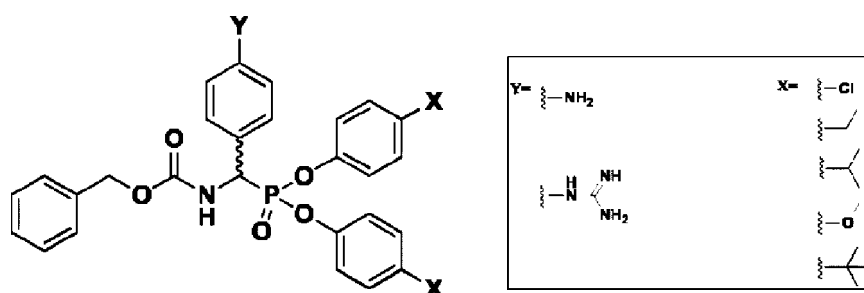
P r z y k ł a d 4. Cytotoksyczność badanego związku przedstawionego wzorem III w hodowlach komórkowych.

Zbadano cytotoksyczność związku na linii komórkowej Vero (*African green monkey kidney normal*) wrażliwej na zakażenie wirusem Zika, jak również na pierwotnych ludzkich fibroblastach skórnych (HSF) i płucnych (HLF). Eksperyment przeprowadzono poprzez inkubację komórek Vero, HSF i HLF z wzrastającymi stężeniami badanych związków (20–100 μM) lub kontrolnego roztworu DMSO w pożywce hodowlanej DMEM z dodatkiem 3% surowicy bydlęcej. Cytotoksyczność związków określono za pomocą kolorymetrycznego testu XTT, którego działanie opiera się na zdolności enzymów mitochondrialnych do redukcji barwnika XTT (ang. (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) do barwnych soli formazanu. Określenie ilości żywych komórek możliwe jest dzięki bezpośredniej zależności, pomiędzy ilością powstałego barwnika, a żywotnością i kondycją komórek. Cytotoksyczność komórek określono po 72 h inkubacji z badanymi związkami. Wyniki analizy przedstawione są na *rycinie 2*. Obydwa związki wykazywały cytotoksyczność w stężeniach $\geq 80 \mu\text{M}$; jednak w stężeniach 20 μM i 40 μM nie miały wpływu na żywotność komórek.

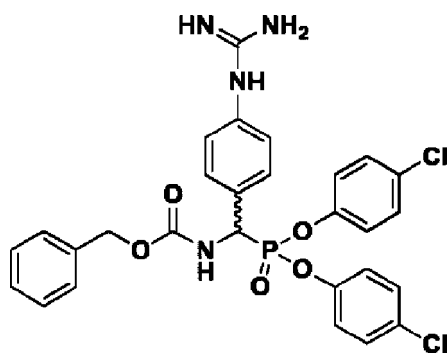
Zastrzeżenie patentowe

1. Fosfonowe analogi lizyny oraz argininy w postaci estrów kwasów 1-aminoalkilofosfonowych o wzorze ogólnym I w którym Y oznacza grupę aminową lub guanidynową, X oznacza podstawnik w pozycji para, który stanowi: atom chloru (-Cl) podstawnik etylowy (-CH₂CH₃), podstawnik *iso*-propylowy (-CH(CH₃)₂), podstawnik metoksyłowy (-OCH₃), podstawnik *tert*-butylowy (-C(CH₃)₂) do zastosowania w leczeniu chorób wywołanych przez wirusa Zika, poprzez hamowanie proteazy NS3 ekspresjonowanej przez wirusa Zika.

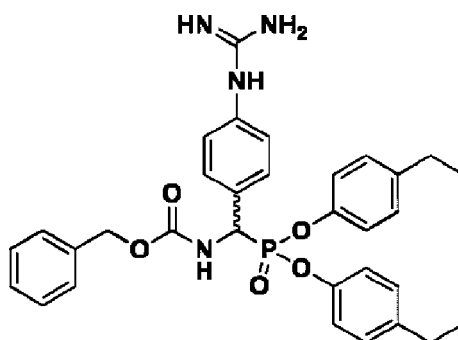
Rysunki



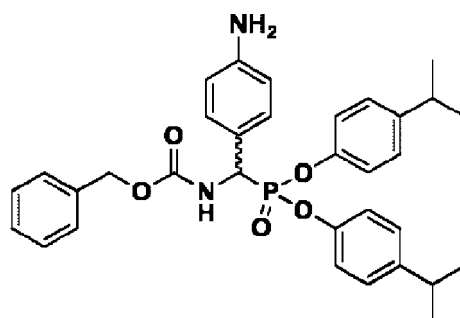
WZÓR OGÓLNY I



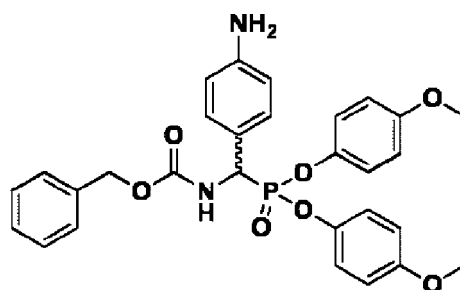
WZÓR II



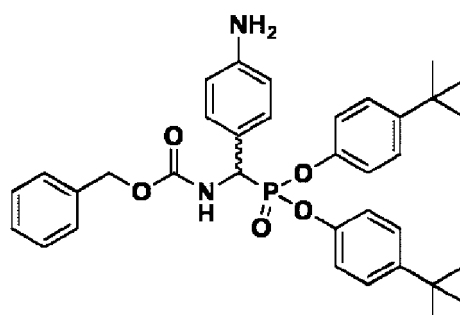
WZÓR III



WZÓR IV



WZÓR V



WZÓR VI

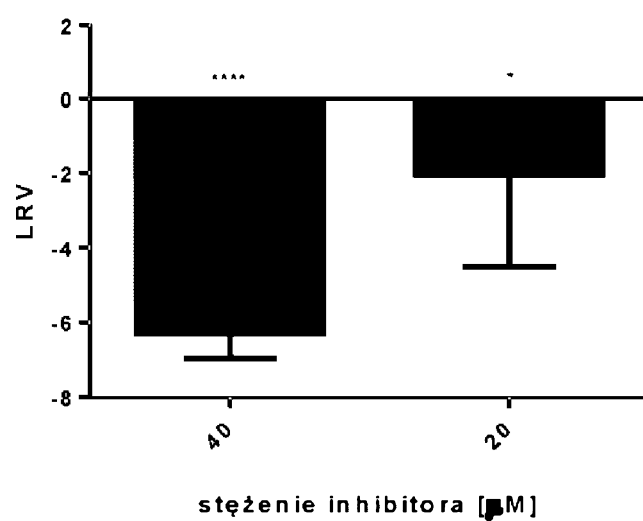


Fig. 1

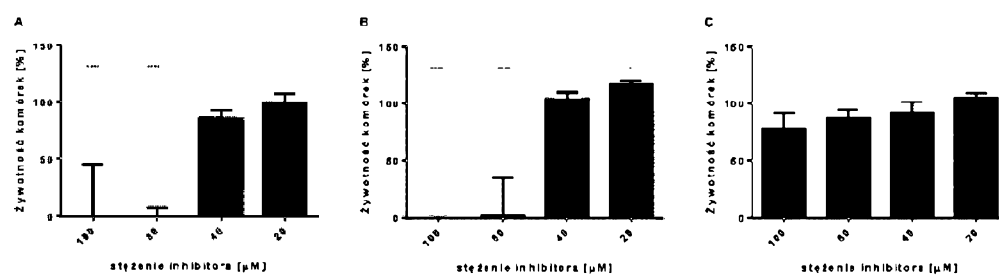


Fig. 2