



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **Mechanism-based inhibitors and probes for neuraminidases**

Vriens, M.B.L.

### **Citation**

Vriens, M. B. L. (2023, September 12). *Mechanism-based inhibitors and probes for neuraminidases*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3640082>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3640082>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

# Nederlandse samenvatting

Neuraminidases, de enzymen die siaalzuurverbindingen hydrolyseren, zijn betrokken bij influenza infecties alsmede bij vele cellulaire processen in het menselijk lichaam en in micro-organismen. Door de jaren heen is een veelvoud aan neuraminidaseremmers ontwikkeld. Het merendeel daarvan is gebaseerd op het natuurproduct 2,3-didehydro-2-deoxy-*N*-acetylneuraminezuur (DANA). Een aantal van deze remmers wordt klinisch toegepast bij influenza infecties. Naast deze competitieve remmers zijn er ook irreversibele covalente neuraminidaseremmers ontwikkeld, onder andere voor toepassing in '*activity-based protein profiling*' (ABPP) voor het bestuderen van neuraminidasen. Andere benaderingen om neuraminidasen onomkeerbaar te markeren maken gebruik van onder andere fotoaffiniteit gebaseerde eiwitprofilering en *probes* op basis van onder andere chinon methide chemie.

**Hoofdstuk 1** beschrijft de verschillende neuraminezuren en introduceert de enzymen die deze koolhydraten verwerken, met een focus op neuraminidasen. Daarnaast is de rol van neuraminidasen in verschillende ziektes beschreven en geeft dit hoofdstuk een overzicht van de voorheen gesynthetiseerde neuraminidaseremmers en moleculaire *probes*.

In **hoofdstuk 2** worden een aantal literatuurprocedures voor de synthese van carbocyclisch siaalzuur opgesomd. Vervolgens zijn verscheidene syntheseroutes richting een Neu5Ac geconfigureerde cyclophellitol analoog uitgewerkt. Deze routes zijn onder andere gebaseerd op eerder beschreven syntheseroutes voor carbocyclisch siaalzuur en op een aantal beschreven syntheseroutes voor het anti-influenza medicijn oseltamivir. Ondanks de veelzijdigheid van shikiminezuur en chinazuur is er geen geschikte synteseroute gevonden om een Neu5Ac geconformeerde cyclophellitol derivaat te synthetiseren.

In plaats van synthese van een Neu5Ac geconfigureerd cyclophellitol analoog, komt het gebruik van oseltamivir als startpunt voor irreversibele remmers voor neuraminidasen in **hoofdstuk 3** aan bod. Er is gestart met een analyse van het conformationele gedrag van een model-aziridine middels een metadynamische simulatie. Net zoals oseltamivir neemt ook oseltamivir aziridine een  $^4H_5$  halfstoelconformatie aan. Dit suggereert dat oseltamivir aziridine waarschijnlijk kan optreden als analoog van de overgangstoestand die voorkomt in het actieve centrum van het enzym wanneer neuraminidasen hun substraat omzetten. Daarna is de synthese van oseltamivir aziridine beschreven. Zowel een syntheseroute die loopt *via* een intermediair cyclisch sulfaat als *via* een intermediair epoxide zijn onderzocht. De syntheseroute *via* het cyclisch sulfaat bleek niet in staat het gewenste aziridine te leveren, daarentegen was de syntheseroute via het epoxide wel succesvol.

**Hoofdstuk 4** beschrijft de synthese van een aantal derivaten van oseltamivir aziridine, waarvan de synthese beschreven is in hoofdstuk 3. Het alkyleren van de aziridine bleek niet te verwezenlijken met de beschreven condities, echter het acyleren van deze aziridine bleek mogelijk middels het gebruik van symmetrische anhydriden. Orthogonaliteit in reactiviteit

tussen de aziridine en het vrije amine bleek te bereiken door gebruik te maken van de fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) beschermgroep. Zo konden een acetyl-, butyryl-, isobutyryl- en hexynoylaziridine vanuit oseltamivir aziridine gesynthetiseerd worden. Vanuit de hexynoylaziridine kon een fluorescente *probe* gesynthetiseerd worden middel van koper(I)-gekatalyseerde azide-alkyn 'klikchemie'.

De aziridines beschreven in hoofdstuk 3 en 4 werden aan *in vitro* enzymatische analyses onderworpen in **hoofdstuk 5**. Oseltamivir aziridine (uit hoofdstuk 3) bleek een competitieve remmer te zijn, in tegenstelling tot de geacyleerde aziridines uit hoofdstuk 4, die covalent en onomkeerbaar bleken te reageren met het enzym. Van de onomkeerbaar bindende acylaziridines werden de kinetische parameters  $K_i$  en  $k_{inact}$  bepaald. Uit deze waarden bleek een relatief hoge affiniteit en lage reactiviteit.

Op recombinante neuraminidases van H1N1wt en H5N1wt werd subnanomolaire activiteit gevonden voor de aziridines, een enigermate hogere activiteit dan die van oseltamivir carboxylaate. Voor de oseltamivir-resistente enzymen H1N1 H275Y en H5N1 H275Y werd een verminderde reactiviteit van twee tot drie ordegrottes gevonden voor de acylaziridines. De fluorescente *probe* toonde zich in staat actieve neuraminidases te labelen. Recombinante enzymen van de infleuzastammen H1N1 en H5N1 uit overexpressieysaat werden effectief gelabeld. Ook in de oseltamivir resistente mutanten H1N1 H275Y en H5N1 H274Y bleek labeling effectief. Labeling van actieve neuraminidases werd daarnaast aangetoond in een commercieel verkrijgbaar griepvaccin (Fluarix® Tetra, GSK). Door het toevoegen van remmers, in dit geval oseltamivir carboxylaate, zanamivir of een van bovengenoemde aziridines treed er competitie op en wordt het enzym niet gelabeld.

Bemoedigd door de hoge activiteit van de oseltamivir-gebaseerde acylaziridines is in **hoofdstuk 6** een tweetal remmers beschreven zonder de virus specifieke 3-pentylgroep en vrije amine, om zo remmers met een mogelijk breder activiteitsprofiel te verkrijgen. Door het weglaten van de virus-specifieke elementen in deze remmers kunnen, naast influenza neuraminidases, mogelijk ook neuraminidases van andere oorsprong geremd worden. Hiertoe is de 3-pentylgroep vervangen door de niet-vertakte propylgroep en is in een andere remmer daarnaast ook de vrije amine vervangen door een hydroxylgroep. **Hoofdstuk 7** bevat tenslotte, naast een Engelse samenvatting, ook een aantal aanbevelingen voor toekomstig onderzoek en initiële experimenten die reeds in sommige richtingen gedaan zijn.