



Universiteit
Leiden
The Netherlands

ADP-ribose analogues: synthetic strategy towards inhibitors for viral macrodomains: SARS-CoV-2

Rijpkema, K.J.

Citation

Rijpkema, K. J. (2026, April 16). *ADP-ribose analogues: synthetic strategy towards inhibitors for viral macrodomains: SARS-CoV-2*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4302122>

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/1887/4302122>

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

Nederlandse Samenvatting

ADP-ribose analoga – Synthetische strategie naar remmers voor virale macrodomeinen: SARS-CoV-2

Adenosine difosfaat ribosylering (ADP-ribosylering) is een post-translationele modificatie, die essentieel is voor het correct functioneren van het menselijke immuunsysteem. Wanneer er een infectie plaatsvindt, worden bepaalde signaalsubstraten geADP-ribosyleerd om aan het lichaam te signaleren dat er een immuunrespons moet optreden. Dientengevolge hebben sommige virussen mechanismes ontwikkeld om deze modificatie teniet te doen. Een van deze virussen is COVID-19, het virus verantwoordelijk voor de wereldwijde coronapandemie. COVID-19 codeert voor een ADP-ribosylhydrolase die bekend staat als macrodomein 1 (Mac1). Het is bekend dat Mac1 de ADP-ribosyl – substraat band van het signaalmolecuul hydrolyseert om zo de signaaloverdracht te stoppen en de immuunrespons te vertragen. Dit heeft als gevolg dat COVID-19 zich veel makkelijker binnen het menselijk lichaam kan verspreiden, voordat het immuunsysteem het virus kan bestrijden, wat zorgt voor heftigere symptomen en een slechter ziektebeeld. Medicatie die Mac1 remt zou dan ook een verbeterde immuunrespons kunnen faciliteren en daarmee minder heftige symptomen en een beter ziektebeeld kunnen bewerkstelligen. Voordat zulke medicatie ontwikkeld kan worden, moet eerst onderzocht worden hoe Mac1 precies functioneert en welke moleculaire patronen zich sterk aan Mac1 binden. Zodoende zijn er sinds 2020 meerdere remmers voor Mac1 ontwikkeld. Deze remmers zijn, op enkele uitzonderingen na, ontdekt via het screenen van enorme bibliotheken van chemische verbindingen, waarna analyse van de hits en het combineren van kansrijke moleculaire motieven potente remmers heeft opgeleverd. In tegenstelling tot deze aanpak richt het onderzoek beschreven in dit proefschrift zich op de ontwikkeling van remmers voor Mac1 via het nabootsen van het ADP-ribosyl-substraat, door het ontwerp en de synthese van meerdere ADP-ribose analoga.

Hoofdstuk 1, de algemene introductie, leidt het onderzoek beschreven in dit proefschrift in, door verschillende concepten die van belang zijn voor het onderzoek beschreven in dit proefschrift, te behandelen. De rol van enzymen en post-translationele modificaties wordt kort geïntroduceerd. Een van deze post-translationele modificaties, ADP-ribosylering, wordt beschreven in de context van de immuunrespons. Hierna wordt de levenscyclus van COVID-19 onder de loep genomen, waaruit blijkt dat een van de enzymen waar COVID-19 voor codeert, Mac1, cruciaal is voor het virus om het menselijk immuunsysteem te omzeilen. Mac1 doet dit door middel van de hydrolyse van de ADP-ribosyl-substraatband in het immuunsignaalcomplex. Hierop volgt een korte beschrijving van een select aantal bekende remmers voor Mac1 en hoe deze zijn ontwikkeld. Het onderzoek in dit proefschrift wordt ingeleid door de noodzaak voor remmers die ADP-ribose nabootsen te illustreren, gevolgd door een korte beschrijving van de chemie die

nodig is om de ADP-ribose-analoga te synthetiseren. Het hoofdstuk eindigt met een overzicht van hoe dit proefschrift opgedeeld is, op basis van de verschillende facetten van de ADP-ribose structuur: de distale ribose (de ribose ring die aan het substraatcomplex zit), het difosfaat (ook pyrofosfaat genoemd) en de adenosine.

Hoofdstuk 2 beschrijft de synthese van ADP-ribose-analoga aangepast op het anomere centrum van de distale ribose, de plaats waar het ADP-ribose molecuul vastzit aan het substraat in het immuunsignaalcomplex. Een korte samenvatting van voorheen gesynthetiseerde, op ADP-ribose-gebaseerde analoga illustreert verschillende synthetische opties om het anomere centrum te variëren en stabiliseren. Het ontwerp en de synthese van een eerste set analoga wordt beschreven, waarna het testen van deze moleculen, samen met eerder gesynthetiseerde ADP-ribose-analoga, in een competitie-assay, een potente kandidaat heeft geïdentificeerd: het α -azide ADP-riboside ($IC_{50} = 0.49 \mu M$). Omdat co-kristallografie studies van het α -azide ADP-riboside en Mac1 suggereerden dat er een hydrolyse reactie had opgetreden op het anomere azide *in crystallo*, zijn twee gestabiliseerde mimetica ontworpen: een α -ethynyl ADP-riboside, een analoog met een alkyn dat middels een C-C band is vastgemaakt aan het anomere koolstofatoom van de ribose ring, en een α -azide ADP-thioriboside, een analoog met een endocyclisch zwavelatoom in de distale ribose. Vervolgens zijn de verbindingen gesynthetiseerd en getest, waaruit blijkt dat beide moleculen goede mimetica zijn van het α -azide ADP-riboside en Mac1 effectief remmen ($IC_{50} = 1.2 \mu M$ voor het C-glycoside en $IC_{50} = 0.27 \mu M$ voor het thioriboside). Ten slotte geeft de analyse van navolgende succesvolle co-kristallografische studies van het α -azide ADP-thioriboside en Mac1 een indicatie dat een watermolecuul in de bindingsruimte van Mac1 zo gepositioneerd is dat deze de hydrolyse van het labiele anomere azide in het α -azide ADP-riboside zou kunnen faciliteren, iets wat niet geobserveerd is voor de gestabiliseerde thioriboside variant.

Hoofdstuk 3 beschrijft de synthese van ADP-ribose-analoga aangepast op de C2''- en C3''-posities van de distale ribose. Analyse van co-kristalstructuren van Mac1 met ADP-ribose uit de wetenschappelijke literatuur, laten zien dat het bewerkstelligen van interacties met een naburig fenylalanine-residu van Mac1 nog potentere remmers zouden kunnen opleveren. Bouwend op de resultaten van het voorgaande hoofdstuk worden vier moleculen ontworpen: twee analoga met een benzyl groep op de C2''-hydroxyl en twee analoga met *O*-methyl oxime op de C2''- of C3''-positie. De succesvolle synthese van de analoga volgt, waarna uit het testen van deze moleculen blijkt dat de hydroxylen op C2''- en C3''-posities kritisch zijn voor de binding van de remmers aan Mac1 en dus wordt deze onderzoeksrichting niet verder verkend.

Hoofdstuk 4 beschrijft de synthese van ADP-ribose analoga waar de adenosine is vervangen door de remdesivir-metaboliet GS-441524. Dit metaboliet is een bekende binder van Mac1 en de incorporatie van deze structuur in een ADP-ribose-analoog zou meer potente remmers op kunnen leveren. Deze remmers worden door de incorporatie

van de remdesivir-structuur dan ook RDP-ribosides genoemd. Er worden drie RDP-ribosides ontworpen, bouwend op de resultaten behaald in de voorgaande hoofdstukken. De synthese van GS-441524 wordt gevolgd door de incorporatie van dit analoog in de RDP-ribosides, waarna testen van de remmers hun hoge potentie ($IC_{50} = 30$ nM voor α -azide RDP-riboside) aangeeft.

Hoofdstuk 5 beschrijft het werk gedaan aan de synthese van een ander adenosine-analoog, gebaseerd op een remmer uit de wetenschappelijke literatuur. Uit de analyse van co-kristallen van een recent gepubliceerde remmer met Mac1 blijkt dat deze remmer Mac1 bindt waar normaliter het adenosine dat doet. Echter heeft deze remmer, in tegenstelling tot GS-441524, geen aanknopingspunt om het te kunnen incorporeren in een ADP-ribose-analoog. Zodoende beschrijft dit hoofdstuk de ontwikkeling van een *de novo* synthese die ontwikkeld is om deze structuur in ADPr analoga te kunnen incorporeren, namelijk door het inbouwen van een hydroxymethylgroep. De synthese van een belangrijke tussenstof wordt beschreven, waarin gebruik wordt gemaakt van een breed scala aan verschillende synthetische methodologieën.

Hoofdstuk 6 beschrijft de synthese van ADP-ribose analoga waarin het difosfaat, ook wel pyrofosfaat genoemd, vervangen is door dan wel oxysulfuryl- of oxyfosforyl carbamaten, respectievelijk afgekort als SC en PC. Het vervangen van het zeer polaire pyrofosfaat met deze minder polaire groepen heeft als doel de lipofiliciteit van de beste kandidaten uit de voorgaande hoofdstukken te verbeteren om zo hun kans op de passage door de lipide dubbellaag van cellen in *in vivo* studies te verhogen. Installatie van de SC en PC linkers is gelukt door gebruik te maken van twee centrale reagentia: chlorosulfuryl isocyanaat (CSI) en dichlorofosforyl isocyanaat (dCPI). Uit de biologische evaluatie van de analoga blijkt dat de effectiviteit van de oxysulfuryl carbamaten iets lager is dan de potentie hun pyrofosfaat tegenhangers ($IC_{50} = 160$ nM versus 30 nM voor het pyrofosfaat). Een $\sim$ vijfvoudige afname in activiteit is de prijs voor een significante toename in lipofiliciteit.

Hoofdstuk 7 beschrijft de synthese van ADP-ribose analoga met een α -epoxide op de distale ribose positie om inzicht te krijgen in het hydrolytische mechanisme van Mac1. Door een α -epoxide te incorporeren in een remmer, een aanpak geïnspireerd door cyclophellitol, een natuurlijk voorkomende glycosidase-remmer, zou één van de mogelijke katalytische mechanismen van Mac1 bevestigd kunnen worden, mits gevonden wordt dat Mac1 irreversibel bindt aan de desbetreffende remmer. Gebruik makend van alle hiervoor behaalde resultaten zijn drie analoga ontworpen: een α -epoxide ADP-carbariboside, een α -epoxide RDP-carbariboside en een α -epoxide RSC-carbariboside. De synthese van de benodigde α -epoxidecarbariboside bouwsteen wordt beschreven, waarna deze op verschillende manieren wordt geïncorporeerd in de doelstructuren om de drie analoga te realiseren. Biologische evaluatie van de remmers geeft blijk van hun uiterst sterke potentie ($IC_{50} = 5$ nM voor α -epoxide RDP-riboside en $IC_{50} = 13$ nM voor

het α -epoxide RSC-riboside), die toegekend kan worden aan de conformatie van het α -epoxide, daar deze een overgangstoestand in het Mac1-hydrolytische mechanisme kan nabootsen. Navolgende co-kristallografie studies van de remmers met Mac1 bevestigen dat het epoxide intact blijft. De identificatie van het α -epoxidecarbariboside als extreem potent motief om de distale ribose te vervangen opent deuren voor toekomstige generaties aan potente mimetica.

Hoofdstuk 8 geeft ten slotte een samenvatting van dit proefschrift, gevolgd door suggesties voor toekomstig werk in de synthese van ADP-ribose-analoga als potente remmers voor Mac1.