



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SALERNO
Dipartimento di Farmacia

PhD Program
in **Drug Discovery and Development**
XXXV Cycle — Academic Year 2022/2023

PhD Thesis in

***Design, synthesis and pharmacological evaluation
of new enzyme inhibitors***

Candidate

Gerardina Smaldone

Tutor

Prof. *Alessia Bertamino*

PhD Program Coordinator: Prof. Dr. *Gianluca Sbardella*

Abstract

My PhD research plan relates to the exploration of the structural requirements for the modulation of enzymes involved in the pathogenesis of viral infections and inflammatory disorders. The first part of my doctoral project focused on the study of viral targets, particularly the main protease (Mpro) of SARS-CoV-2, the etiologic agent of COVID-19 that caused not only the biggest health crisis in the last century but also an unrecoverable socio-economic collapse. Despite all the efforts, addressed to build an efficient vaccine campaign, the virus spread is still ongoing and the challenge is still open. So, in the first chapter of this PhD thesis I report a step-by-step in silico design of a library of peptidomimetic compounds able to inhibit Mpro: the synthesized derivatives were screened by enzymatic assays, conducted on different viral targets, and, then, cellular activity was evaluated using Vero cells based viral infection model, leading to the identification of a dual inhibitor (29) of the two proteases of SARS-CoV-2, the main protease (Mpro) and the papain-like protease (PLpro). Subsequently, in vitro studies of a second series of molecules, designed from the most potent derivative of the first series, led to the identification of a new hit compound (51) characterized by high inhibitory potency against Mpro, as well as remarkable antiviral activity against several variants of SARS-CoV-2.

Metabolic pathways involving arachidonic acid (AA) play key roles in cardiovascular physiology, carcinogenesis, and in many inflammatory diseases such as asthma or arthritis, so the second chapter of this PhD thesis focuses on the study of two enzymatic targets involved in the metabolism of arachidonic acid: the 5-lipoxygenase and the soluble epoxide hydrolase (sEH). In vitro and in vivo characterization of a first series of indoline scaffold derivatives led to the identification of a dual inhibitor of the two enzymes (73), while additional assays conducted on successive series of compounds designed as selective inhibitors of the enzyme sEH, led to the identification of an indole

derivative (110) as a selective inhibitor of epoxide hydrolase, paving the way for further investigation as well as optimization of a new series of analogues.

-

Il mio progetto di ricerca di dottorato riguarda l'esplorazione dei requisiti strutturali per la modulazione degli enzimi coinvolti nella patogenesi delle infezioni virali e dei disturbi infiammatori. La prima parte del mio progetto di dottorato si è concentrata sullo studio di bersagli virali, in particolare la Main protease (Mpro) di SARS-CoV-2, l'agente eziologico del COVID-19 che ha causato non solo la più grande crisi sanitaria dell'ultimo secolo ma anche un collasso socio-economico irrecuperabile. Nonostante tutti gli sforzi, indirizzati a costruire una campagna vaccinale efficiente, la diffusione del virus è ancora in corso e la sfida è ancora aperta. Nel primo capitolo di questa tesi di dottorato, quindi, riporto la progettazione in silico di una libreria di composti peptidomimetici in grado di inibire la Mpro: i derivati sintetizzati sono stati sottoposti a screening enzimatico, condotto su diversi target virali, e, successivamente, l'attività cellulare è stata valutata utilizzando cellule Vero e un modello di infezione virale, portando all'identificazione di un inibitore duale (29) delle due proteasi del SARS-CoV-2, la main protease (Mpro) e la papain like protease (PLpro). Successivamente, studi in vitro condotti su una seconda serie di molecole, progettate a partire dal derivato più potente della prima serie, hanno portato all'identificazione di un nuovo composto (51) caratterizzato da un'elevata potenza inibitoria nei confronti della Mpro, nonché da una notevole attività antivirale nei confronti di diverse varianti del SARS-CoV-2.

Le vie metaboliche che coinvolgono l'acido arachidonico (AA) giocano ruoli chiave nella fisiologia cardiovascolare, nella carcinogenesi e in molte malattie infiammatorie come l'asma o l'artrite, per cui il secondo capitolo di questa tesi di dottorato si concentra sullo studio di due target enzimatici coinvolti nel metabolismo dell'acido arachidonico: la 5-lipossigenasi e l'idrolasi epossidica solubile (sEH). La caratterizzazione in vitro e in vivo di una prima serie di derivati indolici ha portato all'identificazione di un inibitore duale dei due enzimi (73), mentre ulteriori

saggi condotti su serie successive di composti progettati come inibitori selettivi dell'enzima sEH, hanno portato all'identificazione di un derivato indolico (110) come inibitore selettivo dell'idrolasi epossidica, aprendo la strada a ulteriori indagini e all'ottimizzazione di una nuova serie di analoghi.