

Peptidomimetički inhibitori SARS-CoV-2 3CLpro, proteaze odgovorne za replikaciju i infekciju koronavirusom

Kovač, Gloria

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:380806>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International](#)/[Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Gloria Kovač

7842/PT

**PEPTIDOMIMETIČKI INHIBITORI SARS-CoV-2 3CLpro,
PROTEAZE ODGOVORNE ZA REPLIKACIJU I INFEKCIJU
KORONAVIRUSOM**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Organska kemija

Mentor: Prof. dr. sc. Lidija Barišić

Zagreb, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija
Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za organsku kemiju
Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

PEPTIDOMIMETIČKI INHIBITORI SARS-CoV-2 3CLpro, PROTEAZE ODGOVORNE ZA REPLIKACIJU I INFEKCIJU KORONAVIRUSOM

Gloria Kovač, 7842/PT

Sažetak: Peptidomimetici su molekule koje svojom 3D-strukturom oponašaju bioaktivnu konformaciju prirodnih peptida, a odlikuju se povećanom proteolitičkom stabilnošću i selektivnošću prema receptorima te većom bioraspoloživošću u odnosu na prirodne peptide. Nakon ulaska SARS-CoV-2 u stanicu, virusna RNA translatira se na ribosomima, a virusna proteaza SARS-CoV-2 3CLpro sudjeluje u hidrolizi nastalih poliproteina nakon čega slijedi tvorba novih viriona. Stoga se inhibicijom virusne proteaze onemogućava njegova replikacija. Opisani su peptidomimetički inhibitori virusne proteaze u kojima je aminokiselinska sekvencija iz prirodnog supstrata modificirana funkcijskom skupinom (aldehid, α -ketoamid ili Michaelov akceptor) pomoću koje s aktivnim mjestom enzima uspostavlja kovalentnu vezu. Time se kompleks inhibitora i proteaze dodatno stabilizira što dovodi do inhibicije enzima odnosno replikacije virusa. Usporedbom kristalnih struktura kompleksâ peptidomimetičkih inhibitora i SARS-CoV-2 3CLpro te evaluacijom njihovog inhibitornog djelovanja, najučinkovitijim inhibitorima pokazali su se peptidomimetici s umetnutom α -ketoamidnom skupinom.

Ključne riječi: kristalna struktura, peptidomimetički inhibitori, SARS-CoV-2 3CLpro

Rad sadrži: 26 stranica, 17 slika, 5 tablica, 19 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: dr. sc. Lidija Barišić, red.prof.

Datum obrane: 16. rujan 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

University undergraduate study Food Technology

Department of Chemistry and Biochemistry

Laboratory for Organic Chemistry

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

PEPTIDOMIMETIC INHIBITORS OF SARS-CoV-2 3CLpro, PROTEASE RESPONSIBLE FOR REPLICATION AND CORONAVIRUS INFECTION

Gloria Kovač, 7842/PT

Abstract: Peptidomimetics are molecules whose 3D structure mimics the bioactive conformation of natural peptides. They are characterized by higher proteolytic stability, selectivity for receptors and higher bioavailability compared to natural peptides. After SARS-CoV-2 enters the cell, viral RNA is translated on the ribosomes, and the viral protease SARS-CoV-2 3CLpro is involved in the hydrolysis of the resulting polyproteins followed by the formation of new virions. Therefore, inhibition of the viral protease prevents viral replication. Peptidomimetic inhibitors of viral protease are described in which the amino acid sequence of a natural substrate is modified by a functional group (aldehyde, α -ketoamide or Michael acceptors) to allow covalent binding with the enzyme active site. This further stabilizes the complex of inhibitor and protease, resulting in inhibition of the enzyme or replication of the virus. Comparison of the crystal structures of the complex of peptidomimetic inhibitors and SARS-CoV-2 3CLpro and evaluation of their inhibitory activity revealed that peptidomimetics with inserted α -ketoamide group are the most efficient.

Keywords: crystal structure, peptidomimetic inhibitors, SARS-CoV-2 3CLpro

Thesis contains: 26 pages, 17 figures, 5 tables, 19 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Lidija Barišić, PhD

Defence date: September 16th, 2021.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Teorijski dio.....	2
2.1. Peptidomimetici.....	2
2.2. SARS-CoV-2.....	4
2.2.1. Općenito.....	4
2.2.2. Struktura.....	5
2.3. Virusna proteaza SARS-CoV-2 3CLpro.....	6
2.3.1. Mehanizam hidrolize peptidne veze.....	7
2.4. Inhibicija SARS-CoV-2 3CLpro.....	8
2.4.1. Inhibitori tipa I	8
2.4.2. Inhibitori tipa II	12
2.4.3. Inhibitori tipa III	19
2.4.4. Usporedba inhibitora 11a , 13b , 14b i N3	21
3. Zaključak.....	24
4. Literatura.....	25

1. Uvod

U proteklih 21 mjesec od pojave, virus SARS-CoV-2 proširio se na sve kontinente uzrokujući neviđene društvene i ekonomske posljedice. U trenutku pojave virusa nije postojao lijek za bolest COVID-19 čiji je uzročnik, pa su znanstvenici diljem svijeta započeli istraživati njegovu strukturu, način ulaska u stanice domaćina te mehanizme replikacije.

Intenzivna istraživanja su, između ostaloga, ukazala i na ulogu virusne proteaze SARS-CoV-2 3CLpro u njegovoj replikaciji. Pokazalo se da virusni S-protein ulazi u interakcije s angiotenzin-II pretvarajućim receptorom koji se nalazi na površini stanica domaćina. Njihova interakcija omogućuje prodor virusa u stanicu, a posljedično i njegovu replikaciju. Nakon translacije virusnog genoma na ribosomima stanice domaćina, nastali polipeptid se uz sudjelovanje virusne proteaze SARS-CoV-2 3CLpro cijepa na manje peptide koji će tvoriti nove virione. Inhibicijom tog enzima onemogućila bi se replikacija virusa, a time i zaraza. Peptidomimetici, čiji farmakoforni fragmenti oponašaju prirodne peptidne supstrate virusne proteaze, pokazali su se potentnim inhibitorima tog enzima.

U ovom radu opisan će se rezultat recentnih istraživanja provedenih u svrhu dizajniranja i optimiziranja strukture peptidomimetičkih inhibitora SARS-CoV-2 3CLpro, a koji ukazuju na mogućnost njihove primjene u antiviralnoj terapiji.

2. Teorijski dio

2.1. Peptidomimetici

Proteini, makromolekule građene iz 20 različitih aminokiselina, nalaze se u svim stanicama te su nužni za normalne funkcije stanice poput enzimske katalize, mehaničke potpore, diferencijacije, zaštite imuniteta, kontrole rasta, prijenosa živčanih impulsa itd. Aminokiseline se međusobno povezuju planarnom i rigidnom peptidnom vezom, a nabiranje peptida omogućeno je rotacijama oko jednostrukih veza u molekuli. Nabiranje omogućuje proteinima zauzimanje native konformacije u kojoj su biološki aktivni. Zahvaljujući slobodnoj rotaciji i posljedičnoj konformacijskoj fleksibilnosti, oni mogu zauzimati brojne konformacije i na taj način ulaziti u interakcije s različitim neželjenim receptorima što može dovesti do nuspojava prilikom njihove terapijske primjene. Osim toga, peptidi imaju kratko vrijeme poluživota, a oni koji se primjenjuju oralno brzo se hidroliziraju u probavnom sustavu (Barišić, 2018). Potreba za oponašateljima ili mimeticima peptida koji će se odlikovati visokom konformacijskom i proteolitičkom stabilnošću dovela je do intenzivnog razvoja područja peptidomimetika.

Postoje dvije opće prihvaćene definicije peptidomimetika:

- (i) Peptidomimetik je spoj koji kao ligand može oponašati ili inhibirati biološki učinak peptidnog receptora.
- (ii) Peptidomimetik je spoj čiji esencijalni farmakoforni elementi oponašaju 3D-strukturu prirodnog peptida i proteina zadržavajući tako ne samo njegovu sposobnost interakcije s biološkim sustavima već i jednak ili čak poboljšani biološki učinak (Gante, 1994).

Drugim riječima, radi se o spojevima čija 3D-struktura oponaša glavni lanac ili bočni ogranak prirodnog peptida ili oboje, a ujedno su dizajnirani tako da nadvladaju nedostatke prirodnih peptida poput slabe selektivnosti prema receptorima, proteolitičke nestabilnosti, slabe biorasploživosti itd.

Dizajn peptidomimetičkih lijekova bazira se na strukturnoj modifikaciji prirodnih peptida: zamjeni prirodne L-aminokiseline s D-aminokiselinom, umetanju neprirodnih aminokiselina u peptidnu okosnicu te ciklizaciji dijelova okosnice i/ili bočnih ogranaka.

U tablici 1 navedeni su neki od peptidomimetičkih lijekova, glavni pristup u dizajnu i pripravi te bolesti koja se njime liječi ili svojstvo koje je poboljšano modifikacijom strukture prirodnog peptida.

U tablici 2 navedeni su najprodavaniji peptidomimetički lijekovi u 2015. godini, njihova komercijalna imena te bolesti za čije se liječenje koriste.

Tablica 1. Peptidomimetički lijekovi, glavni pristup u dizajnu te bolesti koju liječi ili poboljšano svojstvo u odnosu na prirodni peptid (Barišić, 2018).

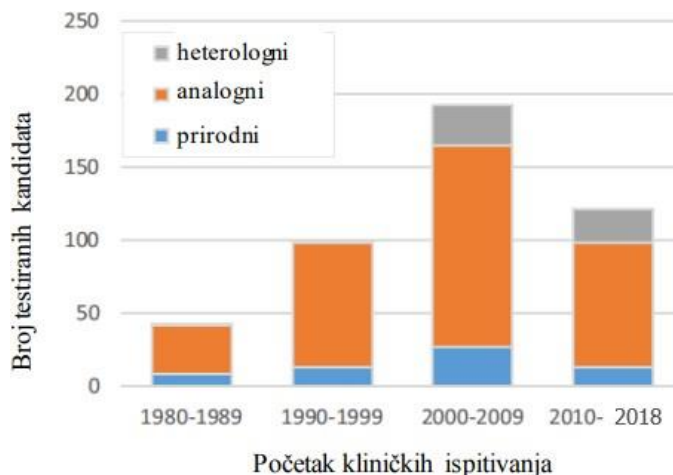
Peptidomimetički lijek	Dizajn lijeka	Bolest koju peptidomimetik liječi/ poboljšano svojstvo
Dezmopresin	Zamjena L- s D-aminokiselinom	Povećana antidiuretska aktivnost
Afamelanoid	Zamjena L- s D-aminokiselinom	Liječenje eritropoetske protoporfirije
Karbetocin	Ugradnja neprirodne aminokiseline u okosnicu peptida	Povećana metabolička aktivnost
Zikonotid	Ciklizacija	Analgetik

Tablica 2. Peptidomimetički lijekovi najprodavaniji u 2015., njihova komercijalna imena i bolesti kod kojih se primjenjuju (Barišić, 2018).

Peptidomimetički lijek	Komercijalno ime	Bolest kod koje se primjenjuje
Glatiramer	Copaxone	Multipla skleroza
Liraglutid	Victoza, Saxenda	Dijabetes tipa 2
Egzenatid CR	Byduron	Dijabetes tipa 2
Oktreotid	Sandostatin	Akromegalija
Lanreotid	SomatulinTM	Akromegalija
Paireotid	Signifor	Akromegalija
Leuprorelin-acetat	Lupron depot	Karcinom prostate
Goserelin	Zoladex	Karcinom prostate
Teriparatid	Forteo	Osteoporoza
Rimiplostim	Nplate	Trombocitopenija

Peptidni lijekovi dijele se u 3 skupine: prirodni peptidi, peptidni analozi i peptidni heterolozi. Prirodni peptidi kao lijekovi imaju istu sekvenciju aminokiselina kao i primarni peptid. Analozi ili mimetici jesu lijekovi koji su dobiveni kemijskom sintezom i rekombinantnom ekspresijom.

Cilj njihovog dobivanja su unaprijeđena svojstva lijeka koja su u prirodnom peptidu ograničena ili nepovoljna. Heterologni peptidi izvedeni su iz drugih živih organizama. Na slici 1 prikazan je broj testiranih peptidnih lijekova u razdoblju od 1980. do 2018., pri čemu je vidljivoda je udio analognih peptidnih lijekova, odnosno peptidomimetika, najveći.



Slika 1. Prikaz udjela analognih peptidnih lijekova u kliničkim ispitivanjima (Barišić, 2018).

2.2. SARS-CoV-2

2.2.1. Općenito

Virusi su čestice na granici živog i neživog. Karakterizira ih to da nemaju stanice, metabolizam te ne reagiraju na vanjske podražaje, ali se mogu razmnožavati za što im treba stanica domaćin.

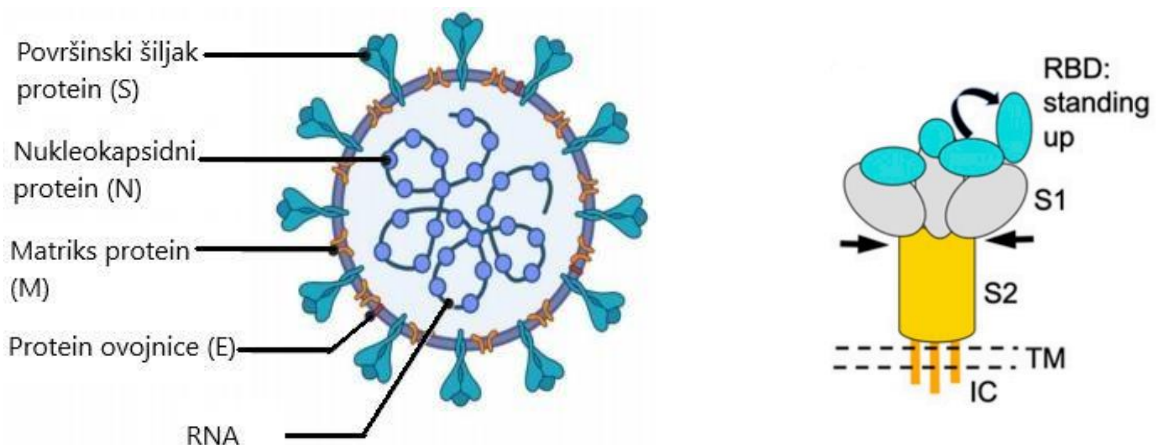
COVID-19 (Corona Virus Disease 2019) ili bolest uzrokovana koronavirusom SARS-CoV-2 prvi puta zabilježena je u prosincu 2019. godine u Wuhanu u Kini. Uzročnik ove bolesti je virus SARS-CoV-2 koji spada u skupinu koronavirusa. Pripada istoj obitelji virusa kao i virus uzročnik teškog akutnog respiratornog sindroma (SARS-CoV, 2003.) te virus uzročnik bliskoistočnog respiratornog sindroma (MERS-CoV, 2012.), a Svjetska zdravstvena organizacija (WHO) imenovala ga je 11. veljače 2020. koronavirus SARS-CoV-2 (Machhi i sur., 2020).

Ubrzo nakon otkrića prvih slučajeva zaraze, utvrđeno je da genom novoga virusa SARS-CoV-2 ima 96% sličnosti s genomom koronavirusa kojeg prenosi šišmiš te da pripada skupini SARS-CoV prema podudarnosti genoma od 79,6%. Početni domaćini virusa bili su šišmiši, ptice i štakori, a prijenos bolesti potaknut je uništavanjem staništa, klimatskim promjenama te krivolovom kako bi se divlje životinje koristile za tradicionalnu medicinu ili hranu. U ožujku 2020. godine WHO je proglasio stanje pandemije te su zemlje diljem svijeta počele primjenjivati strategije sprečavanja infekcije, uključujući fizičku distancu, nošenje maski te potpuno zatvaranje (Machhi i sur., 2020).

2.2.2. Struktura

Koronavirusi imaju najveći poznati RNA genom u usporedbi s drugim virusima. Njihova ribonukleinska kiselina je nesegmentirana, jednolančana pozitivna molekula. Genom kodira nukleokapsidni protein (N), mali protein ovojnice (E), matriks protein (M) i površinski šiljak protein (S). N-, M- i E-proteini značajni su za samu građu virusa, dok S-proteini imaju glavnu ulogu prilikom ulaska virusa u stanicu domaćina uspostavljanjem interakcija s receptorima na površini membrane (Baig i sur., 2020). Struktura virusa prikazana je na slici 2.

S-protein je fuzijski protein što znači da se pomoću njega virus veže za stanicu domaćina i na taj način pokušava prodrijeti u nju. Taj protein je glikozidni membranski protein tipa I usidren u virusnoj membrani, a sastoji se iz dvije regije, S1 i S2. S1 fragment veže receptor, a S2 ima ulogu pri fuziji membrane virusa i stanice domaćina (Cai i sur., 2021). S1 fragment sadrži receptor-vezujuću domenu (receptor-binding domain, RBD). Ta je domena odgovorna za prepoznavanje strukture na površini stanice domaćina na koju se virus može vezati. RBD može poprimiti dva položaja, uspravni i vodoravni. Kada se nalazi u uspravnom položaju, domena je pripremljena za vezanje receptora, a kada se nalazi u vodoravnom položaju ona je spremna izazvati imunosnu reakciju stanice domaćina (slika 2). Promjena položaja RBD domene odvija se promjenom konformacije same domene (Shang i sur., 2020).



Slika 2. Shematski prikaz virusa SARS-CoV-2 [lijevo] (preuzeto i prilagođeno iz Biophysical Society, BPS Blog, Coronavirus Structure, Vaccine and Therapy Development, <https://www.biophysics.org/blog/coronavirus-structure-vaccine-and-therapy-development>), shematski prikaz strukture S-proteina [desno, (Shang i sur., 2020)].

Angiotenzin-II pretvorbeni enzim (ACE2) je membranski protein tipa I koji se nalazi u plućima, srcu, bubrezima i crijevima. Sastoji se od *N*- i *C*-terminalne domene (Yan i sur., 2020). Glavni je receptor za ulazak i infekciju koronavirusom. Virus SARS-CoV-2 koristi svoju *C*-terminalnu domenu iz S proteina za vezanje za ACE2 receptor (Tang i sur., 2020). Kako bi moglo doći do fuzije membrana virusa i stanice domaćina, površinski šiljak protein treba biti proteolitički aktiviran na granici S1 i S2 fragmenta. Pritom se S1 podjedinica odvaja, a S2 podjedinica prolazi kroz strukturne promjene (Shang i sur., 2020). Nakon ulaska u stanicu, virus raspakirava svoju proteinsku kapsidu i oslobađa jednolančanu RNA koja se na ribosomima domaćina počinje translatirati kao glasnička RNA.

2.3. Virusna proteaza SARS-CoV-2 3CLpro

Kimotripsinu slična proteaza ili glavna proteaza (Mpro ili Lpro) virusni je regulacijski protein. Ne postoji ljudski homolog ove proteaze i zato je ona, uz svoju bitnu ulogu kod replikacije SARS-CoV-2, dobra meta pri istraživanju antiviralnih terapeutika.

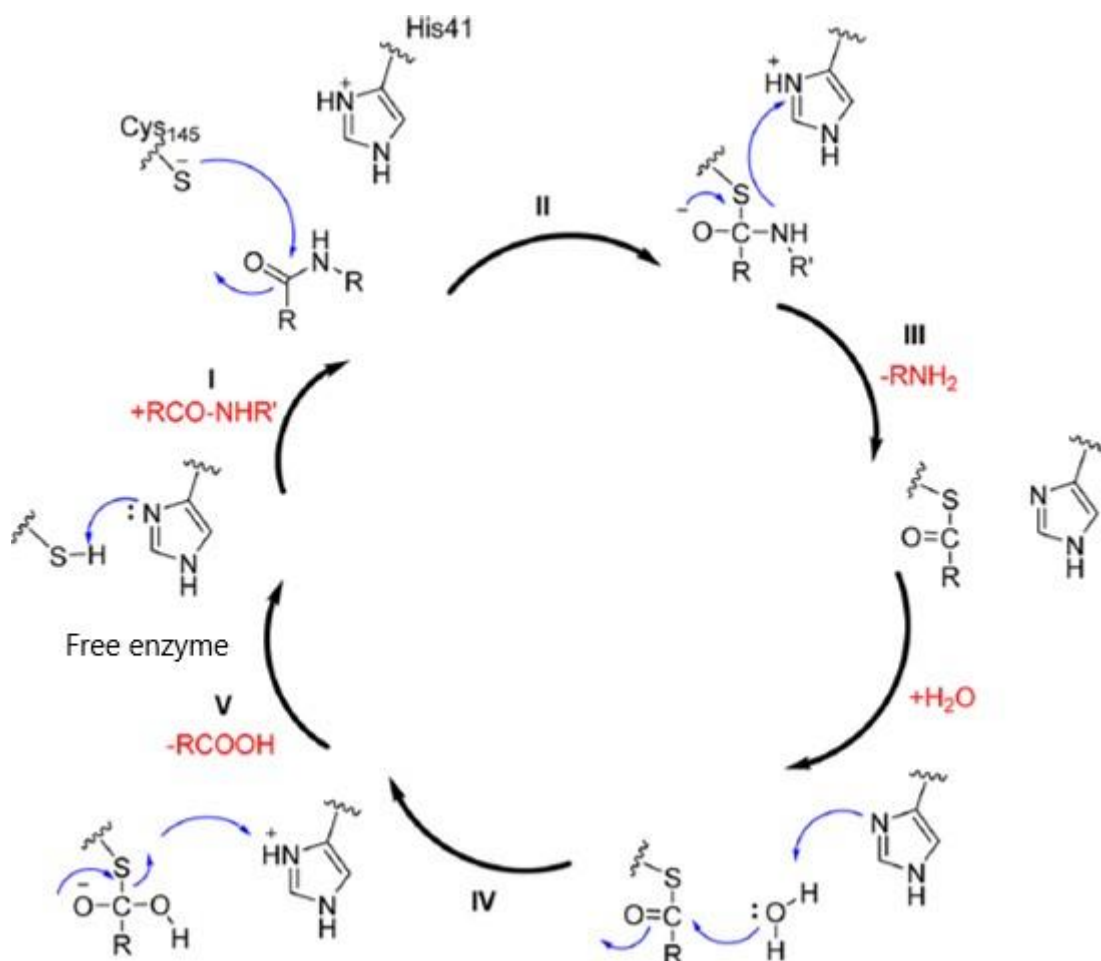
Aktivni 3CLpro je homodimer koji sadržava dva protomera. Svaki protomer čine tri domene. Šest antiparalelnih β -ploča tvori domene I i II te se na njima nalazi mjesto vezanja supstrata. Aktivno mjesto sastoji se od četiri dijela: S', S1, S2 i S4. Domena III je globularna skupina od pet α -uzvojnica koja regulira dimerizaciju proteina. Ostaci koji tvore određene domene su sljedeći: ostaci 8-101 tvore I domenu, ostaci 102-184 čine II domenu dok III domenu formiraju ostaci 201-303 (Grottesi i sur., 2020).

Ostaci od 185-200 formiraju dugu petlju pomoću koje su spojene domene II i III. U samom dimeru uspostavlja se niz intermolekulskih interakcija između dva protomera poput vodikovih veza između *N*-kraja prvog protomera i domene II drugog protomera. Ta domena II sudjeluje u oblikovanju S1 aktivnog mjesta, odnosno mjesta na koje se veže supstrat. Iz toga se može zaključiti da je dimer katalitički aktivna, a monomer neaktivna molekula (Grottesi i sur., 2020).

Aminokiseline u supstratima u smjeru *N*-kraja prema *C*-kraju označavaju se kao P1-P4 i P1'-P3'. Mjesto cijepanja nalazi se između P1 i P1', a nužna je prisutnost Gln u poziciji P1 supstrata. Komplementarne regije na SARS-CoV-2 3CLpro se označavaju kao S1-S4. 3CLpro je specifičan za supstrate koji imaju Leu ili Met na P2 te Ser, Ala ili Asn na P1'. S1 podjedinica enzima sastavljena je od nekoliko hidrofilnih ostataka i to Ser144, His163, Glu166 i His172, što rezultira snažnom preferencijom za vezanje supstrata s hidrofilnim P1 ostacima. Ostaci P2 podjedinice smješteni su u hidrofobnoj šupljini okruženoj s Met49, Cys44 i većinski nepolarnim ostacima na položajima 187-189 u okosnici enzima. Ostaci P3 podjedinice tvore vodikove veze s Glu166 iz okosnice enzima (Jaskolski i sur., 2021).

2.3.1. Mehanizam hidrolize peptidne veze

U aktivnom mjestu SARS-CoV-2 3CLpro nalaze se ključni ostaci Cys145 i His41. Tiolna skupina iz Cys ima ulogu nukleofila u reakciji hidrolize nastalog poliproteina. U prisutnosti His41 koji ima ulogu baze, Cys-tiolna skupina se deprotonira generirajući nukleofilni sumporov anion, a N-atom iz imidazolne skupine se protonira. Sumporov anion kao nukleofil napada elektrofilni C-atom iz karbonilne amidne skupine poliproteina tvoreći kovalentnu vezu S–C u nastalom alkoksidnom kompleksu. Rezonancijskom delokalizacijom neveznih elektrona s alkoksidnog O-atoma u π -vezu sa susjednim C-atomom dolazi do cijepanja veze C–N. Pri tom nastaje tioester, u kojem je proteinski supstrat vezan za proteolitički enzim, a N-atom akceptira proton iz protoniranog imidazola tvoreći slobodni amin. Voda se u prisutnosti imidazolne skupine deprotonira, a nastali hidroksidni ion kao jaki nukleofil uzrokuje hidrolizu tioestera u karboksilnu kiselinu (pri tom se cijepa veza S–C, odnosno veza između proteinskog supstrata i enzima!). Pri tom se regeneriraju Cys-tiolna skupina i His-imidazolna skupina što znači da je enzim regeneriran i može ući u novi ciklus hidrolitičke reakcije (slika 3).



Slika 3. Mehanizam hidrolize poliproteina djelovanjem SARS-CoV-2 3CLpro (Barišić, 2020).

2.4. Inhibicija SARS-CoV-2 3CLpro

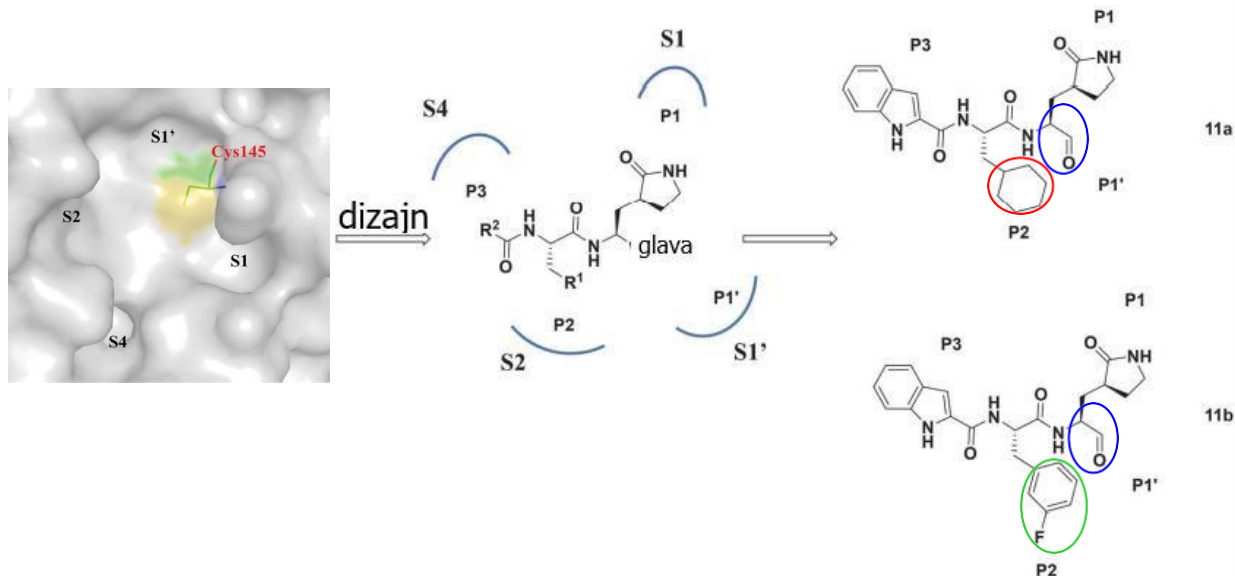
Pri dizajniranju peptidomimetika, aminokiseline iz supstrata koje se vežu na aktivno mjesto proteaze zamjenjuju se „kemijskim streljivom“, odnosno funkcijskom skupinom koja cilja opisani katalitički mehanizam. Drugim riječima, peptidomimetik ima istu sekvenciju kao i prirodni peptid osim u onom dijelu koji je strukturno modificiran tako da se s većim afinitetom veže u aktivno mjesto enzima. Pri tom se najprije tvori nekovalentni kompleks enzima i peptidomimetika kako bi se „kemijsko streljivo“ našlo u blizini katalitičkog mjesta enzima, a nakon toga dolazi do nukleofilnog napada Cys-ostatka i tvorbe kovalentne veze. Ulogu kemijskog streljiva imaju različite funkcijske skupine poput Michaelovih akceptora, aldehida, epoksi-ketona, itd. (Barišić, 2020).

U ovom radu opisana su tri tipa peptidomimetičkih inhibitora koja se razlikuju prema vrsti funkcijske skupine koja ima ulogu kemijskog streljiva. Inhibitori tipa **I** imaju aldehidnu skupinu, inhibitori tipa **II** α -ketoamidnu skupinu, dok inhibitori tipa **III** sadrže Michaelove akceptore.

2.4.1. Inhibitori tipa I

Dai i suradnici (2020) proveli su istraživanje u kojem su dizajnirali i sintetizirali dvije komponente, odnosno dva inhibitora SARS-CoV-2 3CL proteaze. Analizirali su aminokiselinske ostatke u aktivnom mjestu proteaze na koje se veže supstrat te su dizajnirali odgovarajuće vezne skupine na inhibitorima tako da se s većim afinitetom vežu za enzim. Inhibitore su označili kao **11a** i **11b**, a njihova struktura prikazana je na slici 4 i u tablici 3.

Glavna proteaza SARS-CoV-2 na S1' poziciji sadrži Cys čija tiolna skupina ima važnu ulogu prilikom kovalentnog vezanja inhibitora čime se održava antiviralna aktivnost. Kao skupinu koja će se kovalentno vezati na Cys, što znači da ta skupina ima ulogu kemijskog streljiva, odabrali su **aldehidnu skupinu** iz inhibitora. Na P1 mjesto inhibitora uveli su (S)- γ -laktamski prsten koji je svojim oblikom i veličinom komplementaran mjestu S1 iz virusne proteaze te se očekuje da će doprinijeti inhibitornoj aktivnosti. Analizom S2 pozicije u 3CLpro, otkriveno je da je dovoljno velika da se u nju može smjestiti veći P2 fragment iz inhibitora. Kako bi ispitali ulogu različitih cikličkih sustava, autori su uveli **cikloheksilnu** odnosno **3-fluorofenilnu** skupinu u inhibitore **11a** i **11b**. Pri tom su očekivali da će prisutnost fluora pojačati aktivnost pripadajućeg inhibitora **11b**. Nadalje, na P3 položaj uveli su indolnu skupinu (šesteročlani benzenski prsten povezan s peteročlanim pirolnim prstenom) kako bi se omogućila tvorba dodatnih vodikovih veza s ostacima u S4 fragmentu proteaze i poboljšala svojstva lijeka. U tablici 3 sažeto su prikazane organske skupine na položajima P1', P1, P2 i P3 u inhibitorima **11a** i **11b** odgovorne za njihovu antiviralnu aktivnost.

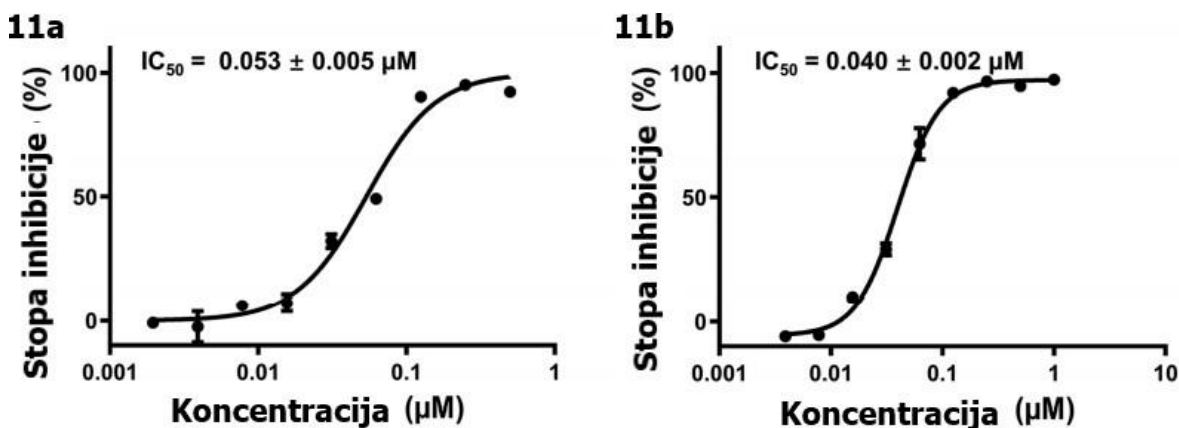


Slika 4. Površinski prikaz aktivnog mjesta 3CLpro, strategija dizajniranja inhibitora i kemijske strukture aldehydskih inhibitora **11a** i **11b** (aldehydna skupina označena plavo) (Dai i sur., 2020).

Tablica 3. Organske skupine na položajima P1', P1, P2 i P3 u inhibitorima **11a** i **11b** odgovorne za njihovu antiviralnu aktivnost.

Položaj u inhibitoru	Skupine iz inhibitora koje sudjeluju u vezanju s virusnom proteazom	
	Inhibitor 11a	Inhibitor 11b
P1'	aldehyd	aldehyd
P1	(S)- γ -laktamski prsten	(S)- γ -laktamski prsten
P2	cikloheksilna skupina	3-fluorofenilna skupina
P3	indol	indol

Peptidomimetici **11a** i **11b** pokazali su visoku inhibitornu aktivnost koja pri koncentraciji od 1 μM iznosi 100% za **11a**, odnosno 96% za **11b**. Mjerenjem IC_{50} -vrijednosti (koncentracija inhibitora koja uzrokuje 50%-tnu inhibiciju), koja je direktno proporcionalna afinitetu vezanja inhibitora, utvrđen je izvrstan inhibitorni potencijal ($\text{IC}_{50}=0,053 \pm 0,005 \mu\text{M}$ za **11a** te $\text{IC}_{50}=0,040 \pm 0,002 \mu\text{M}$ za **11b**) (slika 5).

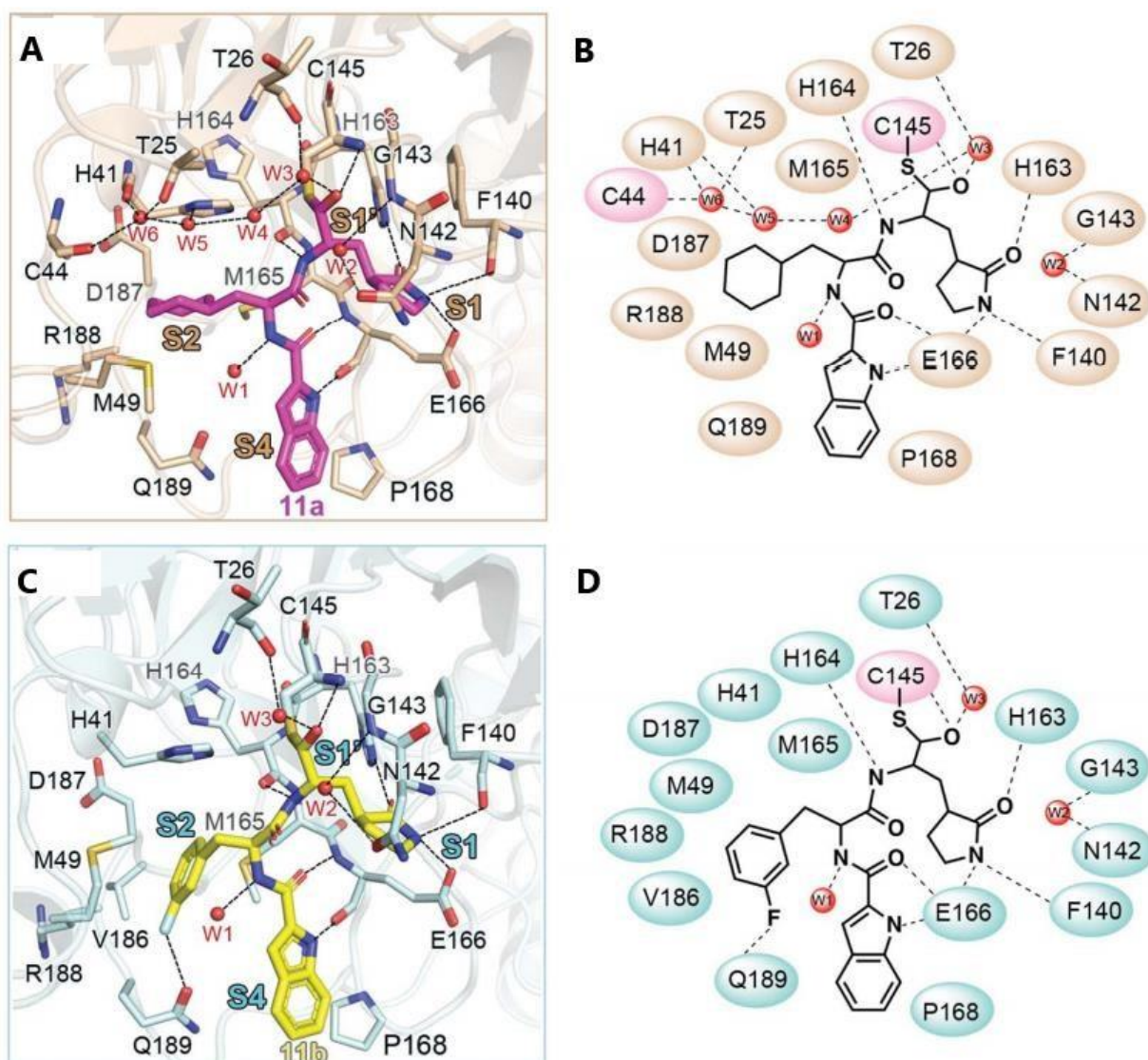


Slika 5. Prikaz ovisnosti stope inhibicije (%) o koncentraciji inhibitora (μM) **11a** i **11b** te njihove IC_{50} -vrijednosti (Dai i sur., 2020).

Mapa elektronske gustoće pokazala je da inhibitor **11a** nakon vezanja u vezno mjesto 3CLpro zauzima izduljenu konformaciju. C-atom iz alhidne skupine vezan je za S-atom iz Cys145 kovalentnom vezom. O-atom iz te alhidne skupine tvori vodikovu vezu s okosnicom iz cisteinskog ostatka. Ova veza bitna je pri stabilizaciji konformacije inhibitora. (S)- γ -laktamski prsten svojom veličinom i oblikom dobro odgovara S1-položaju inhibitora. Kisik iz ovog prstena vezan je vodikovom vezom za bočni ogranak His163, dok je NH-skupina vezana za okosnicu iz Phe140 i Glu166. Obje veze doprinose stabilizaciji (S)- γ -laktamskog prstena. His164 i Glu166 tvore vodikove veze i s atomima koji su povezani amidnim vezama u inhibitoru. Cikloheksilna skupina nalazi se duboko u S2-džepu tvoreći veze s imidazolnim prstenom iz His41. Osim toga, okružuju ga ostaci Met49, Tyr54, Met165, Asp187 i Arg188 s kojima ulazi u hidrofobne interakcije. Kako se indolna skupina iz inhibitora nalazi na samom kraju molekule, izložena je otapalu. Stabilizira se tvoreći vodikovu vezu s Glu166 te hidrofobne interakcije s bočnim ograncima iz Pro168 i Gln189. Molekule vode W1-W6 također doprinose stabilizaciji inhibitora **11a**. W1 tvori vodikove veze s atomima iz amidne skupine inhibitora. Molekule vode W2-W6 sudjeluju u brojnim vodikovim vezama s alhidnom skupinom iz **11a** i bočnim ograncima proteaze i na taj način dodatno stabiliziraju inhibitor u aktivnom mjestu virusne proteaze.

Kristalne strukture kompleksa 3CLpro i inhibitora **11b** odnosno 3CLpro i inhibitora **11a** su slične. Razlika u interakcijama i jačini vezanja **11b** za proteazu proizlazi iz prisutnosti 3-fluorofenilne skupine na položaju P2. Ta skupina uzrokuje rotaciju dijela inhibitora prema dolje. Arilna skupina pri tom uspostavlja vodikove veze s bočnim ograncima His41, Met49, Met165, Val186, Asp187 i Arg188, a sama 3-fluorofenilna skupina uspostavlja vodikovu vezu s Gln189 čime se kompleks inhibitora **11b** i virusne proteaze dodatno stabilizira (slika 6).

Kako bi dodatno potkrijepili pozitivne rezultate inhibicije, autori rada testirali su moć inhibicije virusa *in vitro*. Oba inhibitora pokazala su dobru antiviralnu aktivnost pri EC_{50} (polovina maksimalne efektivne koncentracije) vrijednostima $0,53 \pm 0,01 \mu\text{M}$ za **11a** i $0,72 \pm 0,09 \mu\text{M}$ za **11b**. Prema izmjerenim CC_{50} -vrijednostima (pola citotoksične koncentracije) višim od $100 \mu\text{M}$, testirani inhibitori nisu izazvali citotoksični učinak. Uz to, koristili su i imunofluorescentnu ikvantitativnu lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) kojom je potvrđena učinkovita antiviralna aktivnost inhibitora **11a** i **11b**.



Slika 6. (A) Prikaz veza između **11a** i aktivnog mjesta 3CLpro. (B) Shematski prikaz veza kompleksa 3CLpro-**11a**. (C) Prikaz veza između **11b** i aktivnog mjesta 3CLpro. (D) Shematski prikaz kompleksa 3CLpro-**11b** (Dai i sur., 2020).

Nadalje, ispitivana su i farmakokinetička svojstva opisanih inhibitora s ciljem utvrđivanja mogućeg terapijskog učinka. Peptidomimetičkim inhibitorima **11a** i **11b** tretirani su miševi, intraperitonealno i intravenozno. Dulje poluvrijeme života i bioraspoloživost utvrđeni su nakon intraperitonealne primjene; inhibitor **11a**: vrijeme poluživota 4,27 sati, bioraspoloživost 87,8%, inhibitor **11b**: vrijeme poluživota 5,21 sat, bioraspoloživost 80%.

Inhibitor **11a** dalje je istraživana u *in vivo* studiji na SD štakorima i psima beagle pasmine. Po primitku doze od 40 mg/kg intravenozno, ni jedan štakor nije uginuo. Povećanje doze na 60 mg/kg usmrtilo je jednog od četiri štakora. Usprkos tome, nije uočena akutna toksičnost kod tretiranih životinja. Dobiveni rezultati pokazuju da oba sintetizirana inhibitora imaju dobru antiviralnu aktivnost i farmakokinetička svojstva. Potrebna su daljnja ispitivanja moguće terapijske primjene spojeva **11a** i **11b** u liječenje bolesti uzrokovane SARS-CoV-2 virusom.

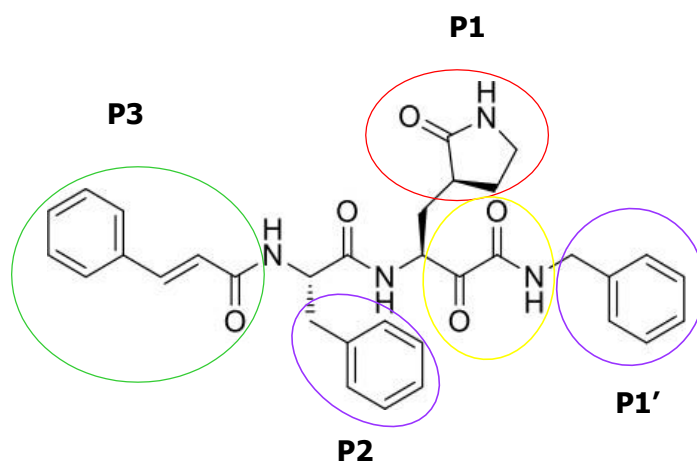
2.4.2. Inhibitori tipa II

Zhang i suradnici (2020a) dizajnirali su nekoliko peptidomimetičkih inhibitora proteaza alfa-koronavirusa, betakoronavirusa i enterovirusa na bazi α -ketoamida te su proučavali ovisnost aktivnosti inhibitora u odnosu na njihovu strukturu na temelju razlika u P2 položaju inhibitora.

Sve proučavane proteaze cijepaju peptidnu vezu u kojoj sudjeluje glutaminski ostatak s položaja P1, pa su autori istraživanja odlučili na tu poziciju u svim inhibitorima uvesti γ -laktamski peteročlani prsten kao derivat glutamina. Prema očekivanjima, pokazalo se da taj prsten dobro oponaša enzimski supstrat glutamin i tako povećava inhibitornu moć do 10 puta. Preostalo je dizajnirati i optimizirati supstituente na položajima P1', P2 i P3.

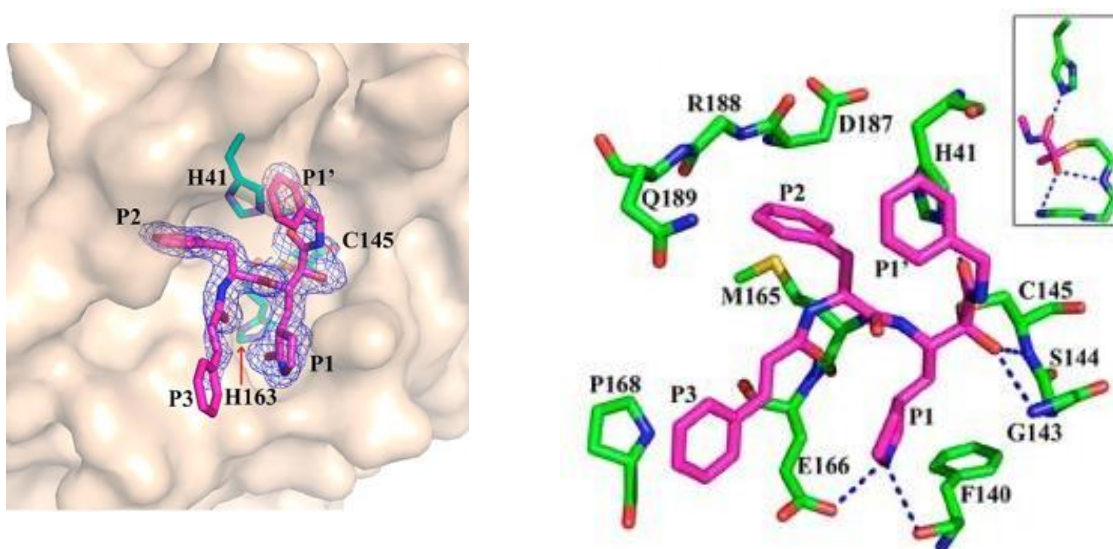
Započelo se s ketoamidnim inhibitorom **11a**, a koji sadrži aromatsku **cinamoilnu zaštitnu skupinu** na N-terminusu u položaju P3, **benzilne skupine** na položajima P2 i P1' te **glutaminski laktam** na položaju P1 (slika 7).

Analizom je utvrđena srednja do dobra antiviralna aktivnost prema rekombinantnoj SARS-CoV-2 3CL_{pro} s $IC_{50}=1,95 \mu M$. U staničnim kulturama zaraženima koronavirusom, inhibitor **11a** također ima dobru do srednju aktivnost s $EC_{50}=5,8 \mu M$. Osim u stanicama zaraženim koronavirusom, aktivnost su ispitivali i u stanicama zaraženim enterovirusom, a ni u jednoj od njih nije uočena toksičnost inhibitora.



Slika 7. Kemijska struktura ketoamidnog inhibitora **11a** (ketoamidna skupina označena žuto) (Zhang i sur., 2020a)

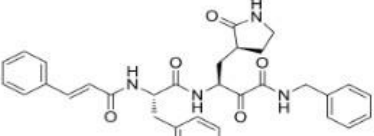
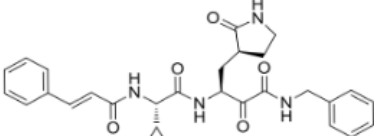
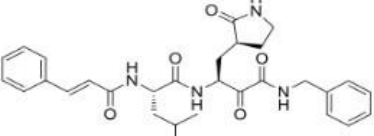
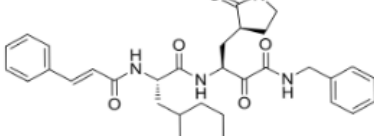
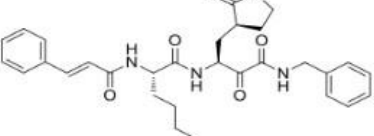
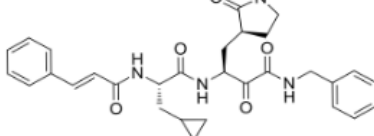
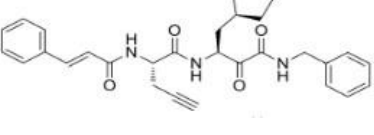
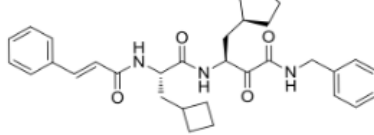
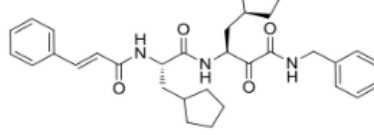
Na slici 8 prikazan je kompleks virusne proteaze SARS-CoV-2 3CLpro i inhibitora **11a**. $C\alpha$ -atom iz ketoamidne skupine kovalentno je vezan s Cys-ostacima 145, 144 i 147 u aktivnom mjestu enzima, pri čemu rezultira tiohemiacetal. Njegov O-atom uspostavlja vodikove veze s Gly143 i Cys145 iz oksianionske šupljine u aktivnom mjestu enzima i pri tom poprima R-konfiguraciju.



Slika 8. Prikaz pristajanja kompleksa SARS-CoV-2 3CLpro i inhibitora **11a** (*lijevo*, inhibitor je prikazan štapićastim modelom u magenta boji) te detaljan prikaz interakcija uspostavljenih između **11a** i enzima (*desno*, vodikove veze označene su crtkanim plavim linijama) (Zhang i sur., 2020a).

Kristalografska analiza pokazala je da bi se moglo poboljšati pristajanje P1' benzilne skupine iz **11a** u S1'-džep iz enzima kao i P3 cinamoilne skupine u enzimski S3 položaj. Stoga je pripravljena serija derivata inhibitora **11a** strukturno modificiranih na spomenutim položajima kako bi se poboljšalo pristajanje inhibitora u vezno mjesto proteaze i povećala inhibitorna aktivnost. Međutim, strukturne modifikacije P1' i P3 skupina nisu rezultirale povećanom antiviralnom aktivnošću u odnosu na roditeljski inhibitor **11a**, zbog čega je u daljnjim istraživanjima zadržan početni dizajn baziran na P1' benzilnoj i P3 cinamoilnoj skupini, a strukturne modifikacije provedene su na položaju P2 skupine iz inhibitora pri čemu su rezultirali peptidomimeticima **11m-11u** (tablica 4).

Tablica 4. Prikaz kemijskih struktura inhibitora **11m-11u** i pripadajuće IC₅₀-vrijednosti (μM) (Zhang i sur., 2020a).

Broj spoja	Kemijska struktura	IC ₅₀	Broj spoja	Kemijska struktura	IC ₅₀
11m		>50	11q		6.27 ± 2.87
11n		0.33 ± 0.04	11r		0.71 ± 0.36
11o		8.50 ± 3.71	11s		0.24 ± 0.08
11p		10.68 ± 7.34	11t		1.44 ± 0.40
			11u		1.27 ± 0.34

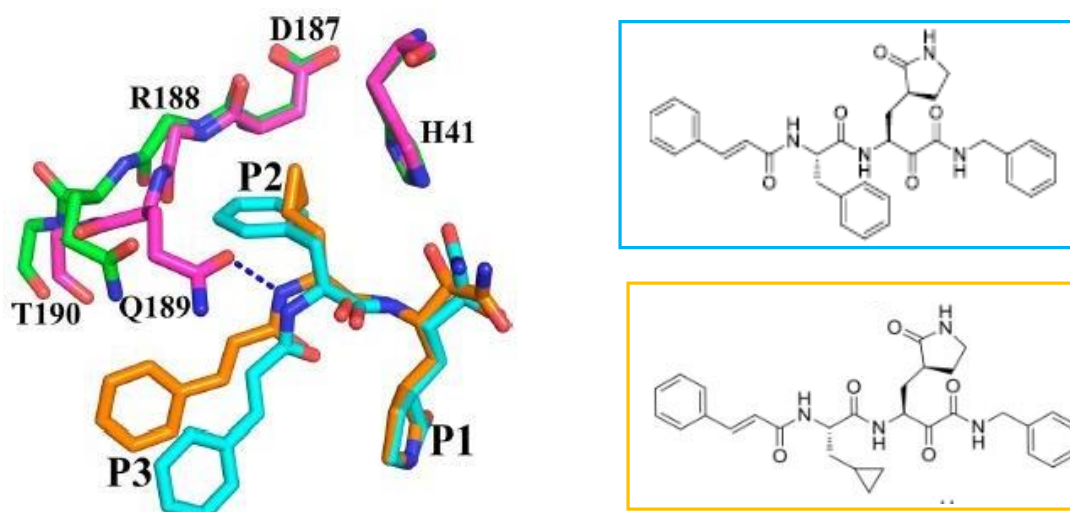
Spoj **11m** koji u P2 položaju sadrži 4-fluorobenzilnu skupinu pokazao se inaktivnim, vjerojatno zbog inkompatibilnosti sa S2 položajem u aktivnom mjestu proteaze, u kojem dolazi

do odbijanja karbonilnih skupina iz ostataka 186 i 188 s F-atomom. Kako se pokazalo da je P2 benzilna skupina iz **11a** prevelika za pristajanje u S2 džep, u derivatu **11n** supstituirana je s manjom izobutilnom skupinom koja lakše prijanja u S2 mjesto proteaze uspostavljajući hidrofobne interakcije s Met49 i Met165, što rezultira poboljšanom anti-SARS-CoV-2 aktivnošću. Nadalje, utjecaj veličine P2 skupine na vezanje s enzimom ispitan je zamjenom razgranate P2-izobutilne skupine iz **11a** s nerazgranatom *n*-butilnom skupinom u spoju **11o** što je rezultiralo smanjenjem antiviralne aktivnosti. Stoga je dulji P2-lanac iz **11o** zamijenjen s kraćom propargilnom skupinom u spoju **11p** koji se odlikuje tek osrednjom antiviralnom aktivnošću. Spoj **11q**, pripravljen uvođenjem ciklopropilne skupine na P2-položaj, pokazao se aktivnijim u odnosu na **11o** i **11p**. Na temelju dobivenih rezultata zaključeno je da P2-bočni lanac mora sadržavati metilensku skupinu na β -položaju kako bi se osigurala fleksibilnost potrebna za njegovo umetanje u S2-džep SARS-CoV-2 3CLpro.

U nastavku istraživanja, autori su modificirali veličinu prstena na P2-položaju kao i fleksibilnost P2-supstituenta kako bi poboljšali vezanje inhibitora s enzimom. Fleksibilnost referentnog inhibitora **11a** povećana je redukcijom njegovog fenilnog prstena što je omogućilo značajno povećanje antiviralne aktivnosti tako dobivenog cikloheksilmetilnog derivata **11r**. U derivatima **11s-11u** sistematski je smanjivana veličina P2-prstena. Derivat **11s** s ciklopropilmetilnom skupinom na P2-položaju pokazao je najvišu antiviralnu aktivnost u odnosu na prethodno opisane derivate ($IC_{50}=0,24 \mu M$). Kristalografska analiza kompleksa **11s** i SARS-CoV-2 3CLpro pokazala je da je ciklopropilmetilna skupina duboko ukopana u S2-vezno mjesto enzima gdje uspostavlja hidrofobne interakcije s Met49, Met165 i $C\beta$ -atomom iz Asp187. Iako je P2-supstituent male veličine, S2-džep dovoljno je fleksibilan da se može saviti što omogućava bočnom ogranku iz Gln189 da akceptira vodikovu vezu s okosnicom iz P2-ostatka. Takva vodikova veza ne ostvaruje se u kompleksu inhibitora **11a** (koji sadrži P2-benzilnu skupinu; $IC_{50}=1,95 \mu M$) s virusnom proteazom (slika 9).

Povećanje P2-prstena supstitucijom ciklopropilne skupine iz **11s** s ciklobutilnom skupinom u **11t** odnosno ciklopentilnom skupinom u **11u** rezultiralo je smanjenjem inhibitornog učinka.

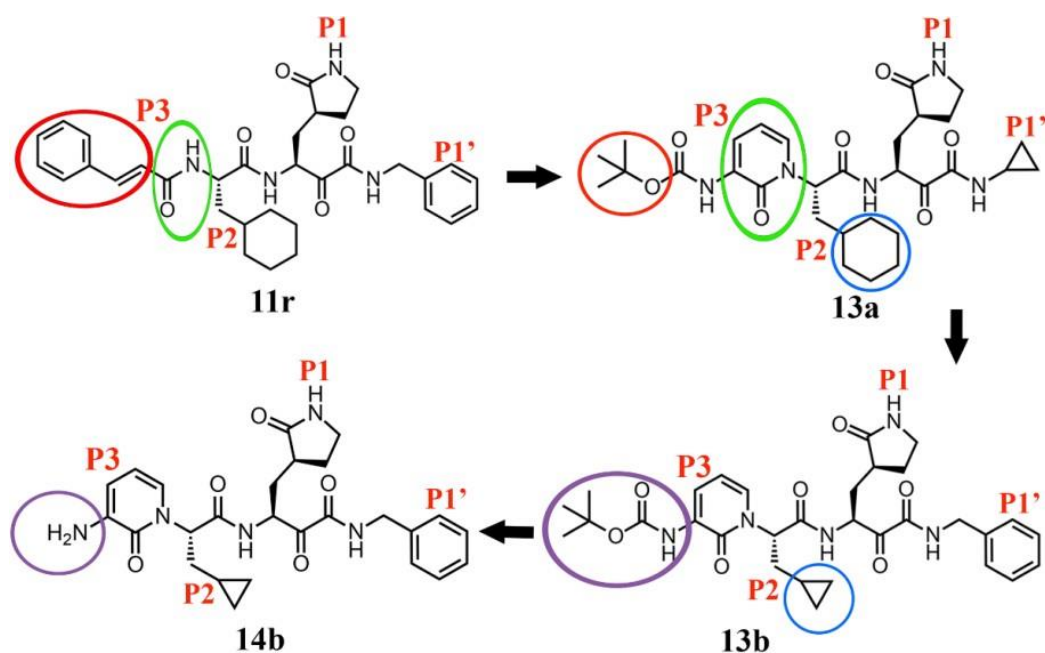
Opisanim istraživanjem još jednom se potvrdio značaj kemijske strukture u dizajnu ne samo antiviralnih spojeva već i općenito molekula s biološkim djelovanjem.



Slika 9. Usporedba kristalnih struktura kompleksâ SARS-COV-2 3CLpro (magenta) s inhibitorima **11a** (plavo) i **11s** (narančasto). Jedina razlika je u orijentaciji okosnice inhibitora prema Gln189, što omogućava tvorbu vodikove veze (plava crtkana linija) (Zhang i sur., 2020a).

Isti su autori (Zhang i sur., 2020b) u nastavku istraživanja modificirali strukturu inhibitora **11r** zatvarajući P2-P3 amidnu vezu u **piridonski prsten** spoja **13a**. Očekivali su da će takvom modifikacijom onemogućiti staničnim proteazama pristup amidnoj vezi, odnosno njezino cijepanje. Osim toga, u cilju povećanja topljivosti ciljnog inhibitora u plazmi kao i smanjenja njegovih interakcija s proteinima u plazmi, hidrofobna cinamoilna skupina supstituirana je manje hidrofobnom **Boc-skupinom** (slika 10).

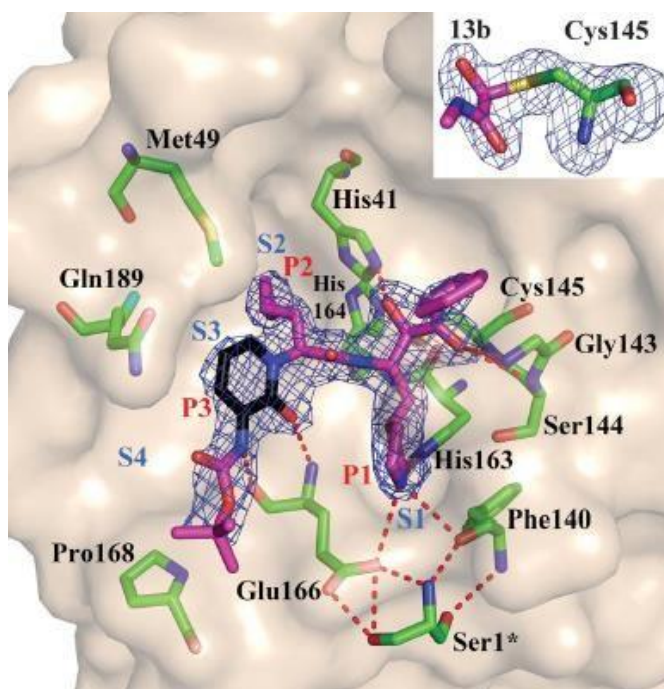
Iako su studije molekuskog pristajanja α -ketoamida **13a** i virusne proteaze ukazale na moguća sterička odbijanja piridonskog prstena i bočnog ogranka iz Gln189, autori su, računajući na ranije utvrđenu fleksibilnost Gln189, nastavili istraživanje s **13a** kao vodećim spojem. U odnosu na **11r**, njegovo vrijeme polu-života u mišjoj plazmi produljeno je tri puta, dok je topljivost u plazmi povećana ~ 19 puta. Istovremeno, strukturna modifikacija **11r** ($IC_{50}=0,18 \mu M$) u **13a** rezultirala je lošijim inhibitornim učinkom ($IC_{50}=2,39 \mu M$). U cilju povećanja antiviralne aktivnosti, P2-cikloheksilna skupina iz **13a** zamijenjena je s ciklopropilnom skupinom u **13b** što je dovelo do značajnog povećanja anti-SARS-CoV-2 3CLpro aktivnosti ($IC_{50}=0,67 \mu M$).



Slika 10. Kemijske strukture α -ketoamidnih inhibitora **11r**, **13a**, **13b** i **14b**. Zaokruženi fragmenti prikazuju modifikaciju molekule u usporedbi s prekursorom (Zhang i sur., 2020b).

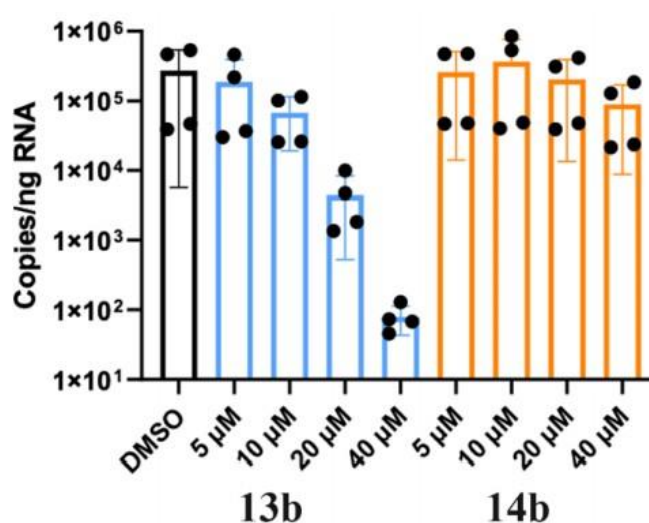
Kako je vidljivo iz kristalne strukture kompleksa peptidomimetika **13b** i aktivnog mjesta SARS-CoV-2 3CLpro (slika 11), nukleofilni napad katalitičkog Cys145 na α -keto skupinu iz **13b** rezultirao je tvorom hemiacetala, što je vidljivo iz povećane elektronske gustoće. Hemiacetalna hidroksilna skupina stabilizirana je vodikovom vezom s His41, dok amidni O-atom iz **13b** akceptira vodikovu vezu iz amidnih skupina ostataka Gly143, Cys145 i Ser144 tvoreći tako oksianionsku šupljinu u cisteinskoj proteazi. Opisana tvorba dviju vodikovih veza značajno povećava inhibitorni kapacitet α -ketoamida u odnosu na ostale peptidomimetičke inhibitore (aldehide i Michaelove akceptore) koji s enzimskim katalitičkim mjestom tvore samo jednu vodikovu vezu.

P1-laktamska jedinica ukopana je u S1-džep proteaze pri čemu laktamski N-atom tvori bifurkatnu vodikovu vezu s amidnim O-atomom iz Phe140 te Glu166-karboksilatom, dok njegov karbonilni O-atom sudjeluje u vodikovoj vezi s imidazolom iz His163. P2-ciklopropilmetilna skupina dobro pristaje u enzimski S2-džep. Piridonska skupina na položaju P3-P2 u enzimskom veznom mjestu zauzima položaj u koji se inače smješta okosnica iz enzimskog supstrata. Piridonski karbonilni O-atom akceptira vodikovu vezu iz okosnice ostatka Glu166, dok mu P3-amid donira vodikovu vezu. Boc-zaštitna skupina na položaju P3 ne uklapa se u S4-položaj proteolitičkog enzima, ali stupa u interakciju s Pro168 uslijed čega se taj ostatak udaljava iz S4-džepa za više od 2 Å u odnosu na strukturu slobodnog enzima.



Slika 11. Kristalna struktura kompleksa α -ketoamidnog inhibitora **13b** i SARS-CoV-2 3CLpro [piridonski prsten označen crnom bojom, dok je ostatak C-lanca iz inhibitora prikazan magenta bojom (Zhang i sur., 2020b)].

Opisana interakcija objašnjava gubitak inhibitorne aktivnosti spoja **14b** pripravljenog uklanjanjem Boc-skupine (slika 12). Očito je hidrofobna i voluminozna Boc-skupina neophodna za prolazak kroz staničnu membranu, pa se smatra da bi još hidrofobnija skupina na ovom položaju dodatno unaprijedila inhibitorni učinak na replikaciju SARS-CoV-2.

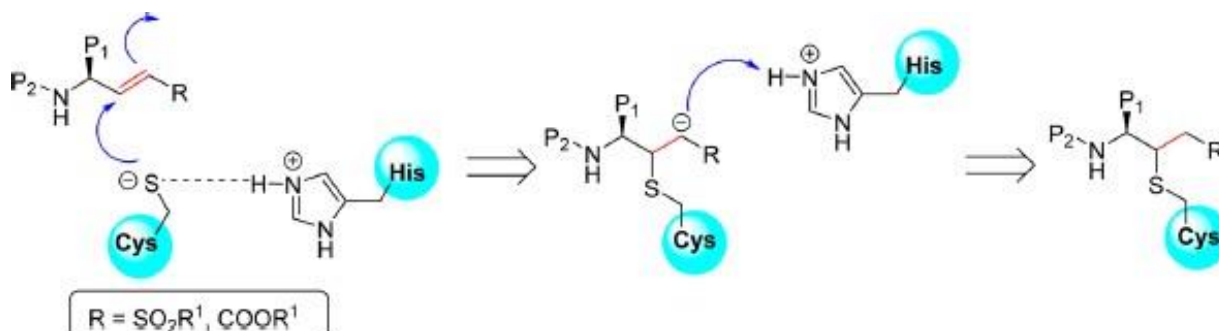


Slika 12. Inhibicija replikacije SARS-CoV-2 u prisutnosti različitih koncentracija inhibitora **13b** i **14b** (Zhang i sur., 2020b).

Nadalje, ispitana su ADME (apsorpcija-distribucija-metabolizam-izlučivanje) svojstva α -ketoamidnog inhibitora **13a**, a obećavajući farmakokinetički rezultati opravdaju daljnja istraživanja na razvoju piridonskih peptidomimetičkih inhibitora kao potencijalnih lijekova za COVID-19.

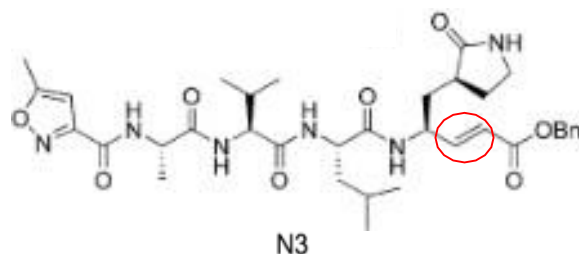
2.4.3. Inhibitori tipa III

Inhibitori tipa **III** su Michaelovi akceptori, odnosno α,β -nezasićeni spojevi koji podliježu Michaelovoj adiciji (1,4-adicijskoj reakciji α,β -nezasićenih karbonilnih spojeva s rezonancijski stabiliziranim ugljikovim nukleofilom). Strategija u dizajnu ovog tipa inhibitora uključuje zamjenu amidne skupine iz supstrata s Michaelovim akceptorom. Potom Cys-ostatak podliježe 1,4-adiciji s Michaelovim akceptorom iz inhibitora pri čemu se tvori α -karbanion čijim se protoniranjem ireverzibilno inhibira enzim (slika 13) (Liu i sur., 2020).



Slika 13. Mehanizam inhibitornog djelovanja Michaelovog inhibitora (Liu i sur., 2020).

Yang i suradnici su 2005. godine sintetizirali Michaelov akceptor **N3** (slika 14) koji je pokazao inhibitorno djelovanje na glavne proteaze iz SARS-CoV.



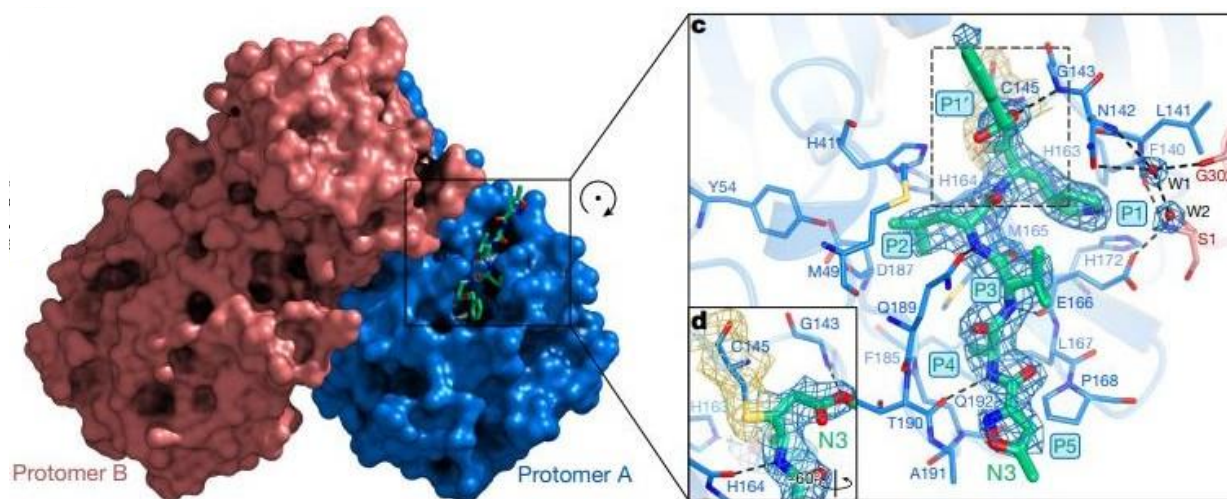
Slika 14. Kemijska struktura α,β -nezasićenog inhibitora **N3** (Yang i sur., 2005).

Pojava SARS-CoV-2 i potreba za žurnim otkrićem učinkovitih lijekova nametnula je nastavak istraživanja potencijalnog inhibitornog djelovanja **N3** na SARS-CoV-2 3CLpro (Jin i sur., 2020). Stoga je u radu objavljenom u časopisu *Nature* određena kristalna struktura kompleksa **N3** i

virusne proteaze.

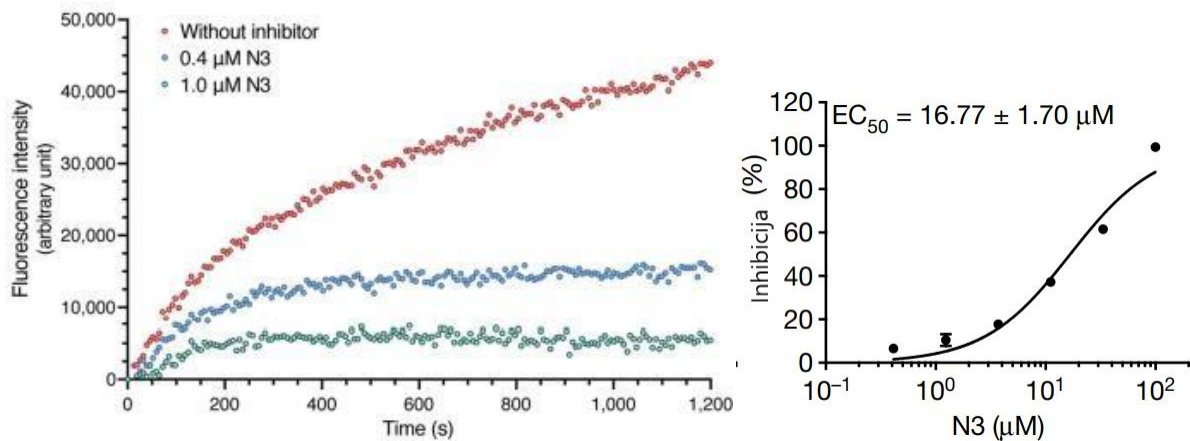
Virusnu proteazu čine dva protomera A i B asocirani u dimer, a svaki protomer sastoji se iz tri domene. Domena I (ostaci 8-101) i domena II (ostaci 102-184) zauzimaju strukturu antiparalelnih β -bačvi. Domena III (ostaci 201-303) sadrže pet α -uzvojnica, a za domenu II vezana je dugom petljom. Katalitičko mjesto čini Cys-His dijada, a locirano je u rascjepu između domena I i II.

Inhibitor **N3** veže se u vezni džep enzima tvoreći antiparalelne ploče s ostacima 164-168 te 189-191. Michaelova adicija potvrđena je kovalentnom vezom između C_{β} -atoma iz vinilne skupine iz **N3** s S-atomom iz Cys145 iz protomera A. Laktamska skupina na položaju P1 umetnuta je u S1-džep tvoreći vodikovu vezu s H163 iz protomera A. Bočni ogranak iz P2-Leu duboko je smješten u hidrofobnom S2-mjestu. Val-bočni ogranak na položaju P3 izložen je otapalu, što indicira da ovo enzimsko mjesto tolerira različite funkcijske skupine. Bočni ogranak P4-Ala okružen je bočnim ograncima iz Met165, Leu167, Phe185 i Gln192 te s okosnicom iz Gln189, tvoreći tako mali hidrofobni džep. Pro5 uspostavlja Van der Waalove kontakte s Pro168 te okosnicom iz ostataka 190-191. Voluminozna benzilna skupina smještena je u S1'-mjesto uspostavljajući van der Waalove interakcije s Tyr24 i Tyr25 (slika 15).



Slika 15. Prikaz kristalne strukture kompleksa SARS-CoV-2 3CLpro i Michaelovog inhibitora **N3** (Jin i sur., 2020).

Dakle, **N3** tvori višestruke vodikove veze s aminokiselinskim ostacima iz veznog džepa virusne proteaze, što zaključava inhibitor unutar enzimskog katalitičkog mjesta i osigurava dobar inhibitorski učinak, potvrđen kinetičkom analizom čiji su rezultati prikazani na slici 16.



Slika 16. Krivulje inhibicijskog učinka Michelovog inhibitora **N3** (*lijevo*) te graf ovisnosti inhibicije SARS-CoV-2 3CLpro o koncentraciji **N3** (*desno*) (Jin i sur., 2020).

Provedena je i *in vitro* evaluacija inhibitora **N3**. Prema rezultatima RT-PCR analize, **N3** pokazuje jak antiviralni učinak na Vero stanice inficirane SARS-CoV-2 i to pri 10 μM koncentraciji. Krivulja njegovog inhibicijskog učinka prikazana na slici 16 kao i određena EC₅₀-vrijednost (srednja učinkovita koncentracija koja uzrokuje 50% od maksimalnog odgovora) u iznosu 16.77 μM sugerira na sposobnost **N3** da prođe kroz stanične membrane na putu prema ciljnom enzimu.

2.4.4. Usporedba inhibitora **11a**, **13b**, **14b** i **N3**

Somboon i suradnici (2021) usporedili su četiri inhibitora (**N3**, **11a**, **13b** i **14b**) opisana u prethodnim poglavljima s ciljem pružanja više informacija o jačini interakcija, a posljedično i o jačini inhibicije SARS-CoV-2 3CLpro.

Usporedba kristalne strukture kompleksa 3CL proteaze sa svakim inhibitorom vršila se korištenjem MD (all-atom Molecular Dynamics) simulacija.

α-Ketoamidni inhibitor **13b** cilja 10 aminokiselinskih ostataka iz veznog džepa proteaze: His41, Met49, Leu141, Asp142, Ser144, Cys145, His164, Met165, Glu166 i Pro168.

Inhibitor **N3** dizajniran je tako da se u enzimskom aktivnom mjestu ostvaruje interakcije s 9 aminokiselinskih ostataka: Leu27, Met49, Gly143, Cys145, Met165, Glu166, Pro168, Gln189 i Thr190.

Aldehidni inhibitor **11a** koristi 8 aminokiselinskih ostataka za smještanje u aktivno mjesto SARS-CoV-2 3CLpro: Met49, Phe140, Leu141, Cys145, His163, His164, Met165 i Glu166).

Inhibitor **14b** također cilja fragment od 8 aminokiselinskih ostataka za vezanje s proteazom, no zbog nedostatka Boc-skupine u P4 položaju njegove su interakcije s Glu166 i

Pro168 oslabljenje, što utječe na slabije vezanje inhibitora i proteaze.

Aminokiseline Phe140, Gly143, Cys145, His164, Glu66 i Gln189 bitne su za vezanje vodikovim vezama s inhibitorima. Ostaci Gly143 i Cys145 bolje se vežu s inhibitorima **13b** i **14b** zbog α -ketoamidnog karaktera, odnosno zbog oksianionske šupljine koja dodatno stabilizira kompleks dvjema vodikovim vezama. Dušikov atom iz okosnice Glu166 tvori vodikovu vezu s P3 položajem u svim inhibitorima, a kod **13b** je ta pozicija dodatno stabilizirana vodikovom vezom s kisikom iz okosnice His164.

Inhibitor **N3** najbolje se veže za ostatke u S4-hidrofobnom džepu, posebice za Gln189 i Thr190 zbog njihovog hidrofobnog karaktera. Osim toga, hidrofobne interakcije svih inhibitora s His41, Met49, Asn142, Cys145, Met165 i Glu166 ključne su za stabilizaciju kompleksa. His41 i Cys145 nalaze se u ključnom fragmentu aktivnog mjesta, katalitičkoj dijadi. Ti ostaci doprinose stabilizaciji kompleksa inhibitor-enzim uspostavom van der Waalsovih interakcija s α -ketoamidnim inhibitorima **13b** i **14b** što upućuje da ciklopropilni prsten najviše odgovara u S2-položaj enzima. Vrijednosti afiniteta vezanja prema SARS-CoV-2 3CL proteazi prikazane su u tablici 5.

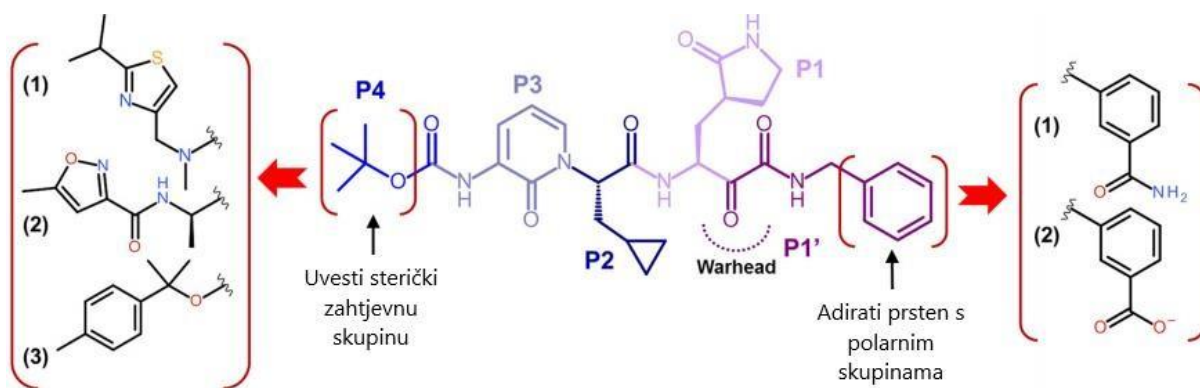
Tablica 5. Vrijednosti veznih afiniteta inhibitora prema SARS-CoV-2 3CL proteazi (Somboon i suradnici, 2021).

Inhibitor	ΔG_{bind} (kcal/mol)
11a	-9.68 ± 0.07
13b	-10.35 ± 0.04
14b	-9.64 ± 0.03
N3	-9.92 ± 0.04

Inhibitor **13b** pokazuje najveći afinitet vezanja prema SARS-CoV-2 3CLpro, pokazuje najveću stabilnost u veznom mjestu proteaze te uspostavlja najjače van der Waalsove interakcije s ključnim ostacima M165 i E166. Međutim, kapacitet vezanja inhibitora **13b** s S4-S5 pozicijama proteaze je smanjen te je njegov fenilni prsten u S1' slabije stabiliziran u odnosu na druge inhibitore. Kako bi se povećao afinitet vezanja predloženo je sljedeće (slika 17):

- Sterički zahtjevne N-terminalne skupine treba uključiti u P4 podjedinicu kako bi se vezale s hidrofobnim ostacima Pro168 i Thr190.
- Polarne skupine treba uključiti u fenilni prsten na P1' poziciji kako bi uspostavljale vodikove

veze s okolnim ostacima Thr25, His41 i Cys44.



Slika 17. Strukturne modifikacije kojima bi se mogao povećati anti-SARS-CoV-2 3CLpro kapacitet peptidomimetičkih inhibitora (Somboon i sur., 2021).

3. Zaključak

U ovom radu opisana je uloga peptidomimetičkih inhibitora **I-III** u inhibiciji glavne virusne proteaze, SARS-CoV-2 3CLpro. Pri tom su se posebno istaknuli peptidomimetici koji sadrže aldehidnu (**11a**), α -ketoamidnu (**13b**) ili Michaelovu akceptorsku skupinu (**N3**) s pomoću kojih ostvaruju kovalentnu vezu s katalitičkim Cys-His mjestom u proteazi i inhibiraju ne samo njezin učinak već i replikaciju SARS-CoV-2.

- ✓ Aldehidni inhibitor **11a** ima $IC_{50} = 0,053 \pm 0,005 \mu\text{M}$ što upućuje na izvrstan inhibitorni potencijal. Visoka CC_{50} -vrijednost ($>100 \mu\text{M}$) ukazuje na izostanak citotoksičnog djelovanja. Odlikuje se povoljnim farmakokinetičkim svojstvima (polu-vrijeme života iznosi 4,27 sati dok je bioraspodivnost 87,8%). *In vivo* studije inhibitora **11a** nisu ukazale na akutnu toksičnost kod tretiranih životinja.
- ✓ Ketoamidni inhibitor **13b** ima $IC_{50} = 0.67 \mu\text{M}$ što ukazuje na dobru anti-SARS-CoV-2 3CLpro aktivnost. Ispitivanja ADME svojstva ukazala su na obećavajuća farmakokinetička svojstva.
- ✓ Michaelov inhibitor **N3** ima $EC_{50} = 16,77 \pm 1,70 \mu\text{M}$, što sugerira sposobnost prolaska kroz stanične membrane. *In vitro* studije inhibitora **N3** pokazale su jak antiviralni učinak na Vero stanice inficirane SARS-CoV-2 pri koncentraciji $10 \mu\text{M}$.

4. Literatura

Baig M.S., Alagumuthu M., Rajpoot S., Saquib U. (2020) Identification of a Potencial Peptide Inhibitor of SARS-CoV-2 Targeting its Entry into the Host Cells. *Drugs in R&D* **20**: 161-169.

Barišić L. (2018) Nastavni materijali iz peptidnih mimetika i pseudopeptida. Nastavni materijal preuzet s Merlina.

Barišić L. (2020) Peptidni mimetici i pseudopeptidi. Nastavni materijal preuzet s Merlina.

Biophysical Society (2020) Coronavirus Structure, Vaccine and Therapy Development, <https://www.biophysics.org/blog/coronavirus_structure-vaccine-and-therapy-development> Pristupljeno 20. lipnja 2021.

Cai Y., Zhang J., Xiao T., Peng H., Sterling S.M., Walsh Jr., R.W., Rawson S., Rits-Volloch S., Chen B. (2020) Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science* **369**: 1586-1592.

Dai W., Zhang B., Jiang X.-M., Su H., Li J., Zhao Y., Xie X., Jin Z., Peng J., Liu F., Li C., Li Y., Bai F., Wang H., Cheng C., Cen X., Hu S., Yang H., Wang J., Liu X., Xiao G., Jiang H., Rao Z., Zhang L.-K., Xu Y., Yang H., Liu H. (2020) Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease. *Science* **368**: 1331-1335.

Gante J. (1994) Peptidomimetics- Tailored Enzyme Inhibitors. *Angewandte Chemie International Edition* **33**: 1699-1720.

Grottesi A., Bešker N., Emerson A., Manelfi C., Beccari A.R., Frigerio F., Lindahl E., Cerchia C., Talarico C. (2020) Computational Studies of SARS-CoV-2 3CLpro: Insights from MD Simulations. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 5346-5361.

Jaskolski M., Dauter Z., Shabalin I.G., Gilski M., Brzezinski D., Kowiel M., Rupp B., Wlodawer A. (2021) Crystallographic models of SARS-CoV-2 3CLpro: in-depth assessment of structure quality and validation. *International Union of Crystallography Journal* **8**: 238-256.

Jin Z., Du X., Deng Y., Liu M., Zhao Y., Zhang B., Li X., Zhang L., Peng C., Duan Y., Yu L., Wang L., Yang K., Liu H., Liu X., Guddat L.W., Xu W., Xiao G., Qin C., Shi Z., Jiang H., Rao Z., Yang H. (2020) Structure of Mpro from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature* **582**: 289-293.

Liu Y., Liang C., Xin L., Ren X., Tian L., Ju X., Li H., Wang Y., Zhao Q., Liu H., Cao W., Xie X., Zhang D., Wang Y., Jian Y (2020) The development of Coronavirus 3C-Like protease (3CLpro) inhibitors from 2010 to 2020. *European Journal of Medicinal Chemistry* **206**: 112711-112728.

Machhi J., Herskovitz J., Senan A.M., Dutta D., Nath B., Oleynikov M.D., Blomberg W.R., Meigs D.D., Hasan M., Patel M., Kline P., Chang R.C.-C., Chang L., Gendelman H., Kevediya B.D. (2020) The Natural History, Pathobiology, and Clinical Manifestations of SARS-CoV-2 Infections. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* **15**: 359-386.

Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Fang L. (2020) Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**: 11727-1173.

Somboon T., Mahalapbutr P., Sanachai K., Maitarad P., Lee V.S., Hannongbua S., Rungrotmongkol T. (2021) Computational study on peptidomimetic inhibitors against SARS-CoV-2 main protease. *Journal of Molecular Liquids* **322**: 114999-115008.

Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. (2020) Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral research* **117**: 104792-104807.

Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. (2020) Structural basis for the recognition of the SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science* **367**: 1444-1448.

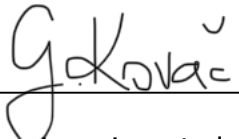
Yang H., Xie W., Xue X., Yang K., Ma J., Liang W., Zhao Q., Zhou Z., Pei D., Ziebuhr J., Hilgenfeld R., Yuen K.Y., Wong L., Gao G., Chen S., Chen Z., Ma D., Bartlam M., Rao Z. (2005) Design of wide-spectrum inhibitors targeting coronavirus main proteases. *The Public Library of Science biology* **3**: e324-336.

Zhang L., Lin D., Kusov Y., Nian Y., Ma Q., Wang J., von Brunn A., Leyssen P., Lanko K., Neyts J., de Wilde A., Snijder E.J., Liu H., Hilgenfeld R. (2020) α -Ketoamids as Broad-Spectrum Inhibitors of Coronavirus and Enterovirus Replication: Structure-Based Design, Synthesis, and Activity Assessment. *Journal of Medical Chemistry* **63**: 4562-4578.

Zhang L., Lin D., Sun X., Curth U., Drosten C., Sauerhering L., Becker S., Rox K., Hilgenfeld R. (2020) Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science* **368**: 409-412.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.


ime i prezime studenta