

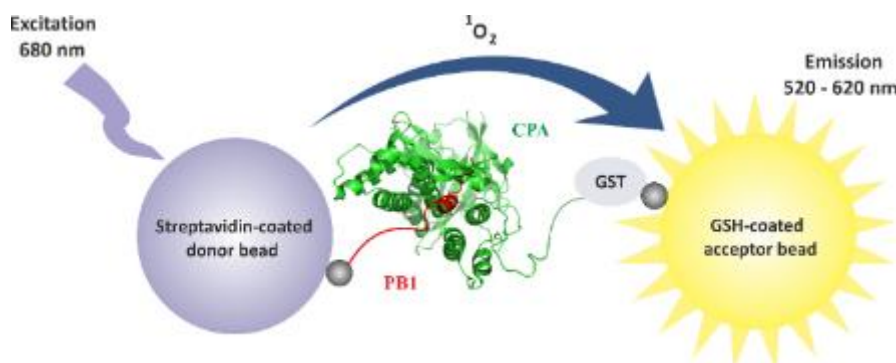
### PB1.11. Vývoj sloučenin rozrušujících protein-proteinovou interakci u polymerasy viru chřipky (Konvalinka)

#### Cíle výzkumu

- Vyvinout sloučeniny rozrušující PB1-PA interakci a charakterizovat jejich vazbu na podjednotku PA detailně termodynamicky a strukturně.
- Provést termodynamickou analýzu peptidů odvozených od N-koncové části PB1 a nalézt minimální peptidovou sekvenci odpovědnou za protein-proteinovou interakci.

#### Výzkumný plán a metodologie

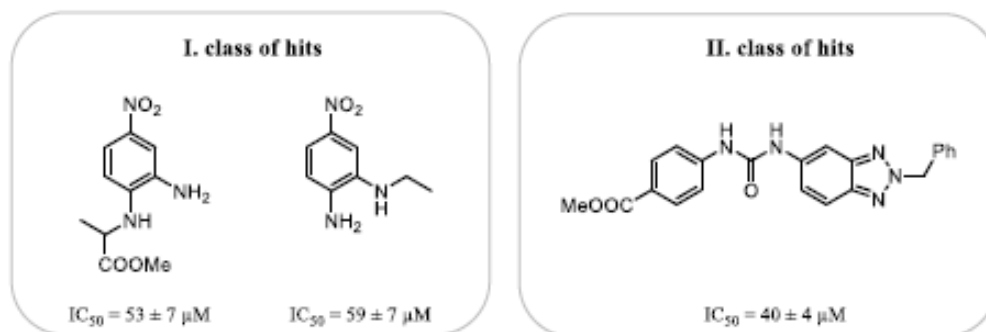
Nedávno jsme v naší laboratoři vyvinuli metodu pro hromadné testování sloučenin rozrušujících protein-proteinovou interakci mezi podjednotkami chřipkové polymerázy. Princip této metody je nastíněn na obrázku 2. V krátkosti, během ozáření laserem o vlnové délce 680 nm v tzv. donorové kuličce pokryté proteinem streptavidinem dojde uvnitř díky fotosensitivnímu ftalocyaninu k tvorbě singletového kyslíku. Ten od kuličky difunduje až do vzdálenosti 200 nm, než se rozpadne. Pokud je kvůli interakci PB1 a PA přítomna v blízkosti donorové kuličky tzv. kulička akceptorová, dojde k přenosu energie ze singletového kyslíku na deriváty thioxenu uvnitř akceptorové kuličky a následně dojde k emisi kvanta o vlnové délce 520 – 620 nm. Pokud akceptorová kulička se nenachází v blízkosti donorové, například pokud je v roztoku přítomna sloučenina rozrušující interakci mezi PA a PB1, singletový kyslík se vrátí do základního stavu, nedojde k přenosu energie na thioxen a žádný signál není emitován.



Obrázek 2. Princip AlphaScreen eseje. Použité komponenty jsou donorové kuličky pokryté proteinem streptavidinem (fialově), akceptorové kuličky pokryté redukovaným glutathionem (žlutě), biotinylovaný N-koncový helix podjednotky PB1 (červeně) a C-koncová část podjednotky PA s navázaným GST proteinem na svém N-konci (zeleně).

Otestováním knihovny původně vytvořené pro identifikaci sloučenin rozrušujících protein-proteinovou interakci nezbytnou pro tvorbu kapsidy viru HIV<sup>1</sup> byly objeveny dvě skupiny sloučenin interferujících s tvorbou komplexu PA-PB1 (obrázek 3). První skupina představuje nitrofenyldiaminy, které vykazovaly slabou mikromolární aktivitu v AlphaScreen eseji. Strukturně jsou podobné již potvrzeným nitrobenzofurazanům a cyanopyridinům. Druhá skupina zahrnuje deriváty 2H-benzotriazolyl-močoviny, sloučeniny isosterní s benzofurazany. V dalším kroku budou následovat optimalizace těchto prvních „hitů“.

V tomto projektu navrhujeme využít interakce proteinu PA-PB1 s jinými proteiny viru chřipky jako cíle pro vývoj nových nízkomolekulárních sloučenin schopných se kompetitivně vázat na protein PA a v důsledku toho desintegrovat RNA polymerázu. Použijeme proces optimalizace aktivních látek, abychom lépe porozuměli vztahu mezi strukturou a aktivitou aktivních látek („hitů“) z tříd I a II. Tyto první „hity“ jsou ukázány na Obr. 3 a budou sloužit jako strukturní skelety pro další vývoj ještě aktivnějších inhibitorů.



Obrázek 3. Struktury prvních identifikovaných sloučenin interferujících s tvorbou komplexu PA-PB1.

Souběžně s optimalizací plánujeme otestovat tzv. “IOCB knihovnu”, což je soubor přibližně 5000 sloučenin připravených na UOCHB AV ČR, v.v.i. různými vědeckými skupinami pomocí vyvinuté AlphaScreen eseje. K těmto účelům plánujeme využít robotickou linku navrhovanou v projektu.

Očekávaný racionální design bude založen na výsledcích testování a informací získaných z rentgenostrukturních, biochemických a termodynamických analýz.

Protivirová aktivita nejaktivnějších sloučenin bude testována ve skupině Jana Webera. Infektivita bude sledována pomocí standardní plakové eseje nebo pomocí tzv. XTT metody. Cytotoxicita sloučenin bude vyhodnocována též pomocí XTT metody. Pro analýzu, zda sloučeniny inhibují polymerasovou aktivitu *in vivo*, počítáme s přípravou a následném využití tzv. minireplicon eseje, která byla publikována.<sup>3,4</sup>

Způsob vazby nejaktivnějších sloučenin na C-koncovou část PA podjednotky bude objasněn pomocí rentgenostrukturní analýzy v laboratoři Dr. Pavlíně Řezáčové. Výsledky této strukturní analýzy budou důležité pro racionální návrh, který bude následovat. Interakce bude navíc detailně charakterizována pomocí isothermální titrační kalorimetrie. Výsledky měření nám pomohou při návrhu sloučenin s optimálním termodynamickým profilem. Dále bude provedena detailní termodynamická analýza vazby peptidů odvozených od N-koncové části PB1 na C-koncovou část podjednotky PA a určena minimální peptidová sekvence odpovědná za protein-proteinovou interakci.

Nejaktivnější nalezený “inhibitor protein-proteinové interakce” bude ve finále studován ve virologické laboratoři Dr. Jana Webera, zda jsou proti tomuto inhibitoru ve viru selektovány resistantní mutace. Selektce resistantních virů bude provedena sériovým pasážováním viru v MDCK buňkách v přítomnosti zvyšující se koncentrace studované sloučeniny. Mutace selektované v oblasti kódující virové proteiny PA a PB1 budou zjištěny DNA sekvenací a pokud bude selektován resistantní virus, bude zjištěna aktivita sloučeniny vůči němu.

Projekt bude realizován ve spolupráci se skupinou Pavla Majera (medicinální chemie), Josefa Cvačky (hmotnostní spektrometrie), Pavlíně Řezáčové (rentgenostrukturní analýza) a Jana Webera (virologie).

- [1] Machara, A.; Konvalinka, J.; Kotora, M. *Chemistry Select.* **2016**, 1, 101.
- [2] Scudiero, D. A.; Shoemaker, R. H.; Paull, K. D.; Monks, A.; Tierney, S.; Nofziger, T. H.; Currens, M. J.; Seniff, D.; Boyd, M. R. *Cancer Res.* **1988**, 48, 4827.
- [3] Muratore, G.; Goracci, L.; Mercorelli, B.; Foeglein, A.; Digard, P.; Cruciani, G.; Palu, G.; Loregian, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, 109, 6247.
- [4] Pleschka, S.; Jaskunas, R.; Engelhardt, O. G.; Zurcher, T.; Palese, P.; Garcia-Sastre, A. *J. Virol.* **1996**, 70, 4188.

### Časový plán

2018 – 2019/20

- Finální optimalizace AlphaScreen eseje pro hromadné testování s použitím robotické linky navrhované v projektu.
- Optimalizace hitů identifikovaných během prvních testů.
- Hromadné testování (s použitím robotické linky navrhované v projektu) tzv. "IOCB knihovny" obsahující různé typy organických sloučenin připravených na UOCHB AV ČR, v.v.i.

2020 – 2022

- Rentgenostrukturní a termodynamická analýza nejúčinnějších sloučenin identifikovaných pomocí AlphaScreen eseye.
- Antivirové testování nejúčinnějších sloučenin a analýza vývoje resistance proti nejaktivnější sloučenině pomocí sériového pasážování.
- Testování vlivu nejúčinnějších sloučenin na aktivitu virové polymerázy v buněčné esejí.
- Detailní termodynamická analýza vazby peptidů odvozených od N-koncové části PB1 podjednotky na C-koncovou část podjednotky PA. Určení minimální peptidové sekvence odpovědné za protein-proteinovou interakci.

#### **Plánované publikace a patenty**

Publikace (Jimp)

|        |      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|--------|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | Jimp | <i>Journal of Biological Chemistry</i><br><i>Journal of Virology</i><br><i>PNAS</i><br><i>Journal of Molecular Biology</i><br><i>Protein Science</i><br><i>Plos one</i><br><i>FEBS Journal</i><br><i>Antimicrobial Agents and Chemotherapies</i><br><i>Journal of Medicinal Chemistry</i><br><i>Biochemistry</i><br><i>European Journal of Medicinal Chemistry</i> |
| 2018   | 1    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2019   | 1    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2020   | 1    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2021   | 1    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 2022   | 1    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| Celkem | 5    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

Patenty a patentové přihlášky

|        |                   |                                          |                                                                                                                                       |
|--------|-------------------|------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|        | Patenty (udělené) | Mezinárodní patentové přihlášky (podané) | <i>Očekáváme patentovou ochranu:</i><br><i>Nejaktivnější sloučeniny rozrušující interakci mezi podjednotkami chřipkové polymerázy</i> |
| 2018   | 0                 | 0                                        |                                                                                                                                       |
| 2019   | 0                 | 0                                        |                                                                                                                                       |
| 2020   | 0                 | 0                                        |                                                                                                                                       |
| 2021   | 0                 | 1                                        |                                                                                                                                       |
| 2022   | 1                 | 0                                        |                                                                                                                                       |
| Celkem | 1                 | 1                                        |                                                                                                                                       |

#### **Zahraniční spolupráce**

- Prof. Hans-Georg Krausslich, University of Heidelberg a prof. Barbara S. Slusher, Brain Research Institute, Johns Hopkins University, Baltimore USA.
- Dr. Tomáš Cihlář, VP for Virology, Gilead Sciences Inc., Foster City, USA.