

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **PP-COVID-20-0010****Nové antivirálne liečivá: Dizajn, syntéza a testovanie aktivity nových špecifických inhibítorov virálnych proteáz koronavírusu SARS-CoV-2**Zodpovedný riešiteľ **Dr.h.c. prof. Ing. Stanislav Miertuš, DrSc.**Príjemca **Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave - Fakulta prírodných vied****Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený**

Fakulta prírodných vied, Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave
Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Farmaceutická fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave
Chemický ústav, Slovenská akadémia vied, Bratislava
Biomedicínske centrum, Slovenská akadémia vied, Bratislava

Zoznam spolupracujúcich organizácií zo zahraničia, ktoré sa zapojili do riešenia projektu (uved'te názov, sídlo, štát a identifikačné číslo ak je dostupné)

Department of Chemistry and Pharmaceutial Technology, University of Trieste, Terst,
Taliansko

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

V rámci riešenia projektu neboli plánované výstupy vo forme patentov alebo úžitkových vzorov.

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uved'te aj publikácie prijaté do tlače

- Frecer, V., Miertuš, S.: Antiviral agents against COVID-19: Structure-based design of specific peptidomimetic inhibitors of SARS-CoV-2 main protease. RSC Adv. 2020, 10(66), 40244-40263.
- Hľasová, Z., Pažitná, L., Ondrejovič, M., Katlík, J.: Lectin-based assay for the determination of the inhibition activity of small molecule inhibitors of neuraminidases. Journal of Biotechnology, 2021, 325, s. 65-72
- Čmelová, P., Šrámel, P., Zahradníková, B., Modrocká, V., Szabados, H., Mečiarová, M., Šebesta, R. Pro-Pro dipeptide-thiourea organocatalyst in the Mannich reaction between glyoxylate imines and pyruvates. Manuscript in preparation/ChemCatChem, zaslané do tlače.
- Kisszekelyi, P., Peňaška, T., Stankovianska, K., Mečiarová, M., Šebesta, R. Benzotiazine amino acid conjugates. Manuscript in preparation/Eur. J. Org. Chem. zaslané do tlače
- Miertuš, S., Frecer, V. Integrated Approach to the Development of Pharma and Medicinal Biotechnology – the Role of Computer Modelling. In BIOTECHNOLOGY & BIOTECHNOLOGICAL EQUIPMENT 2021, VOL. 35, NO. S1, S23–S42
<https://doi.org/10.1080/13102818.2020.1871543>
- Legerská, B., Čmelová, D., Ondrejovič, M.: Polyphenols as potential SARS-COV-2 3CL

(Mpro) protease inhibitors – A mini review. Central Europe Research, 2021, 11.11.2021, Londýn, UK

- Lopušná, K.; Lenhartová, S.; Nemčovičová, I. Biological testing of novel viral protease inhibitors against SARS-CoV-2 in mammalian model cell line VERO-E6. Conference: 6th European Congress of immunology. Abstracts. Location Virtual. Date September 1-4, 2021. Eur. J. Immunol. 2021. 51 (Suppl. 1) p.382 (P-1132).

- Klacsová M., Čelková A., Búcsi A., Uhríková D.: Liposomes as antiviral drug carriers. 38. Technologické dni, September 9-10, 2021, Bratislava, Book of Abstracts, Eur. Pharm. J. 68 (2021) 103 (oral)

Uplatnenie výsledkov projektu

Výsledky projektu bude možné využiť pri vývoji nových antivirálnych liečiv určených pre liečbu pacientov infikovaných vírusom SARS-CoV-2.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Projekt priniesol originálne výsledky v koordinovanom výskume piatich partnerských pracovísk špecializovaných na počítačový dizajn liečiv, štúdium biodostupnosti látok, syntézu liečiv, enzymatické a in vitro testovanie biologickej aktivity nových látok, ktoré inhibujú virálne enzýmy koronavírusu, ako aj replikáciu vírusu SARS-CoV-2 in vitro v infikovaných ľudských bunkových líniiach. Výskum sa sústredil na tri skupiny potenciálnych ireverzibilných inhibítorov enzýmov Mpro a PLpro SARS-CoV-2: peptidomimetické α -ketoamidy ako inhibítory Mpro, deriváty bis-benzylidencyklohexanónov a pyránové deriváty, ktoré inhibujú cysteínové proteázy Mpro a PLpro. Pomocou pokročilých metód molekulového modelovania a počítačovej chémie sme identifikovali sériu nových peptidomimetík, ktoré vykazovali vysokú predpovedanú väzbovú afinitu pre Mpro. Pri následnej syntéze týchto inhibítorov sa vyvinuli niektoré originálne postupy prípravy jednotlivých stavebných blokov, pospájanie jednotlivých segmentov však narážalo na problémy so stabilitou výsledných zlúčenín obsahujúcich benzotiazol. Preto sme paralelne vyvíjali ďalšie dve skupiny inhibítorov cysteínových proteáz, ktoré obsahujú miesto pre Michaelovu adíciu na cysteín. U bis-benzylidencyklohexanónov sa predpokladá inhibičná aktivita spojená s väzbou na cysteínové reziduá v PLpro ako aj v Mpro SARS-CoV-2. Zo série 16 derivátov zosyntetizovaných na Univerzite v Terste enzýmové inhibičné testy potvrdili inhibíciu derivátov 98 a 120 pre Mpro aj PLpro, zatiaľ čo 98a inhibuje špecificky len PLpro. Pre túto sériu látok sa tiež namerala významná inhibičná aktivita na vírusom infikovaných bunkách 98 (IC₅₀ 5.7 μ M), 120 (IC₅₀ 2.7 μ M) a 98a (IC₅₀ 6 -12.7 μ M). Enzýmové testy ukázali aktivitu štyroch pyránových derivátov VM1 - VM4. na PLpro aj Mpro (IC₅₀ 35-80 μ M). Na druhej strane in vivo testovanie na ľudských bunkách infikovaných vírusom SARS CoV-2 odhalilo vysokú antivirálnu aktivitu látok VM1 a VM2 (IC₅₀ 3-8 μ M). Projekt tiež priniesol nové unikátne poznatky v štúdiu biodostupnosti inhibítorov cysteínových proteáz. Hlavné ciele projektu – navrhnúť, pripraviť a otestovať nové potenciálne inhibítory vírusu SARS-CoV-2, ako aj jeho esenciálnych enzýmov Mpro a PLpro nevyhnutných pre jeho replikáciu, boli splnené, napriek krátkej dobe riešenia projektu, a predovšetkým napriek sťaženým podmienkam pre výskumnú prácu počas pandemických obmedzení počas trvania projektu. Novo identifikované štruktúry otvorili možnosti pre ďalší vývoj k potenciálnemu využitiu ako liečivá proti ochoreniu COVID-19.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The project brought original results in a coordinated study of five partner laboratories specializing in computer-assisted drug design, bioavailability studies, drug synthesis, enzymatic and in vitro testing of biological activity of new substances that inhibit coronavirus viral enzymes, as well as SARS-CoV-2 virus replication in vitro in infected human cell lines. The research has focused on three groups of potential irreversible inhibitors of the enzymes Mpro and PLpro of SARS-CoV-2: peptidomimetic α -ketoamides as Mpro inhibitors, bis-benzylidene cyclohexanone derivatives and pyran derivatives that inhibit the cysteine proteases Mpro and PLpro. Using advanced molecular modeling and computational chemistry methods, we have identified a series of new peptidomimetics that showed high predicted binding affinities for Mpro. In the subsequent synthesis of these inhibitors, some

original methods for the preparation of individual building blocks were developed, but the interconnection of individual segments encountered problems with the stability of the resulting benzothiazole-containing compounds. Therefore, we have developed two other groups of cysteine protease inhibitors in parallel, which contain a site for Michael addition to cysteine. Bis-benzylidene cyclohexanones are expected to display inhibitory activity associated with cysteine residue binding in both PLpro and Mpro SARS-CoV-2. Of a series of 16 derivatives synthesized at the University of Trieste, enzyme inhibition assays confirmed the inhibition of derivatives 98 and 120 for both Mpro and PLpro, while 98a specifically inhibited only PLpro. For this series of substances, significant inhibitory activity was also measured on virus-infected cells: 98 (IC₅₀ 5.7 μ M), 120 (IC₅₀ 2.7 μ M) and 98a (IC₅₀ 6 -12.7 μ M). Enzyme assays showed the activity of four pyran derivatives VM1 - VM4 on PLpro and Mpro (IC₅₀ 35-80 μ M). On the other hand, testing on virus-infected human cells revealed high in vitro antiviral activity of VM1 and VM2 (IC₅₀ 3-8 μ M). The study of the bioavailability of cysteine protease inhibitors also brought new unique findings. The main goals of the project - to find new potential inhibitors of the essential enzymes of the SARS-CoV-2 virus necessary for its replication were met despite the extremely short duration of the project, as well as the complex pandemic conditions for the research work. The newly identified structures opened up opportunities for further development for potential use as drugs against COVID-19.