

НАЧАЛО РАЗРАБОТКИ ПРОТИВОВИРУСНЫХ ЛЕКАРСТВ НА ОСНОВЕ ИНГИБИТОРОВ ГЛАВНОЙ ПРОТЕАЗЫ SARS-CoV-2

Сулимов А.В., Пьянков О.В., Шихалиев Х.С., Кутов Д.К.,
Ильин И.С., Щербаков Д.Н., Чиркова В.Ю.,
Беленькая С.В., Волосникова Е.А., Сулимов В.Б.



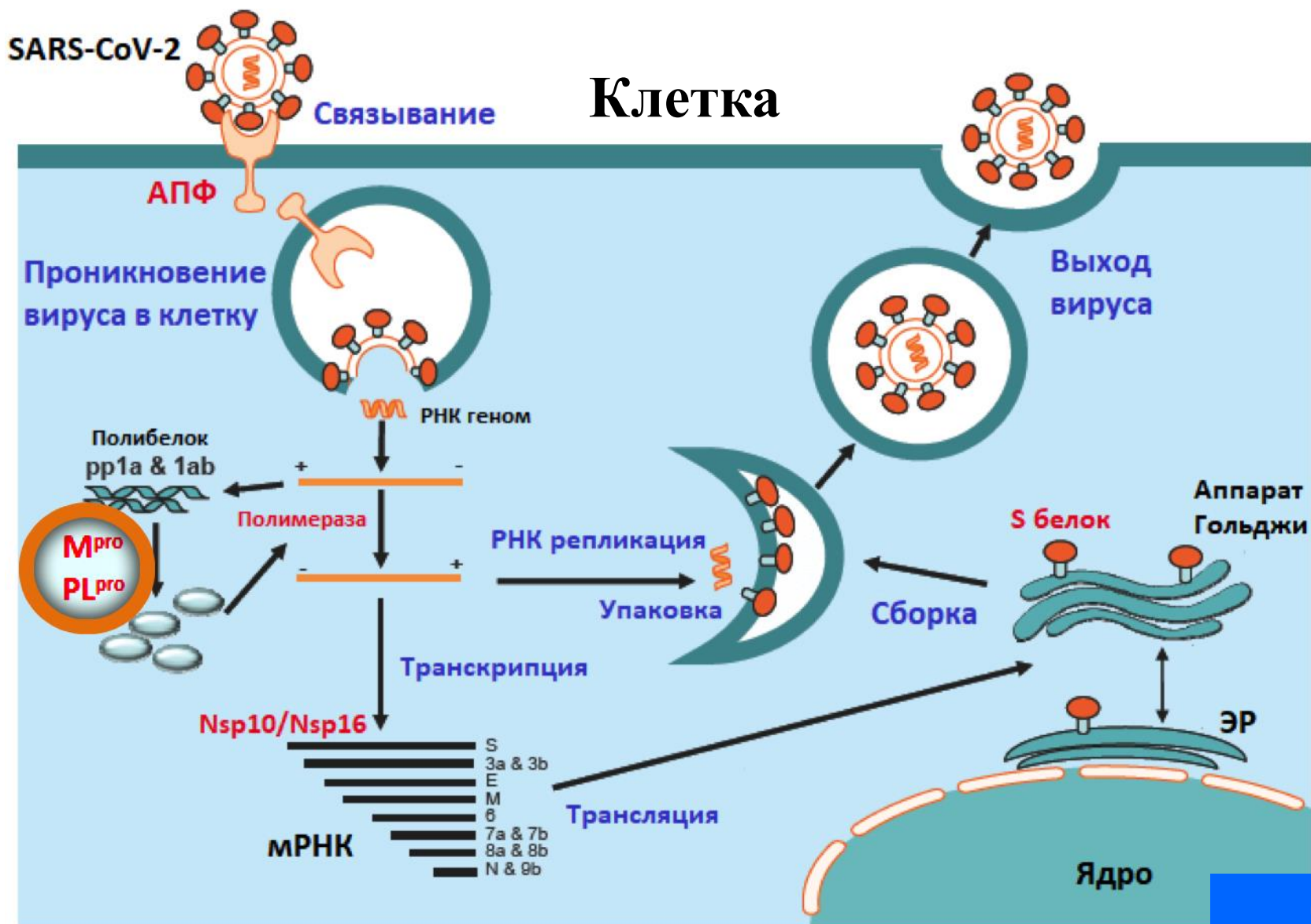
ВГУ
ВОРОНЕЖСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
Semper in motu



05.04.2021

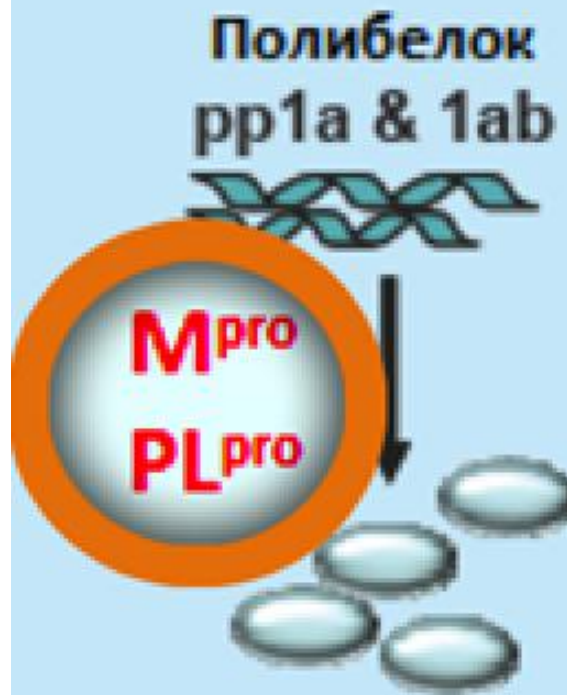
N* Novosibirsk
State
University
*THE REAL SCIENCE

Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2



Главная протеаза M^{pro} коронавируса SARS-CoV-2 – терапевтическая мишень

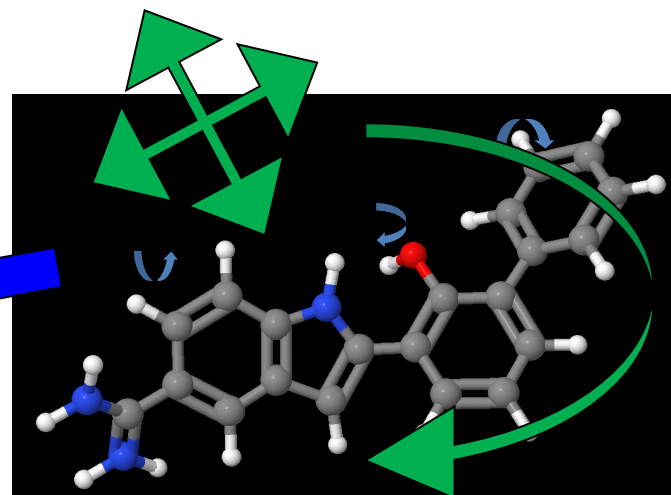
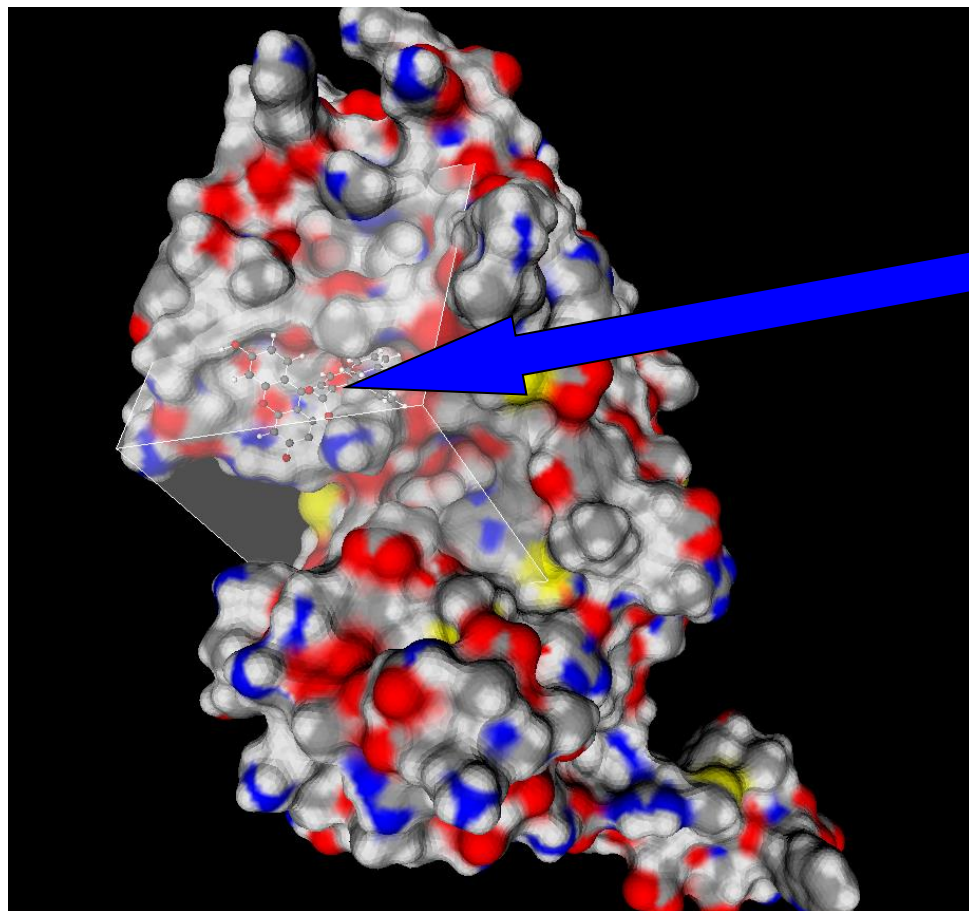
Расщепляет полипротеины вируса для создания функциональных вирусных белков



Этап I.

Применение молекулярного моделирования для поиска и разработки противовирусного препарата прямого действия на вирус SARS-CoV-2 на основе ингибиторов главной протеазы

Программа докинга SOL: позиционирование молекул в активном центре белка-мишени



Десятки тысяч молекул:

- 3 трансляции как целое тело
- 3 вращения как целое тело
- ≤ 15 внутренних вращений

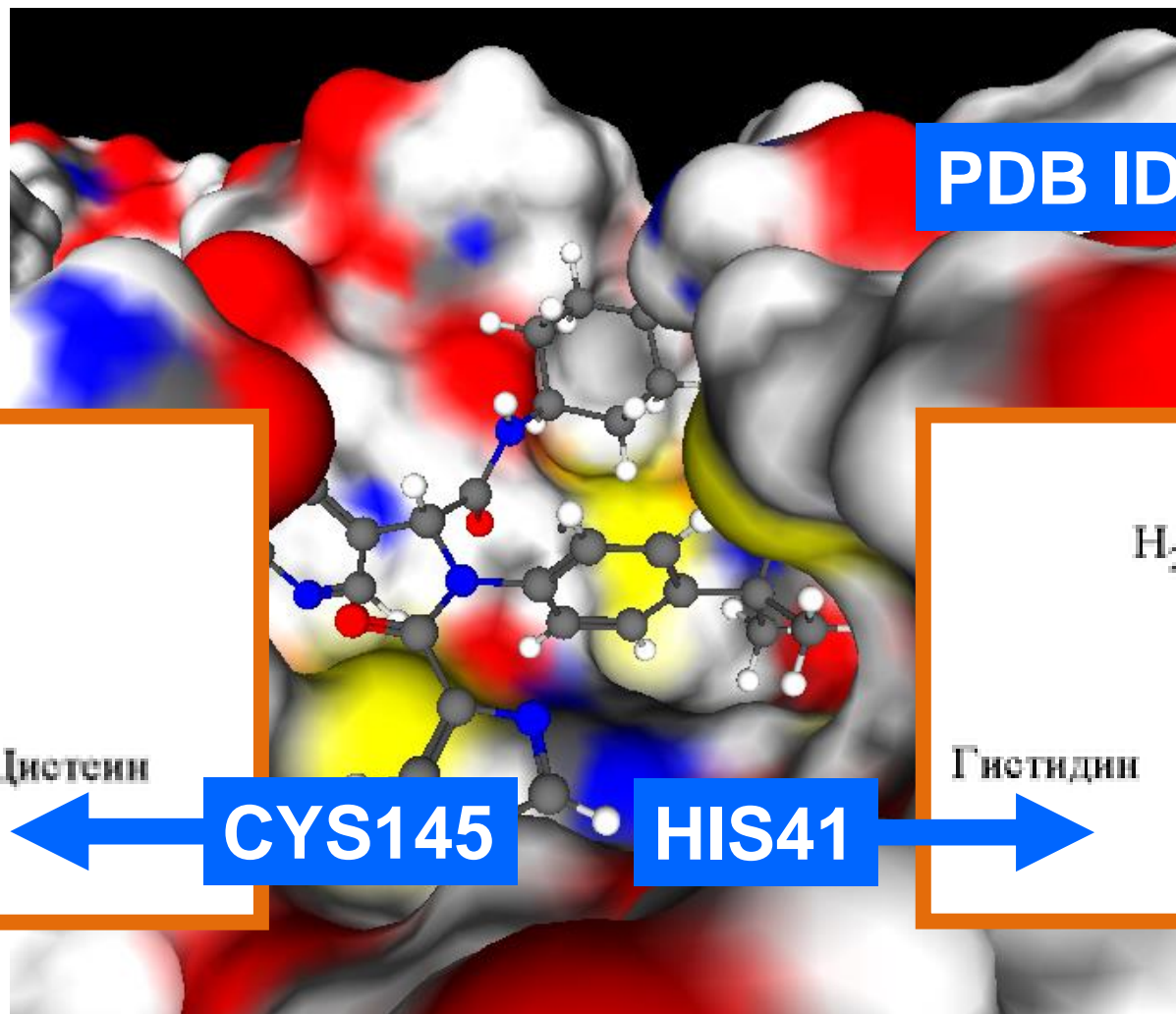
Белок: жесткий

Открытие ингибиторов: тромбина, урокиназы (uPA), факторов свертываемости крови Ха, XIa

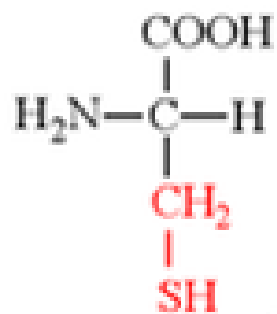
Выбор структуры белка-мишени M^{pro}

5 структур (< 2Å) из Protein Data Bank

Докинг закристаллизованных лигандов и кросс-докинг



PDB ID 6W63

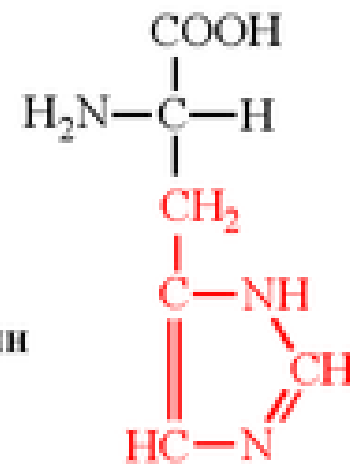


Цистеин

CYS145

HIS41

Гистидин



Кафедра органической химии Воронежского Государственного Университета

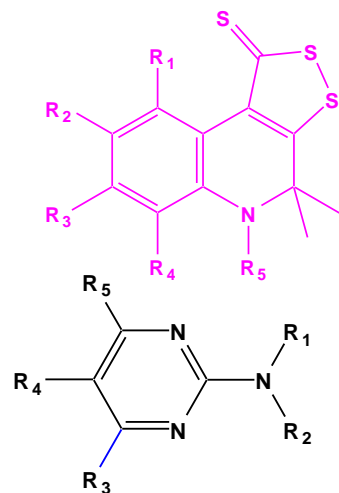
- ▶ Университет основан в 1918 г. на базе Юрьевского (Дерптского) университета, открытого в 1802 г. по указу императора Александра I
- ▶ В ВГУ 18 факультетов, 16 научно-исследовательских лабораторий, 10 учебно-науч.-производ. центров, Зональная науч. библиотека
- ▶ Кафедра органической химии образована в 1924 г. занимается разработкой новых биологически активных веществ



База органических соединений ВГУ

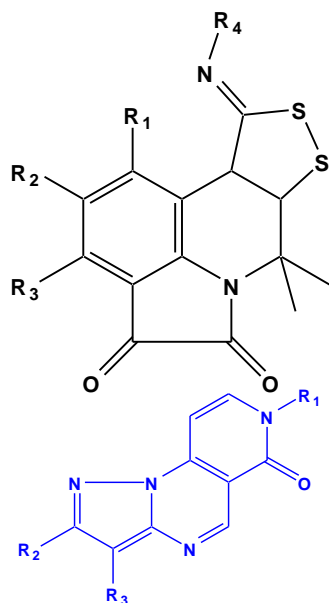
Более 200 000 веществ – в виртуальном виде (были синтезированы), представляют собой drug-like молекулы

Антибактериальная,
противогрибковая,
активность



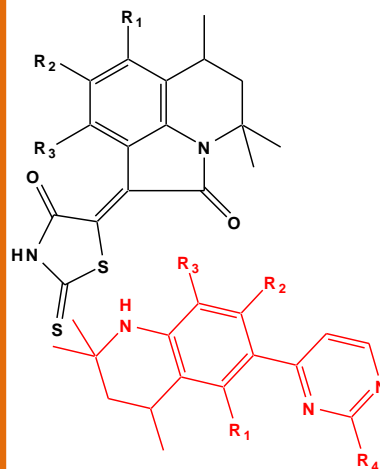
Производные
гидрохинолина,
хинолинтионов,
пиримидинов,
хиназолинов

Ингибиторы
протеинкиназ



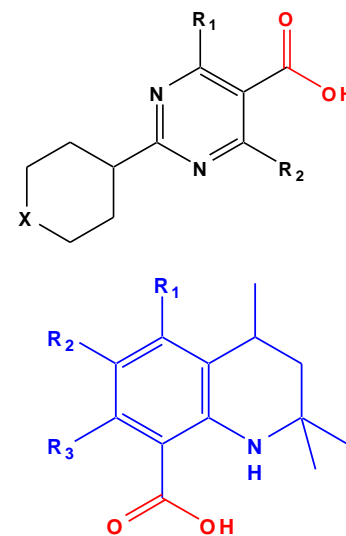
Производные
аминопиримидинов,
аминохиназолинов,
пирролохинолинов

Антикоагулянты
крови



Производные
гидрохинолинов,
линейно связанные
и конденсированных
с другими
гетероциклами

Регуляторы роста
растений

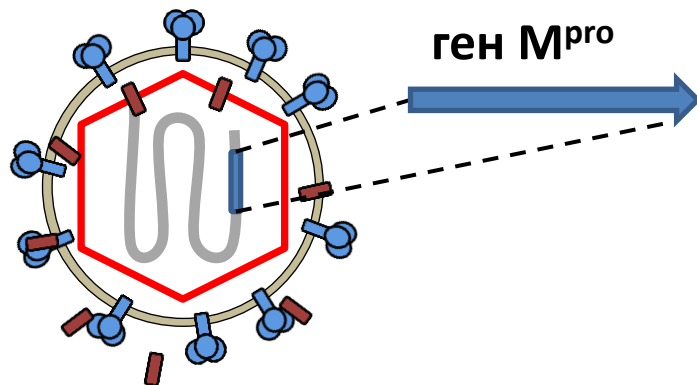


Производные
геарилкарбоновых
кислот

Скрининг лекарственных соединений

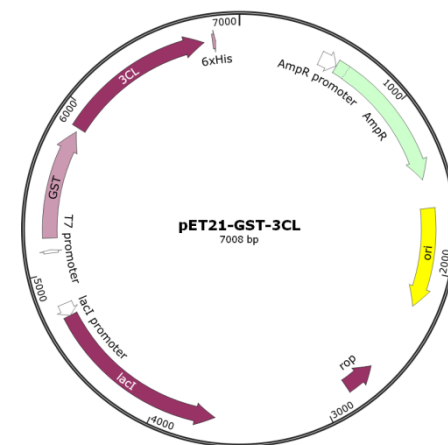
- ▶ База данных органических (drug-like) соединений ВГУ
16 000 низкомолекулярных соединений в 2D
- ▶ Протонирование соединений при pH = 7.4
- ▶ Подготовка 3D структур: неароматические кольца, макроциклы
- ▶ 41 000 конформеров – докинг программой SOL
- ▶ Отбор соединений по скору SOL лучше -6.3 ккал/моль
- ▶ 1 045 структур – расчет программой MORAC энтальпии связывания с белком методом квантовой-химии PM7 с растворителем в модели COSMO

Конструирование штамма продуцента рекомбинантной M^{pro} SARS-CoV-2

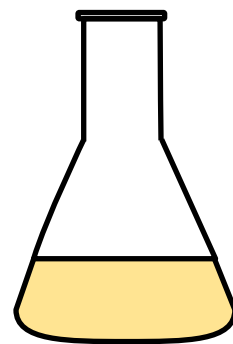


SARS-CoV-2

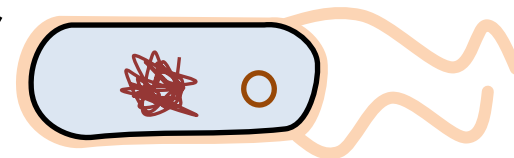
Встройка в плазмиду



Трансформация



Наработка биомассы

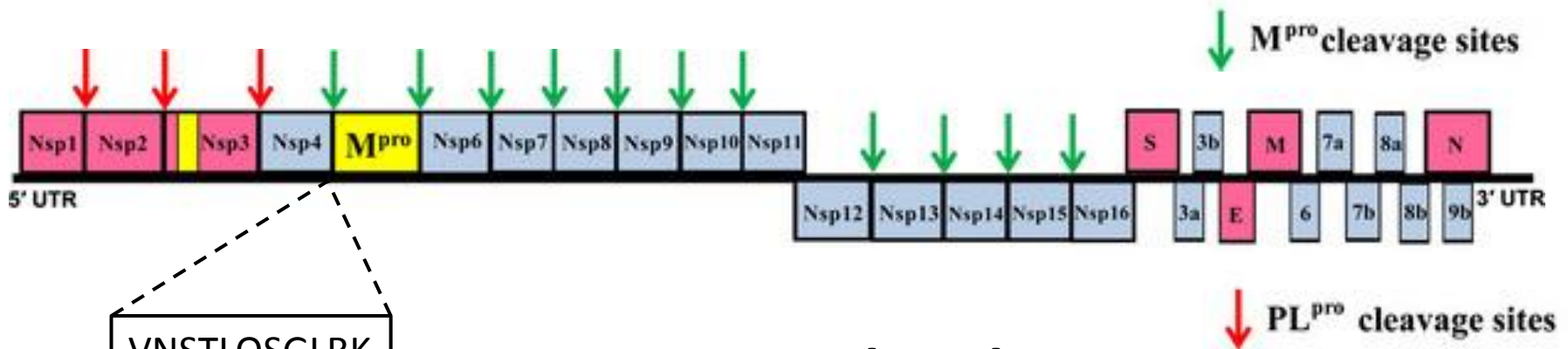


E. coli BL21DE3



Хроматографическая очистка

Принцип метода

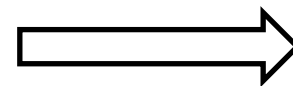
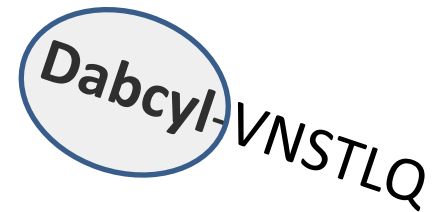
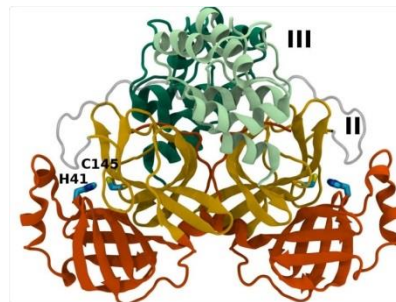


VNSTLQSGLRK

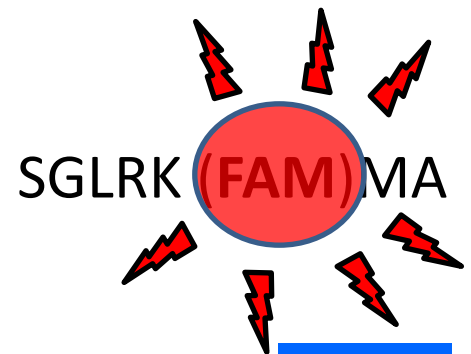
Сайт протеолиза

M^{pro} (3CL)

Пептидный субстрат



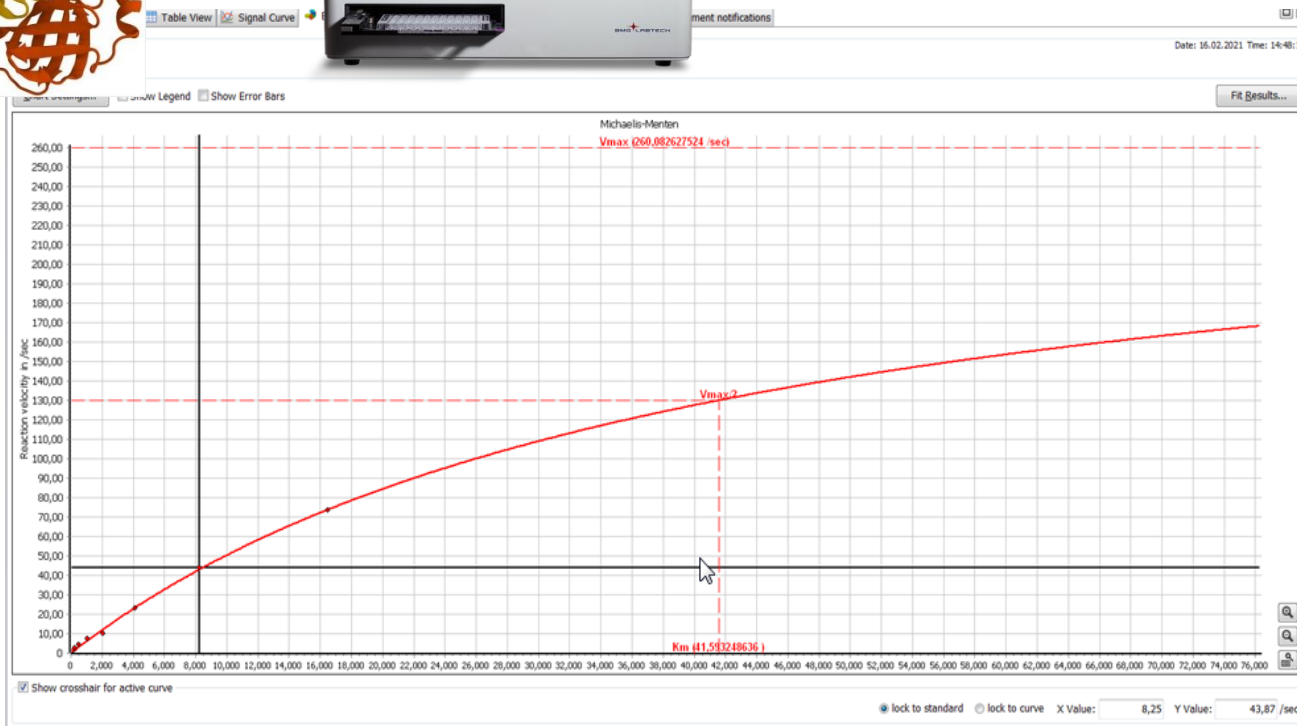
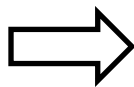
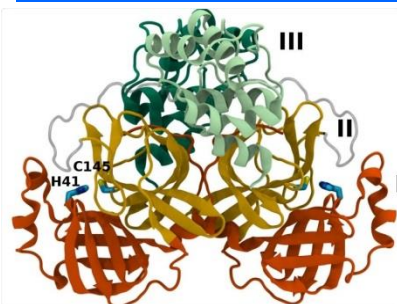
Протеолиз



FRET

флуоресценция

Измерение кинетических параметров главной протеазы M^{pro}

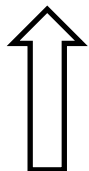
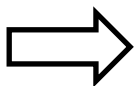
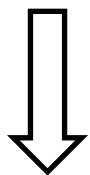


Dabcyl-VNSTLQSGLRK (FAM)MA

Пептидный флуоресцентно меченый субстрат

Измерение активности молекул-кандидатов по ингибированию главной протеазы M^{pro}

Добавление
потенциального
ингибитора



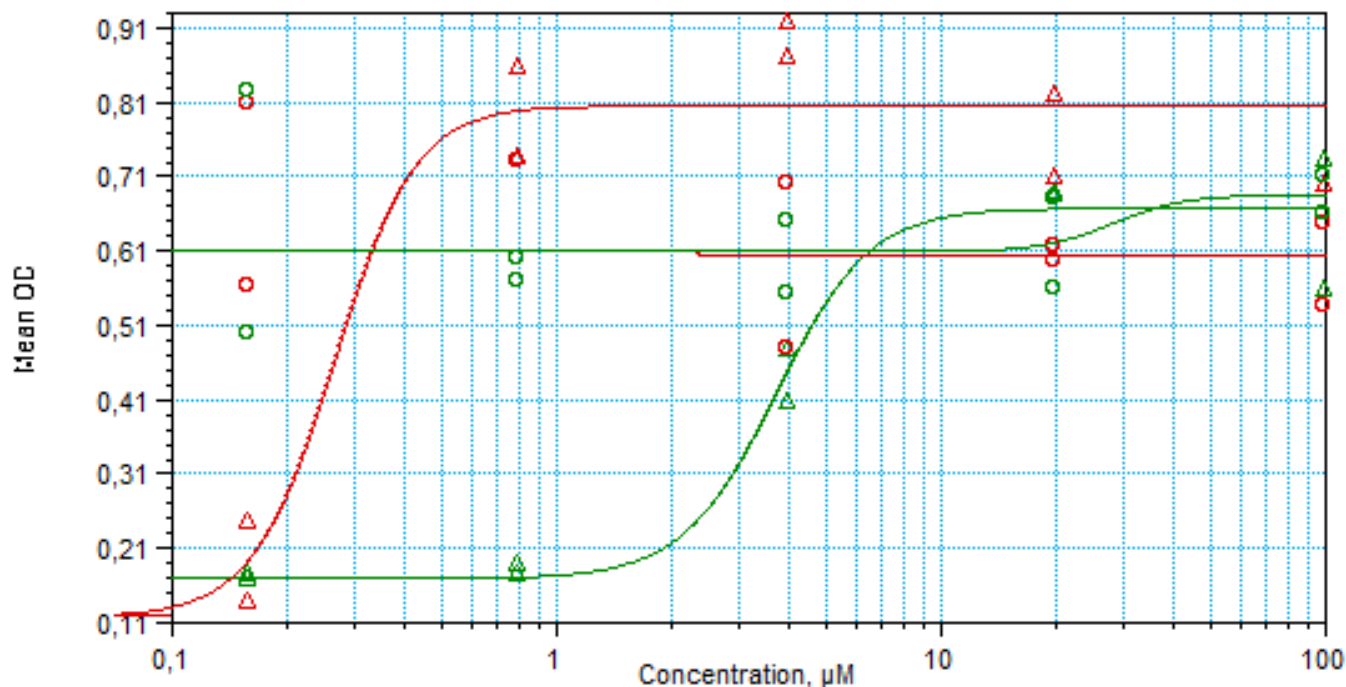
Добавление пептидного
субстрата и
рекомбинантной 3CL



L	B1	B2	X1	X2	X3	X4	X5	X6	B3	X7	X8	X9	B8
IC50, μM	0.2	1.8	1.8	1.9	2.1	3.3	3.8	3.9	4.0	4.2	5.5	5.7	42

Кривые эффективности ингибирования репликации вируса SARS-CoV-2 в клетках Vero E6

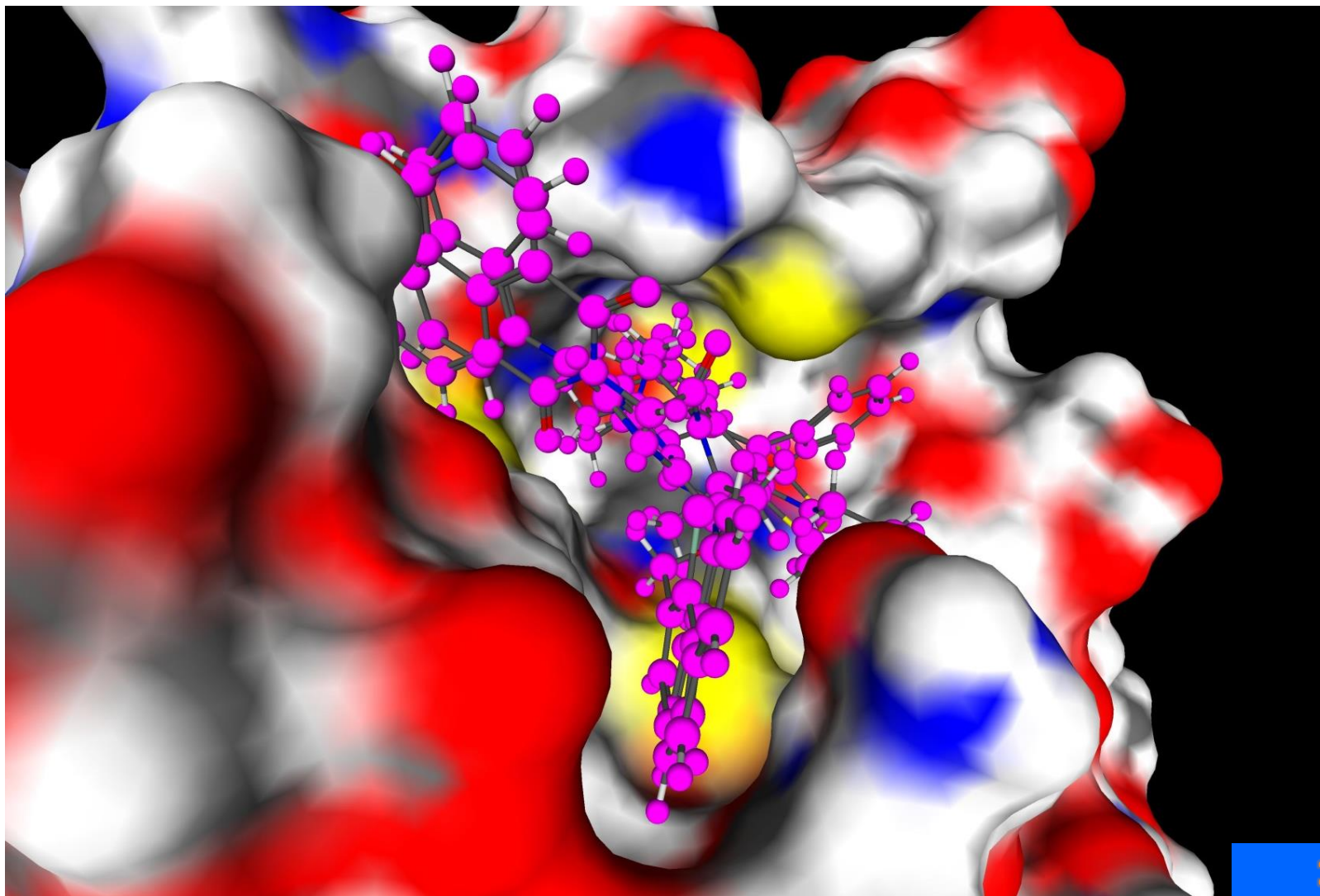
- ▶ Ремдесивир: $EC_{50} = 3,76 \mu\text{M}$, Индекс селективности $SI = 56,5$
- ▶ X10: $EC_{50} = 0,27 \mu\text{M}$, Индекс селективности $SI > 100$



$$y = \left(\frac{A - D}{1 + (x/C)^B} \right) + D$$

	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R²</u>
△ d3inf (Rem-inf.: Concentration vs Values)	0,168	3,568	3,761	0,668	0,967
△ d2inf (X10-inf. : Concentration vs Values)	0,117	4,078	0,266	0,806	0,955
○ d2uninf (X10-uninf. : Concentration vs Values)	0,613	89,327	2,331	0,601	0,006
○ d3uninf (Rem-uninf.: Concentration vs Values)	0,608	4,623	28,486	0,686	0,104

Положения трех новых ингибитора в активном центре главной протеазы SARS-CoV-2



Открыты новые ингибиторы главной протеазы M^{pro} и SARS-CoV-2

- ▶ **Несколько химических классов, производные:**
 - 1,3,5-триазин-2,4-диамина
 - 4-фенил-6-хлор-хинолина
 - фуоро[3,4-с]пиррола
- ▶ **Из 18 соединений, отобранных на основе расчетов и переданных на эксперимент:**
 - 9 соединений – ингибиторы M^{pro}: $0.2 \leq IC_{50} \leq 50$ мкМ
 - 7 соединений – подтверждено подавление репликации SARS-CoV-2: $0.5 \leq EC_{50} \leq 50$ мкМ, SI > 100
 - Не все ингибиторы M^{pro} подавляют SARS-CoV-2
 - Не все соединения, подавляющие SARS-CoV-2, являются ингибиторами M^{pro}

Спасибо за внимание



- ▶ *... Surely every medicine is an innovation; and he that will not apply new remedies, must expect new evils ...*
- ▶ *... Каждое лекарство это инновация; а кто не хочет применять новые средства, должен ждать новых бед ...*

Sir Francis Bacon (1561-1626)
OF INNOVATIONS