



Universiteit
Leiden
The Netherlands

The quest for broad-spectrum coronavirus inhibitors

Lima Leite Ogando, N.S.

Citation

Lima Leite Ogando, N. S. (2021, October 12). *The quest for broad-spectrum coronavirus inhibitors*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3217007>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/3217007>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Tot op heden zijn zeven coronavirussen (CoV's) geïdentificeerd die mensen kunnen infecteren: vier endemische humane CoV's (229E, NL63, OC43 en HKU1), verantwoordelijk voor verkoudheidssymptomen, en drie zoönotische CoV's (SARS-CoV, MERS-CoV en SARS-CoV-2) die ernstige ziekte kunnen veroorzaken. De laatstgenoemde virussen zijn in de afgelopen 20 jaar ontstaan. Het potentieel voor zoönotische overdracht en wereldwijde verspreiding, aangetoond door de SARS-CoV-2 pandemie, en de belasting voor de gezondheidszorg die dit heeft veroorzaakt, benadrukken de noodzaak van de ontwikkeling van zeer effectieve strategieën voor profylaxe en de behandeling van CoV infecties in het algemeen. In **hoofdstuk I** wordt een tijdlijn van de ontdekking van CoV's gegeven, samen met een breder overzicht van hun biologie, replicatiecyclus en pathogenese. Verder worden enkele bevindingen met betrekking tot de ontwikkeling van vaccins en therapieën met virusremmers en antilichamen benadrukt.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift was grotendeels gewijd aan de zoektocht naar breed-spectrum CoV-remmers. In het begin van dit project werden verbindingen voornamelijk getest in cellen die waren geïnfecteerd met MERS-CoV, terwijl vanaf februari 2020 ook de evaluatie van antivirale activiteit tegen SARS-CoV-2 in deze zoektocht werd opgenomen.

Hoofdstuk II beschrijft de karakterisering van enkele van de eerste SARS-CoV-2-isolaten en het geschikt maken van een zelf-ontwikkelde fenotypische screeningsassay om de gevoeligheid van SARS-CoV-2 voor verschillende remmers te bepalen, zoals remdesivir, alisporivir, chloroquine en gepegyleerd interferon alfa. Dit type assay is gebruikt in **hoofdstukken VI en VII** van dit proefschrift om het remmende effect van respectievelijk 6',6'-difluor-aristeromycine (DFA) en FDA-goedgekeurde verbindingen te evalueren. In **hoofdstuk VI** werd DFA, een klein molecuul dat oorspronkelijk ontworpen was om S-adenosylhomocysteïne (SAH) hydrolase te remmen, gekarakteriseerd door middel van fenotypische studies en de genotypische karakterisering van resistente mutanten. Deze verbinding is in staat MERS-CoV-replicatie sterk te remmen en de productie van viraal nageslacht volledig te blokkeren bij laag-micromolaire concentraties. Op basis van onze resultaten veronderstellen we dat dit kleine molecuul de intracellulaire concentraties kan beïnvloeden van de methyl donor S-adenosylmethionine, die wordt gebruikt door de twee coronavirale methyltransferases die betrokken zijn bij het genereren van de cap-structuur die aanwezig is op het 5'-uiteinde van alle virale mRNA's. De cap-structuur is belangrijk voor de translatie van virale mRNA's door de ribosomen van de gastheer, bescherming van deze RNA's tegen hydrolase-activiteit van exoribonucleases en ontsnapping aan immuonsensoren. In **hoofdstuk VII** werden calcineurineremmers (CNI) met antivirale activiteit tegen RNA-virussen

getest tegen SARS-CoV-2. Van cyclosporine A (CsA, een bekende breedspectrumremmer van humane en zoönotische CoV's) en voclosporine (VCS, een nieuwe CNI die structureel vergelijkbaar is met CsA) werd aangetoond dat ze antivirale activiteit hebben tegen SARS-CoV-2. In het bijzonder verminderde VCS de SARS-CoV-2 replicatie in longcellen bij concentraties die veilig zijn voor mensen en bij lagere concentraties van dan CsA en tacrolimus (TAC). De werkzaamheid van goedgekeurde vaccins is nog onzeker bij ontvangers van niertransplantaties (KTR's), bij wie immunosuppressieve en niet-immunosuppressieve therapieën zoals CsA en TAC vaak worden toegediend om afstoting van het donororgaan te voorkomen. Op basis van onze in vitro experimentele data stellen we dat er een mogelijk voordeel kan zijn van het gebruik van VCS voor de behandeling van COVID-19 in KTR's onder een immunosuppressief regime. Deze gegevens rechtvaardigen verder klinisch onderzoek van VCS in met SARS-CoV-2 geïnfecteerde KTR's, dat momenteel in gang is gezet.

De ontwikkeling van antivirale therapieën vereist een gedetailleerd begrip van CoV-replicatie en het samenspel van het virus met gastheercellen. SARS-CoV en SARS-CoV-2 behoren tot dezelfde CoV-soort, staan op beperkte genetische afstand van elkaar en hebben in essentie dezelfde genoomorganisatie. Om mogelijke verschillen tussen SARS-CoV- en SARS-CoV-2-replicatie in geïnfecteerde cellen te begrijpen, werd een vergelijking gemaakt van verschillende replicatiekenmerken, waaronder RNA-synthese, de productie van nieuwe virusdeeltjes en de cytopathologie na infectie (met behulp van elektronenmicroscopie en immunolabeling), beschreven in **hoofdstuk II**. Een belangrijk verschil tussen deze twee virussen is de aanwezigheid van een "furine-achtige klievingsplaats" in het gebied dat de S1- en S2-domeinen van het SARS-CoV-2 Spike (S)-eiwit verbindt. Adaptieve mutaties in dit S-gebied ontstonden na passage van SARS-CoV-2 in Vero E6-cellen (de meest gebruikte cellijn), wat resulteerde in fenotypische veranderingen. Uit andere onderzoeken blijkt dat de verandering of het verlies van deze site mogelijk van invloed zijn op de infectie-efficiëntie in andere (relevantere) cellijnen, bijvoorbeeld longcellen. In de afgelopen drie decennia zijn CoV-replicase-eiwitten gekarakteriseerd met behulp van een combinatie van bio-informatica, biochemie, structuurbiologie en (reverse) genetica. **Hoofdstukken III tot V** beschrijven de diepgaande karakterisering van CoV nsp14, één van de enzymatische componenten van het replicatie- en transcriptiecomplex (RTC), die bewijs leverde voor het belang van nsp14 voor de levensvatbaarheid en de fitness van het virus, terwijl ook werd vastgesteld dat nsp14 een goed doelwit zou kunnen zijn voor het ontwerpen van virusremmers. Dit bifunctionele eiwit bevat 3'-naar-5' exobonuclease (ExoN) en guanine-N7-methyltransferase (N7-MTase) domeinen die respectievelijk worden beschreven in **hoofdstuk IV en V**. Ondersteund door de toenemende beschikbaarheid van structurele informatie voor SARS-CoV nsp14, werden

slutelresiduen van beide nsp14-domeinen geïdentificeerd en onderzocht door plaatsgerichte mutagenese. Het fenotype van mutante CoV's, gelanceerd vanaf gekloonde cDNA-templates, werd geanalyseerd, evenals de enzymatische activiteit van de overeenkomstige recombinante eiwitten met behulp van in vitro-assays. De gegevens in **Hoofdstuk IV** laten zien dat CoV nsp14 ExoN-activiteit cruciaal is voor de primaire virale RNA-synthese en blijkbaar een extra rol speelt, naast het corrigeren van mismatches (proofreading) die tijdens genoomreplicatie door het virale polymerase zijn ingebouwd. Bovendien bleek dat zowel MERS-CoV als SARS-CoV-2 een ExoN-knockout-mutatie in het genoom niet kunnen verdragen, in tegenstelling tot wat eerder is beschreven voor MHV en SARS-CoV. In **Hoofdstuk V** wordt bewijs gepresenteerd dat ook het nsp14 N7-MTase domein/activiteit belangrijk is voor de levensvatbaarheid van bètacoronavirussen en dat er structurele verschillen kunnen zijn tussen N7-MTase van MHV, SARS-CoV, SARS-CoV-2 en MERS-CoV, ondanks de sterke conservering van de aminozuursequentie. Drie substituties leidden tot hetzelfde fenotypische profiel en zij definiëren de belangrijkste residuen van de N7-MTase katalytische pocket die kunnen worden gebruikt bij het ontwerpen van remmers met een potentieel pan-coronaviraal activiteitsspectrum. Mechanistische hypothesen over hoe nsp14 interacteert met andere subeenheden van het RTC tijdens RNA-synthese en post-transcriptionele processen worden besproken in **hoofdstuk VIII**. Bovendien wordt in dit afsluitende **hoofdstuk** de geschiedenis van minder- of niet-succesvolle antivirale middelen tegen CoV's kort samengevat, samen met mogelijke nieuwe benaderingen in antiviraal onderzoek. Tot slot worden enkele vooruitzichten voor toekomstig onderzoek geschetst.