

**DEVELOPMENT OF PEPTIDE INHIBITORS AGAINST DENGUE VIRUS INFECTION BY
IN SILICO DESIGN AND *IN VITRO* STUDIES**

AUSSARA PANYA 5337423 SIBC/D

Ph.D. (BIOCHEMISTRY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: PATHAI YENCHITSOMANUS, Ph.D., CHATCHAWAN
SRISAWAT, Ph.D., KIATTAWEE CHOOWONGKOMON, Ph.D., MUTITA JULKING, Ph.D.**ABSTRACT**

Dengue virus (DENV) infection is a global major concern with over 50 million reported cases a year. Presently, there are neither any approved vaccines nor effective drugs that are available; therefore, the development of anti-DENV drug is urgently needed. Several clinical reports revealed a positive association between the viremia and disease severity suggesting that the anti-DENV drug therapy can possibly ameliorates the disease severity as well as ending the transmission circuit to control the current outbreak situation. The surface envelope (E) protein of DENV is critical for the viral entry step which includes attachment and membrane fusion; thus, the blocking of envelope protein is an attractive strategy for anti-DENV drug development. This study aimed to search for novel peptide inhibitors to counter DENV infection through the targeting of E protein using a structure-based *in silico* design. Two selected strategies of inhibition included interference of membrane fusion process whereby the hydrophobic pocket on the E protein was the target, and the destabilization of virion structure organization through the disruption of the interaction between the envelope and membrane proteins, respectively. Following the first strategy, molecular docking technique was used to identify small peptides targeting the hydrophobic pocket. In the second strategy, the design of peptide inhibitor mimicking the ectodomain portion of membrane protein was performed to interfere with the protein-protein interaction. The designed peptides were tested for cytotoxicity to host cell, and its inhibitory effect on DENV foci formation in Vero cells. The peptide effects were further characterized on the reduction of DENV genome, protein, and infectivity levels by using real-time PCR, cell-based flavivirus immunodetection and immunofluorescence assay. Finally, the peptide inhibitory effect was tested with all four DENV serotypes (DENV1, DENV2, DENV3, and DENV4) in an effort to study the cross-serotype antiviral activity. Using a computer-aided design, peptide inhibitors targeting hydrophobic pocket revealed di-peptide inhibitor, Glu-Phe (EF), effectively inhibited DENV infection in cell culture system. Its most potential effect was observed for DENV2 with a half maximal inhibition concentration (IC₅₀) of 96 μ M, but it partially inhibited other serotypes. Treatment of EF at 200 μ M on infected cells also significantly reduced the viral genome and protein to 83.47% and 84.15%, respectively, corresponding to the reduction of infected cell numbers. An additional approach was carried out by using peptide mimicking membrane (M) protein, namely MLH40. Treatment of MLH40 caused the reduction of foci formation in four individual DENV serotype (DENV1-4) with IC₅₀ of 24-31 μ M. Further characterization suggested that the MLH40 specifically blocked viral attachment to host membrane, and treatment with 100 μ M could diminish 80% of viral attachment. The inhibitory effect of MLH40 was observed in various target cell types including Vero, A549, and Huh7 cells at low-micromolar level. The molecular docking technique suggested that MLH40 interacting with envelope proteins can disrupt their regular dimer conformation. The binding of peptide to the target site was a key underlining the inhibitory effect. In summary, the designed peptide inhibitors targeting DENV E protein on hydrophobic pocket and M-binding site could inhibit the virus infection in a cell culture system. The results provide proof-of-concept for the development of antiviral therapeutic peptide inhibitors to counter DENV infection through the use of a structure-based design targeting conserved viral protein.

KEY WORDS: DENGUE VIRUS / DENGUE INFECTION / PEPTIDE INHIBITOR /
DRUG DESIGN

158 pages

การพัฒนาเปปไทด์เพื่อยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีโดยการออกแบบด้วยคอมพิวเตอร์และการศึกษาทางห้องปฏิบัติการ
DEVELOPMENT OF PEPTIDE INHIBITORS AGAINST DENGUE VIRUS INFECTION BY *IN SILICO* DESIGN AND
IN VITRO STUDIES

อุษรา ปัญญา 5337423 SIBC/D

ปร.ศ. (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: เพทาย เข็นจิตโสมนัส, Ph.D., ชัชวาลย์ ศรีสวัสดิ์, Ph.D., เกียรติทิพย์ ชูวงศ์โกมล, Ph.D.,
มุกิตา จุลกิจ Ph.D.

บทคัดย่อ

โรคไข้เลือดออกจากการติดเชื้อไวรัสเดงกีเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญระดับโลก ซึ่งในแต่ละปีมีแนวโน้มผู้ป่วยติดเชื้อไวรัสเดงกีเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันยังไม่มียาป้องกันและยารักษาโรคไข้เลือดออกที่มีความจำเพาะ การรักษาหลักเป็นเพียงแบบประคับประคองอาการเท่านั้น ที่ผ่านมามีการรายงานว่ากลุ่มผู้ป่วยไข้เลือดออกที่มีความรุนแรงมากมีระดับไวรัสในกระแสเลือดมากกว่ากลุ่มผู้ป่วยที่มีความรุนแรงของโรคน้อย สะท้อนให้เห็นว่ายาต้านไวรัสมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้เพื่อลดระดับความรุนแรงของโรคไข้เลือดออกได้ เพราะฉะนั้นการค้นหาและพัฒนาต่อต้านไวรัสจึงมีความสำคัญและจำเป็นเป็นอย่างยิ่ง การยับยั้งกระบวนการเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านของไวรัส โดยยับยั้งการทำงานของโปรตีนผิว (envelope) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนไวรัสที่จำเป็นต่ออาศัยเซลล์เจ้าบ้าน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาและพัฒนาต่อต้านไวรัสชนิดเปปไทด์ เพื่อยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเดงกี โดยมีโปรตีนผิว (envelope) เป็นเป้าหมาย ซึ่งแบ่งตามกระบวนการวิจัยเป็นสองส่วน ได้แก่ การค้นหาเปปไทด์โดยเทคนิคทางคอมพิวเตอร์และการจำลองเปปไทด์จากโปรตีนของไวรัสเอง จากนั้นเปปไทด์ที่ถูกออกแบบได้รับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และทดสอบการยับยั้งการติดเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง การใช้เทคนิคทางคอมพิวเตอร์ซึ่งเป็นกระบวนการวิจัยแรกมีวัตถุประสงค์เพื่อค้นหาเปปไทด์สายสั้น ที่มีความจำเพาะต่อบริเวณ hydrophobic pocket บนโปรตีนผิวซึ่งมีการรายงานว่าเป็นบริเวณที่มีความสำคัญต่อการทำงานของโปรตีน จากผลการทดลองพบว่า เปปไทด์ที่ประกอบด้วยอะมิโนเอซิด กลูตามัทและฟีนิลอะลานิน (EF) มีความสามารถสูงสุดในการยับยั้งเชื้อไวรัสเดงกีในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยมีค่าความเข้มข้นที่สามารถลดการติดเชื้อครึ่งหนึ่ง (IC50) เท่ากับ 96 M เปปไทด์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้ง ไวรัสเดงกีซีโรไทป์ 2 แต่ยับยั้งซีโรไทป์อื่นได้ในระดับที่ต่ำกว่า กระบวนการวิจัยที่สองคือการจำลองเปปไทด์จากโปรตีนของไวรัส คือ โปรตีน membrane เพื่อรบกวนการจับกันระหว่างโปรตีน envelope และ membrane ที่มีส่วนสำคัญในการรักษาเสถียรภาพทางโครงสร้างของไวรัส พบว่าเปปไทด์จำลอง ตั้งชื่อว่า MLH40 มีคุณสมบัติในการยับยั้งการติดเชื้อของไวรัสเดงกีได้ทุกซีโรไทป์ ในระดับที่ใกล้เคียงกัน (IC50 ระหว่าง 24-31 μ M) จากการทดสอบกลไกการทำงานพบว่า MLH40 สามารถลดความสามารถของไวรัสในการจับกับผิวเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เปปไทด์ในระดับความเข้มข้นต่ำยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสเซลล์เพาะเลี้ยงหลายชนิดได้แก่ Vero, A549, Huh7 จากการใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการจำลองการจับกันระหว่าง MLH40 และ โปรตีนผิว พบว่า MLH40 จับโปรตีนผิวโดยอาศัยบริเวณปลายทางด้าน N-terminus โดยการจับกันนี้เชื่อว่าจะรบกวนโครงสร้าง dimer ของโปรตีนผิวและส่งผลกระทบต่อความสามารถในการจับกับผิวเซลล์ของไวรัส การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงกระบวนการค้นหาต่อต้านไวรัสชนิดเปปไทด์ที่มีประสิทธิภาพและเปปไทด์ที่ได้จากการทดลองนี้อาจจะสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อการรักษาโรคไข้เลือดออกได้ในอนาคต