Desarrollo de fármacos antirretrovirales: estudios de la interacción de ligandos con la proteína de la capside del VIH-1









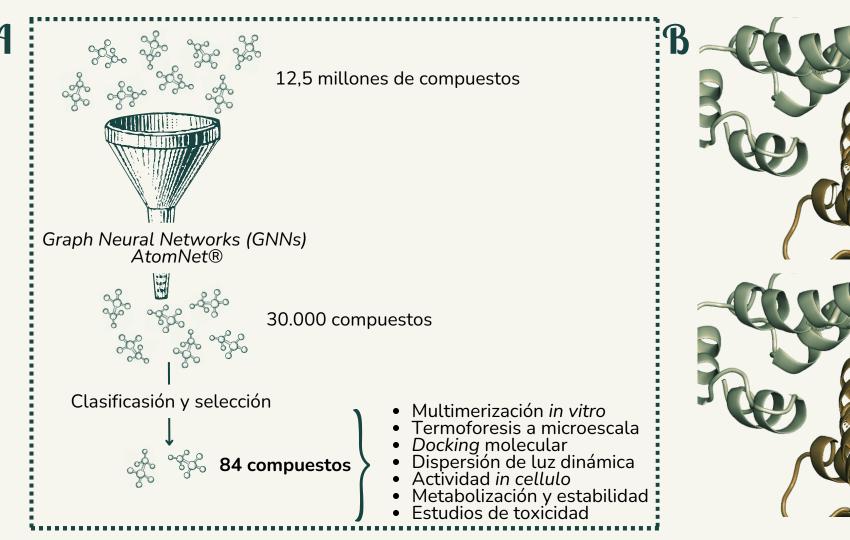
Zoraima Artía! Ana Clara Segovia! Maximiliano Granzella! Christophe Guillon! Xavier Robert! Ha Truong! Guzmán Alvarez, Ileana Corvo, Lía Randall'

1 Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, CP 60000, Uruguay (zartia@cup.edu.uy) 2 Equipe Rétrovirus et Biochimie Structurale, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, Francia. 3 Atomwise Inc., San Francisco, USA

1. Introducción

- El VIH afecta 38 millones de personas en el mundo y se ha descrito el fracaso terapéutico debido a la resistencia a múltiples fármacos.^{1, 2, 3}
- La cápside del VIH está formada por el ensamblaje de una única proteína vírica (CA), crucial para la replicación y la infectividad del virus.4
- Trabajamos en el desarrollo y caracterización de moléculas capaces de interaccionar con la CA o interferir con la multimerización de la CA-NC como potenciales fármacos antirretrovirales.
- Se realizó un screening virtual masivo (Atomwise) con inteligencia artificial que identificó 84 moléculas que interaccionan con una región conservada en la interfase entre monómeros de la CA⁵.

3. Docking molecular



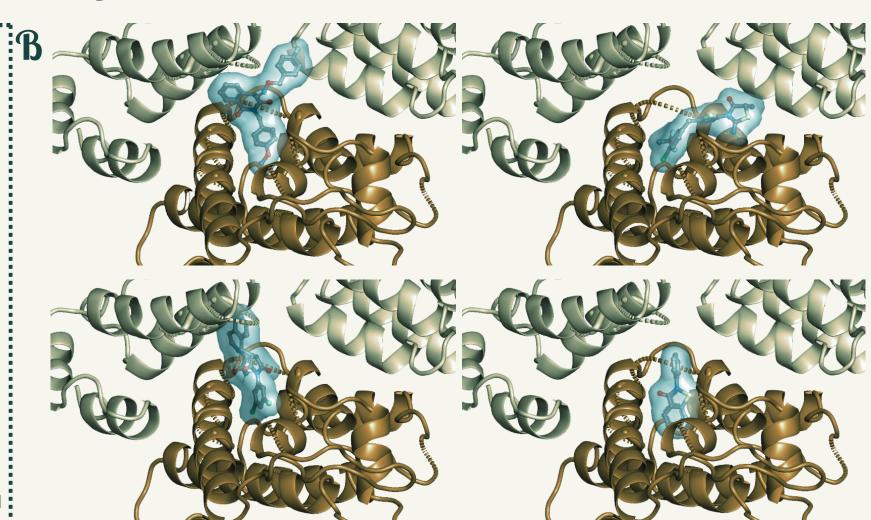


Figura 1. (A) Para el sitio altamente conservado seleccionado, la red neuronal analizó las coordenadas tridimensionales de cada complejo proteína-ligando, se seleccionaron 30.000 ligandos que se clasificaron garantizando diversidad y seleccionaron los compuestos con mayor puntuación de cada grupo, 84 en total. (B) Se utilizó la estructura cristalina de la proteína nativa de la cápside del VIH-1 de longitud completa en complejo con PF74 PDB 4XFZ) para reconstruir la estructura del hexámero completo. A continuación, se conservaron dos monómeros adyacentes (denominados A y B) y se utilizaron como primer objetivo. Se puede observar que los diferentes compuestos adoptan distintos posicionamientos en la estructura.

5. Ensayo de actividad in cellulo

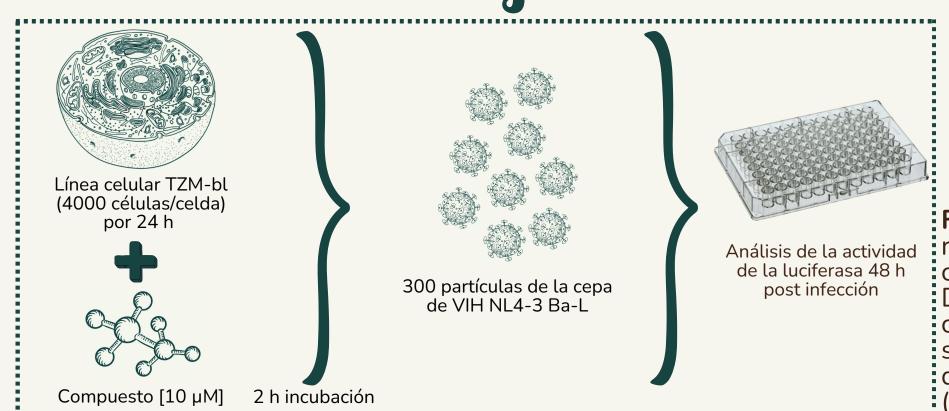


Figura 4. Se realizó un ensayo de inhibición de la replicación del VIH en células TMZ-bl. Como control positivo las células se pretrataron con DMSO y como control negativo no se infectaron, cada condición se ensayó 8 veces. A las 48 horas se determinó la infección viral mediante el análisis de la actividad luciferasa midiendo luminiscencia

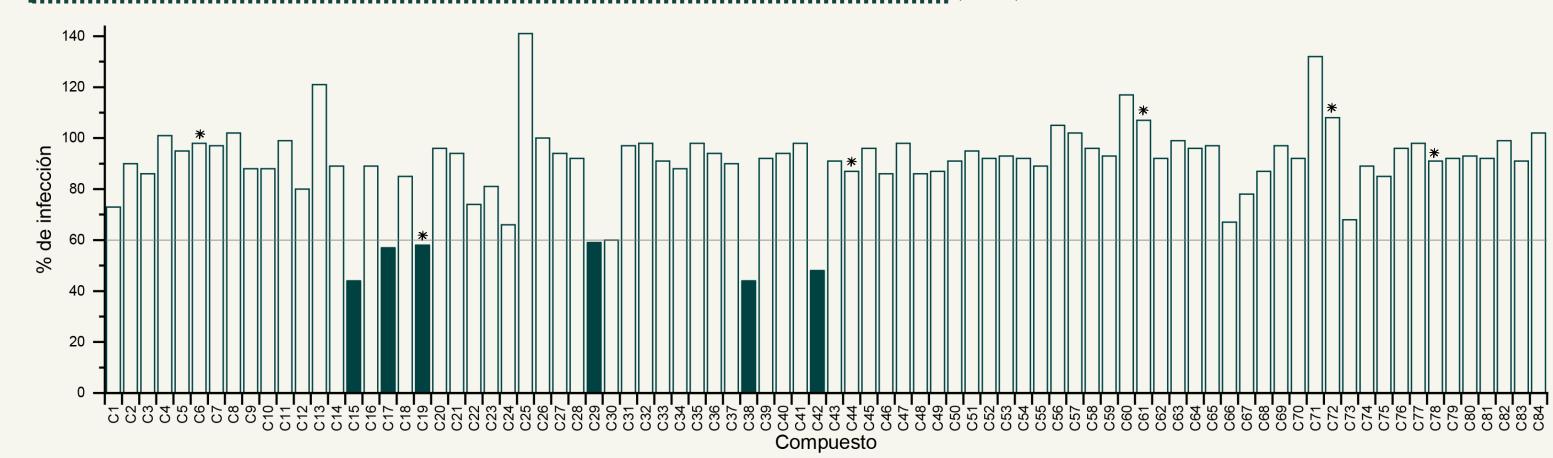


Figura 5. El porcentaje de infección se determinó como (ULR de la muestra-ULR de células no infectadas)/(ULR del control DMSO-ULR de células no infectadas). Las barras coloreadas corresponden a compuestos que disminuyen la infección viral más de un 40% con respecto al control. Se marcan con un aterisco los compuestos con mejores resultados en el ensayo de multimerización.



7. Conclusiones

Las diferentes metodologías utilizadas permiten seleccionar compuestos en función de su capacidad para alterar la velocidad de multimerización de la CA acelerando o relentizando la misma, de reducir la carga viral en el modelo de infección en células o de sus valores de Kd en el ensayo MST, Así, podemos decir que estas metodologías son complementarias, en algunos casos reafirman resultados previamente obtenidos o arrojan nueva información a tener en cuenta.

Este trabajo nos ha servido de base para seleccionar compuestos y continuar profundizando en su desarrollo, en la comprensión del efecto de éstos en el ciclo de replicación y la infectividad del virus, y paralelamente comenzar estudios de citotoxicidad, metabolización y estabilidad que permitan avanzar en el desarrollo de los mismos como posibles antirretrovirales contra VIH-1.











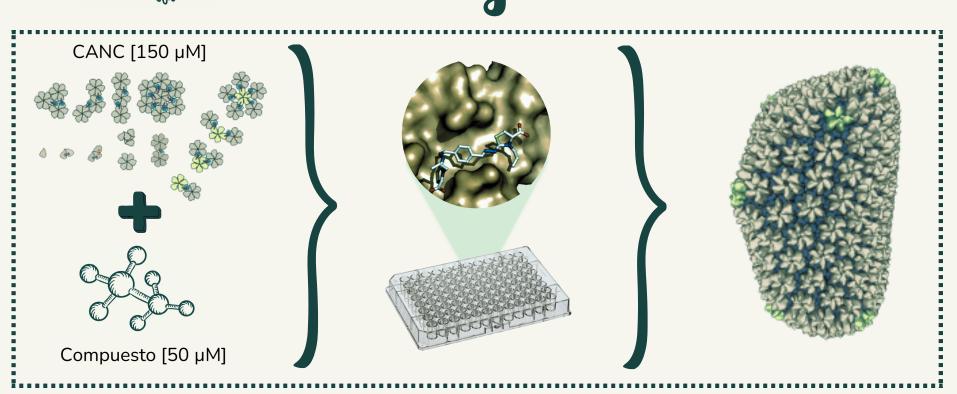


2. Objetivos

Profundizar en el estudio de los compuestos que alteran la multimerización de la cápside de VIH in vitro.

- Evaluar el efecto de los compuestos en la multimerización in vitro de la CA-NC.
- Estudiar la interacción de los compuestos con la proteína de la cápside mediante termoforesis a microescala utilizando la proteína CA wild type (CAwt) y una CA mutante (CAmut) resistente a Lenacapavir.
- Evaluar la actividad de los compuestos en un modelo in cellulo de infección por VIH.
- Trabajar en la elucidación de la naturaleza de la interacción mediante docking molecular

4. Ensayo de multimerización



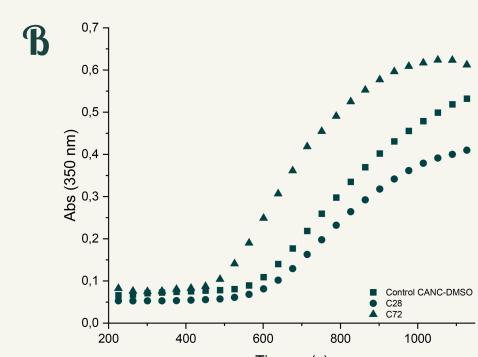


Figura 2. (A) Se realizó in vitro en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2. Se midió Abs a 350 nm cada 30 s a 42°C. Los compuestos se ensayaron a dosis fijas (0,5% DMSO) y se realizaron dos controles con la proteína en 0,5% DMSO y CANC sin DMSO. (B) Ejemplo de gráfico de Abs a 350 nm en función del tiempo, la pendiente de la porción lineal de las curvas se utilizó para calcular el porcentaje de alteración con la fórmula: % de alteración = pendienteCompuesto*100/pendienteControl, obteniendo un valor positivo o negativo para compuestos que aceleran (C72) o reducen (C28) la velocidad de multimerización de CANC, respectivamente.

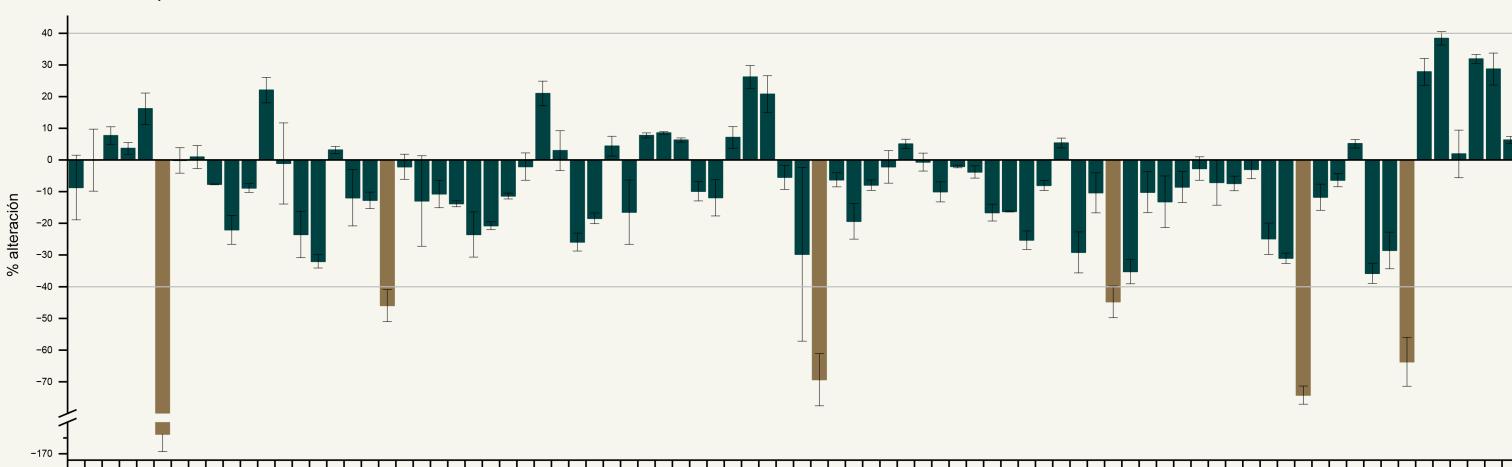


Figura 3. Porcentaje de alteración provocado por los compuestos sobre la multimerización de la CA-NC, las líneas horizontales de color gris claro indican el punto de corte del 40% utilizado para seleccionar candidatos para estudios posteriores (indicados en color mostaza).

6. Termoforesis a microescala

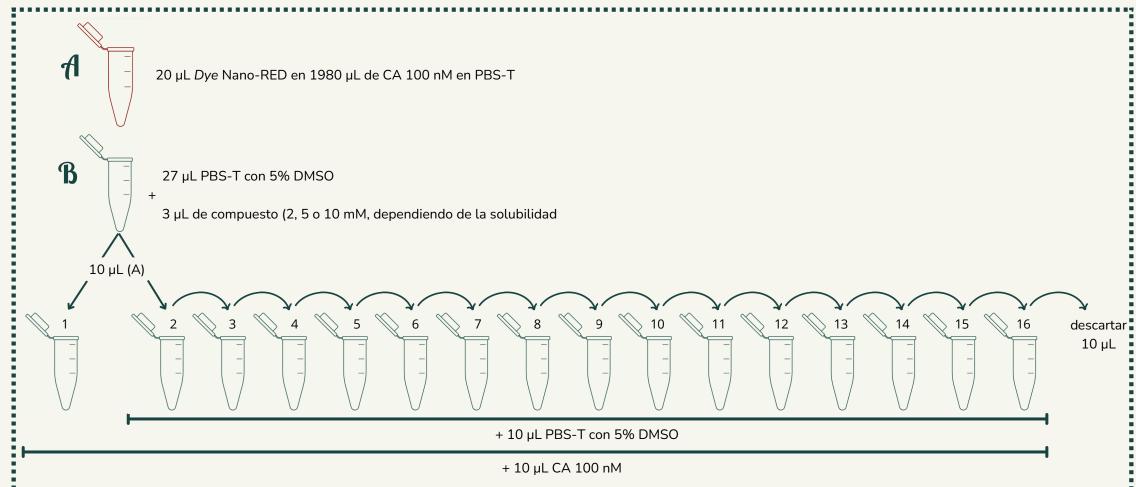


Figura 6. (A) se preparó la proteína CA a 100 nM en PBS con 0,05% Tween (PBS-T) con fluoróforo Nano RED. **(B)** se realizaron 16 diluciones seriadas a ½ en PBS-T con 5% DMSO y se agregó la proteína CA. Se estudió la afinidad de enlace de los compuestos con la proteína CA a 50 nM.

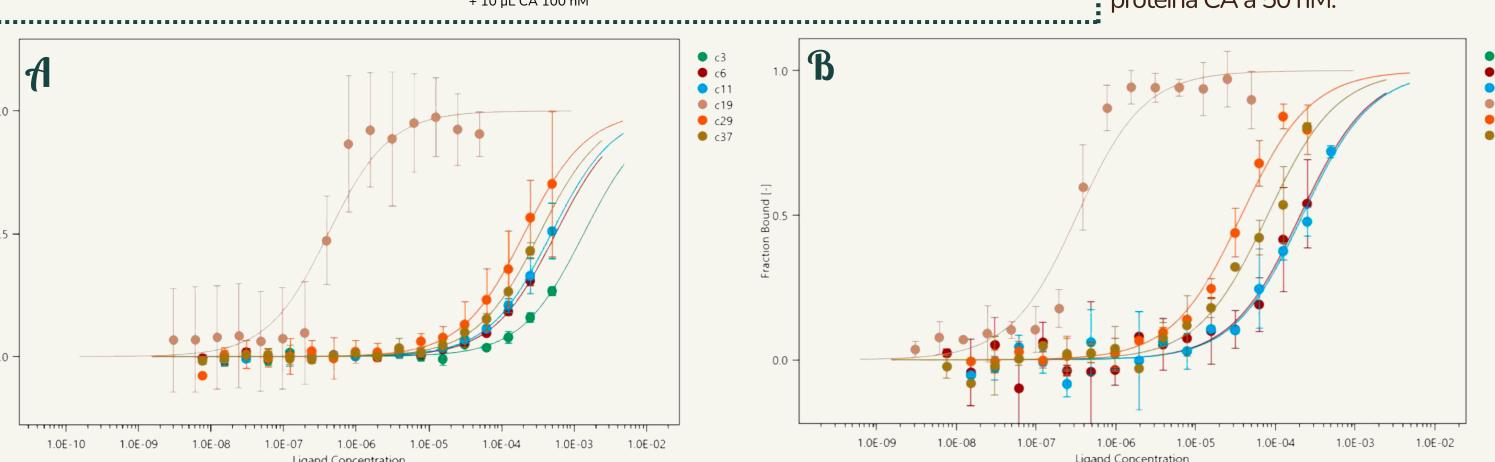


Figura 7. Evaluación MST de compuestos seleccionados, se grafica la media +/- SD de tres mediciones independientes, la concentración de ligando se expresa en mol/l. **(A)** CAwt, para la que se identificaron 4 compuestos (C3, C11, C29 y C37) con afinidades que oscilan entre 120 y 488 µM. **(B)** CAmut naturalmente resistente a Lenacapavir, C37 y C29 presentan afinidad 2 y 5 veces mayor por el mutante, respectivamente, siendo moléculas interesantes para cepas resistentes. Por el contrario, la unión de C3 no es detectable con la CAmut.



5. The Atomwise AIMS Program. Al is a viable alternative to high throughput screening: a 318-target study. Sci Rep 14, 7526 (2024).

1.OMS. (2022). Infección por el VIH. Recuperado de: https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids
2. Taiwo. (2009). Understanding transmitted HIV resistance through the experience in the USA. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases, 13(5), 552–559. Blassel et. al. (2021). 3. Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges. Current opinion in virology, 51, 56–64. 4. Blair et. al. (2010). HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. PLoS pathogens, 6(12), e1001220.