

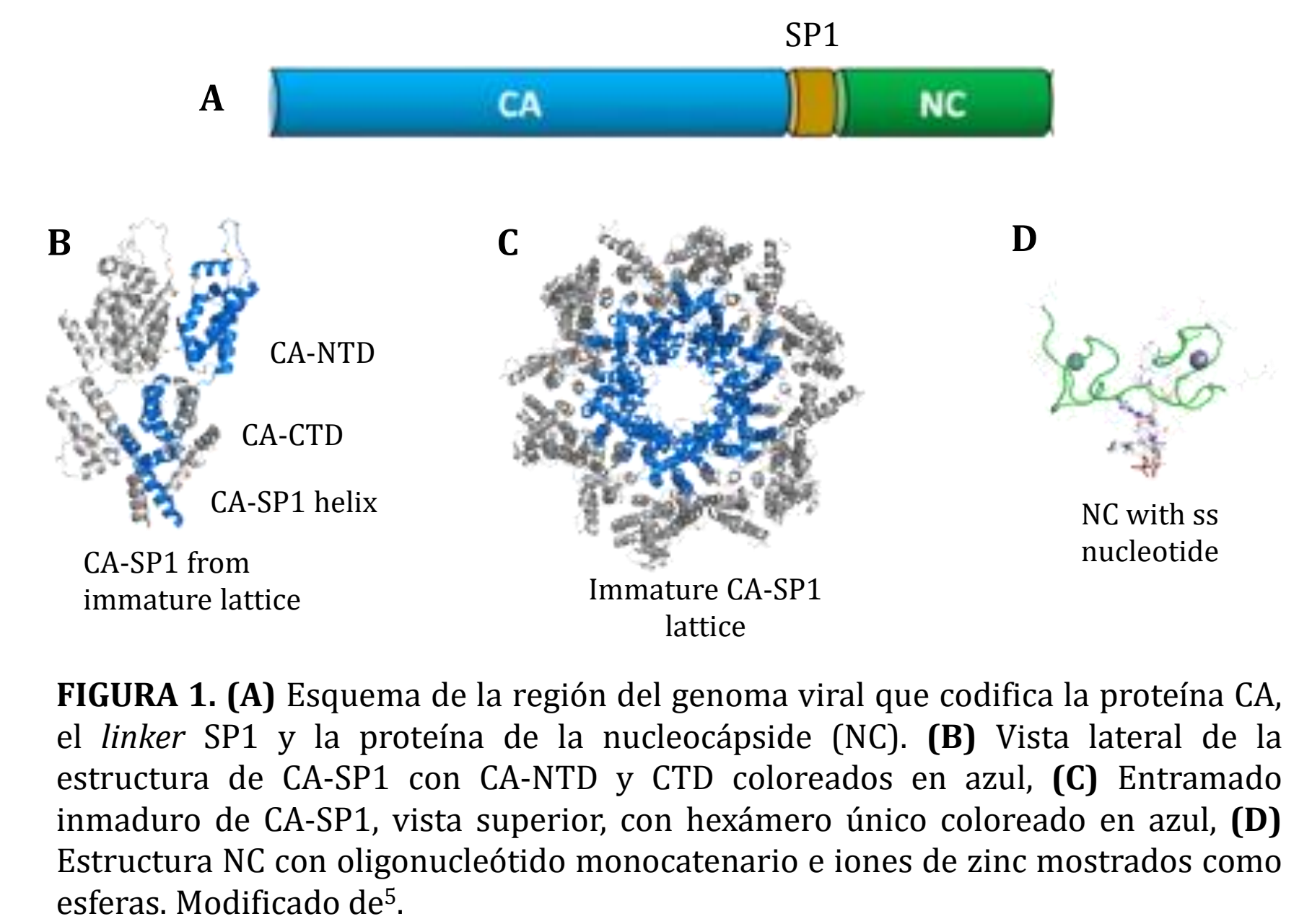
ESTUDIOS PRECLÍNICOS DE SEIS MOLÉCULAS QUE INTERFIEREN EN EL ENSAMBLAJE DE LA CÁPSIDE DEL VIH COMO POSIBLES FÁRMACOS ANTIRRETROVIRALES

Zoraima Artia¹, Maximiliano Granzella¹, Ana Clara Segovia¹, Xavier Robert², Christophe Guillon², Guzmán Álvarez¹, Ileana Corvo¹, Lía Randall¹

¹ Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.
² Equipe Rétrovirus et Biochimie Structurale, Institut de Biologie et Chimie des Protéines, Lyon, Francia.

INTRODUCCIÓN

- El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) afecta a unos 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 virus⁴.
- 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 *scrining* virtual masivo (Atomwise) con inteligencia artificial que identificó 84 moléculas que interaccionan con una región conservada en la interfase entre monómeros de la CA.



OBJETIVOS

General:

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

Específicos:

- Evaluar la interacción de los compuestos en la proteína CA *wild type* de VIH1 y comparar con una CA mutante resistente a Lenacapavir.
- Evaluar el efecto de los compuestos seleccionados en la multimerización *in vitro* de la CA-NC.
- Trabajar en la elucidación de la naturaleza de la interacción entre los compuestos seleccionados y la proteína CA mediante *docking* molecular y cristalografía de rayos X.

1. Termoforesis a microescala (MST)

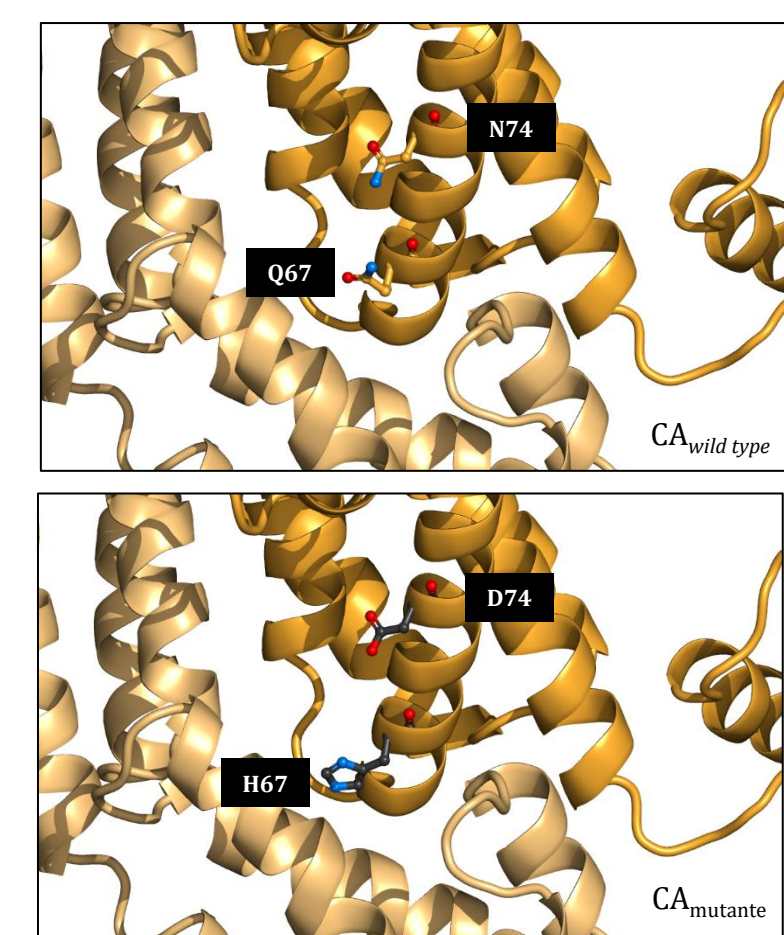


FIGURA 2. Estructura de la CA_{wild type} y CA_{mutante} en la región de unión al Lenacapavir, en ball & sticks se muestran los residuos que se modifican en la proteína mutante.

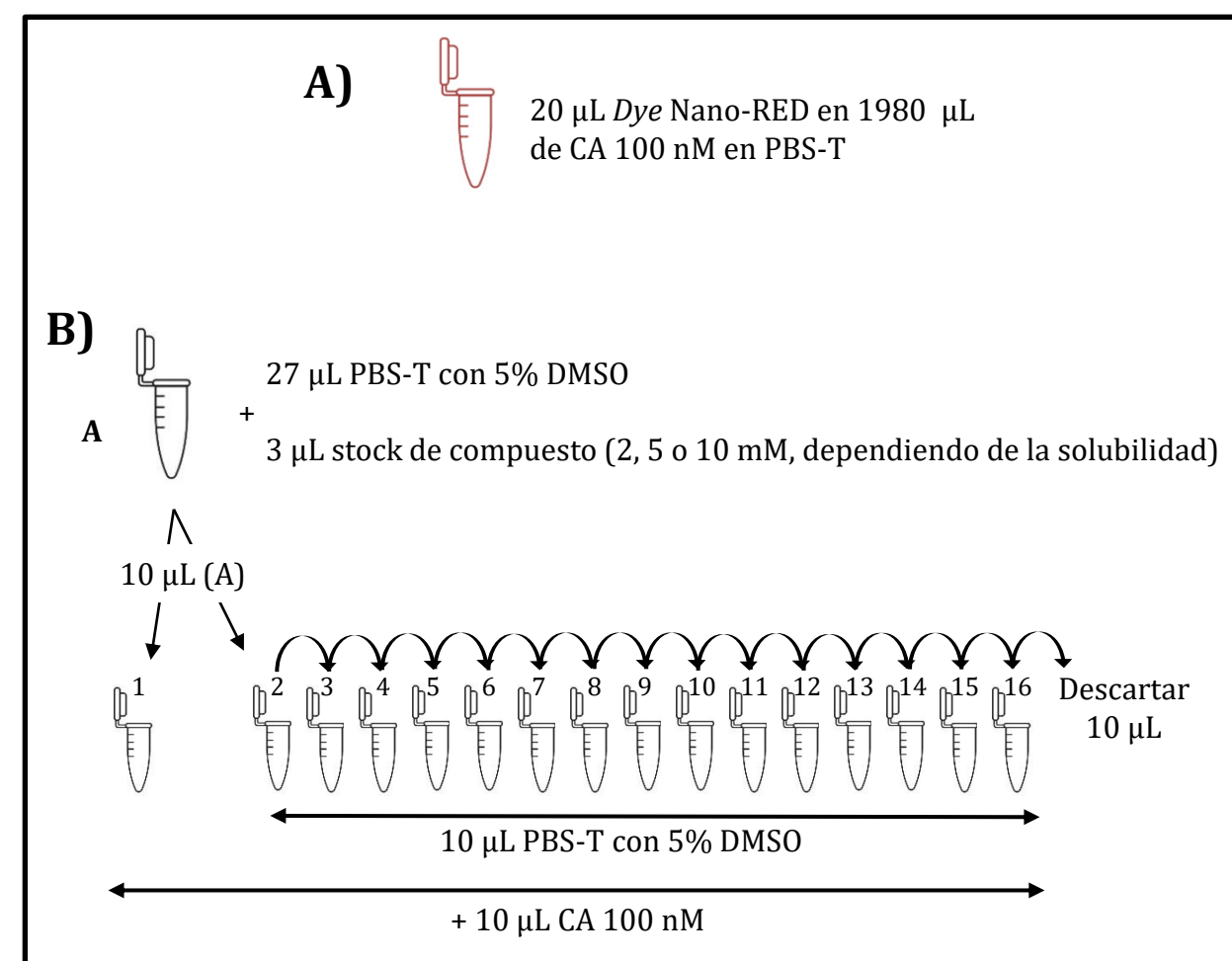


FIGURA 3. (A) se preparó la proteína CA a 100 nM en PBS con 0,05% Tween (PBS-T) con fluoróforo Nano-RED. (B) se realizaron 16 diluciones seriadas a 1/2 en PBS-T con 5% DMSO y se agregó la proteína CA. Se estudió la afinidad de enlace de los compuestos con la proteína CA a 50 nM en capilares Monolith NT.115, con una potencia de excitación del 40% y una potencia MST media en el equipo Monolith NT.115 (201703-BR-N005)

Compuesto	Concentración inicial*	Kd CA _{wild type}	Kd CA _{mutante}
C3	0,5 mM	434 μM	417 μM
C6	0,25 mM	177 μM	160 μM
C11	0,5 mM	401 μM	-
C19	0,1 mM	374 nM	345 nM
C29	0,5 mM	58,2 μM	37,2 μM
C37	0,25 mM	173 μM	70,5 μM

TABLA 1. Tabla comparativa de Constantes de disociación (Kd) para los compuestos con las proteínas CA_{wild type} y CA_{mutante}.
*La concentración ensayada de los compuestos depende de la solubilidad de los mismos.

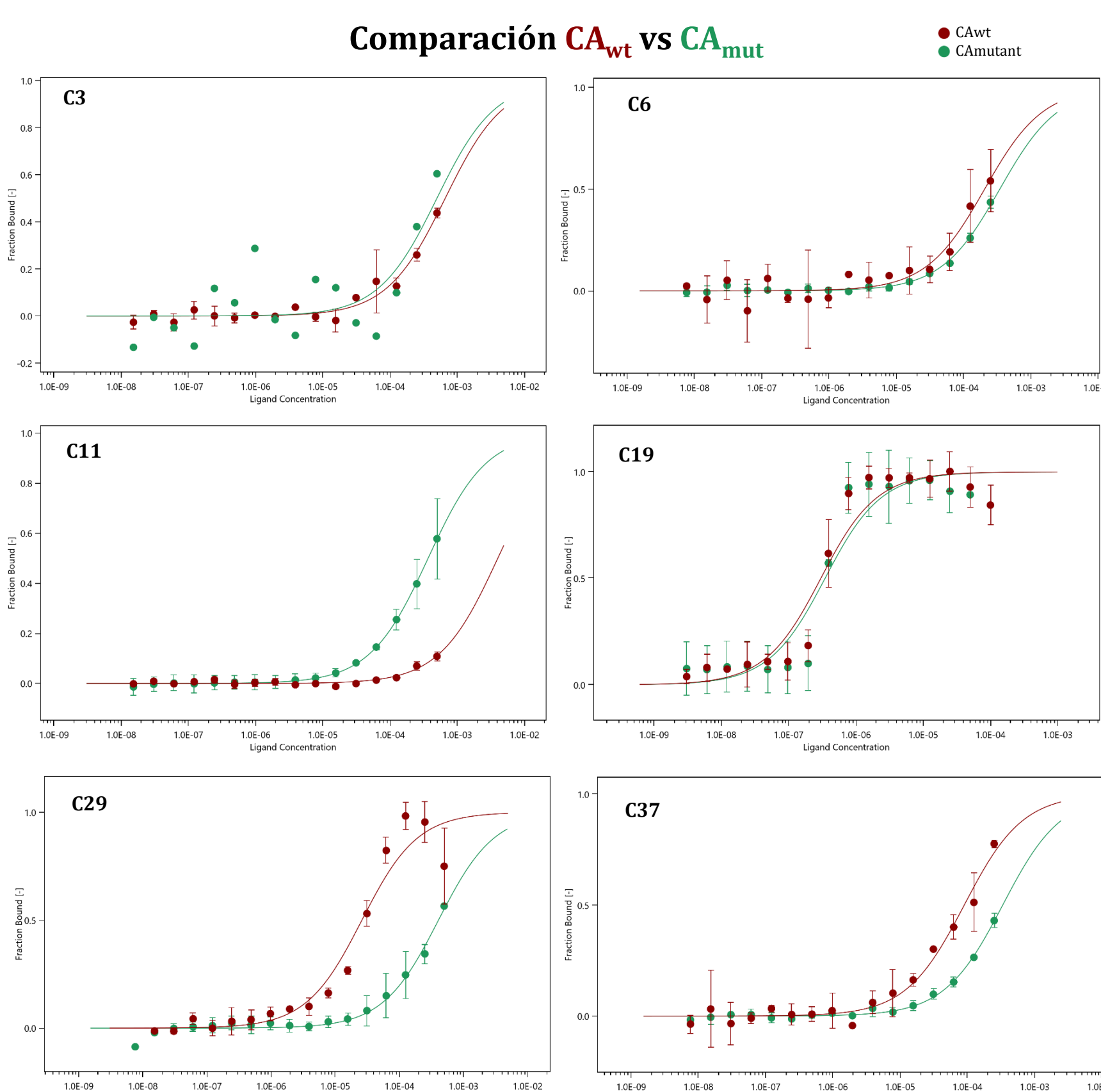


FIGURA 4. Comparación de las curvas obtenidas para CA_{wild type} y CA_{mutante} incubadas con los compuestos.

2. Ensayo de multimerización *in vitro*

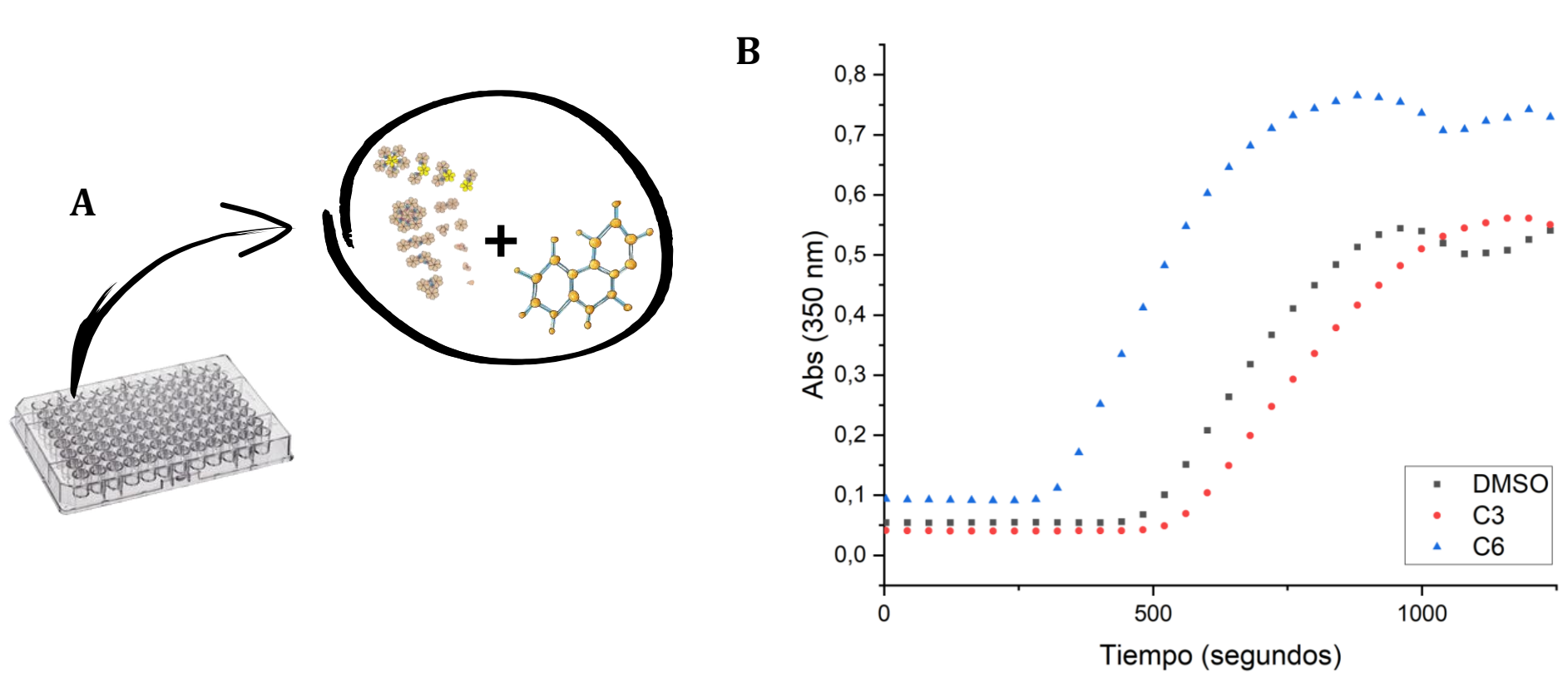


FIGURA 5. (A) El ensayo de multimerización *in vitro* se realizó en placas de 96 pocillos con la proteína CA-NC a 150 μM y dosis fijas de los compuestos de 50 μM (control con 0,5% DMSO) en buffer fosfato de sodio 50 mM, pH 8,2 y temperatura a 42°C como desencadenante de la multimerización. (B) Ejemplo de gráfico de absorbancia a 350 nanómetros en función del tiempo, en donde se observa en C6 una mayor pendiente y para C3 menos pendiente en relación al control con DMSO. (C) Gráfico de porcentaje de alteración provocado por los compuestos sobre la multimerización de la CA-NC, C6 es el único compuesto con una alteración significativa, acelerando el proceso en un 60%.

3. Docking

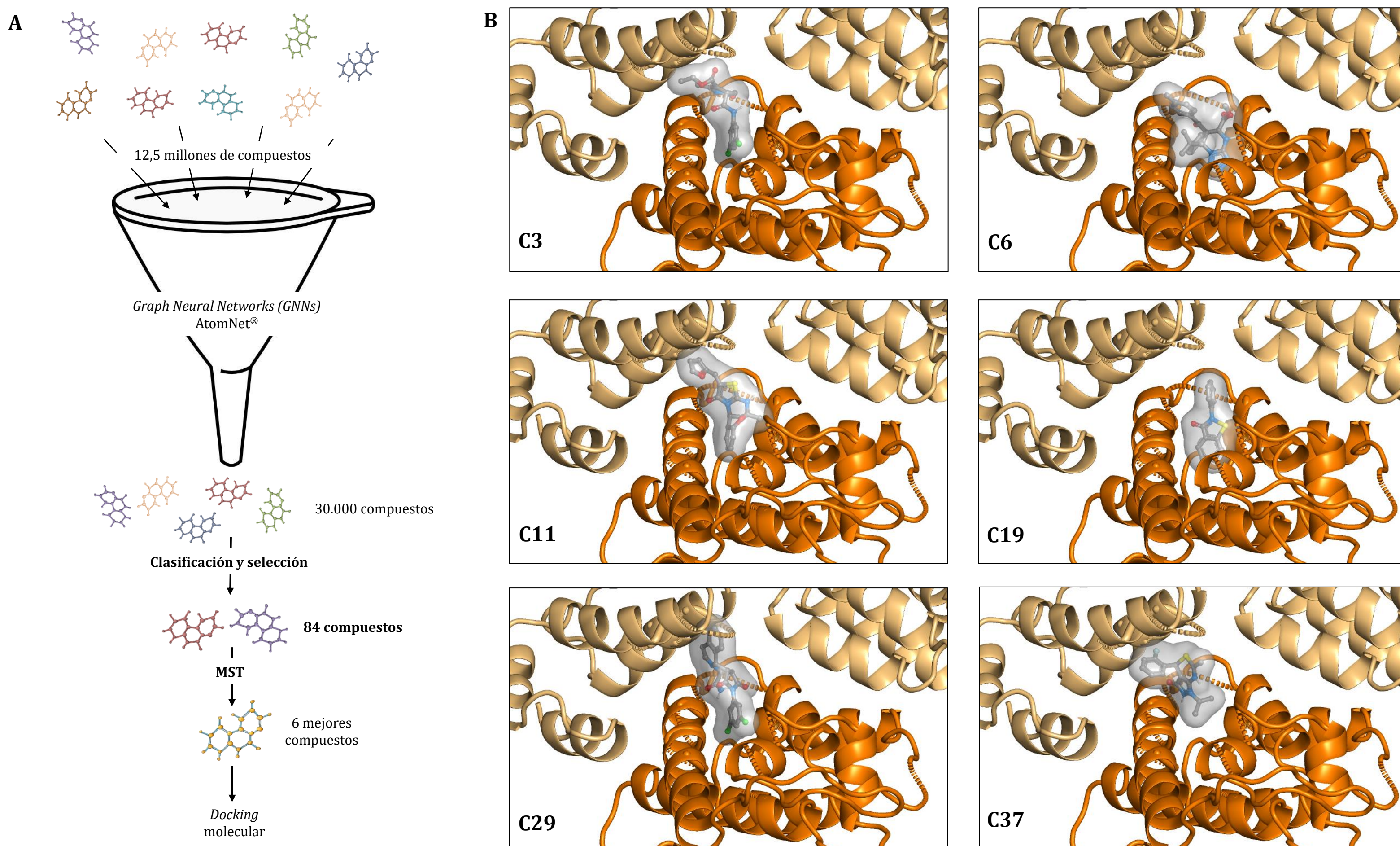


FIGURA 6. (A) Para el sitio altamente conservado seleccionado, la red neuronal analizó las coordenadas tridimensionales de cada complejo proteína-ligando, se elaboró una lista de 30.000 ligandos que se clasificaron para garantizar la diversidad y seleccionaron algorítmicamente los compuestos con mayor puntuación de cada grupo, 84 en total. Se realizó MST seleccionando los mejores 6 compuestos para realizar *docking* molecular y cristalografía de rayos X en CA-NC. (B) conformaciones de menor energía de los seis compuestos en el mismo sitio empleado para el *scrining* virtual masivo.

4. Cristalografía de rayos X

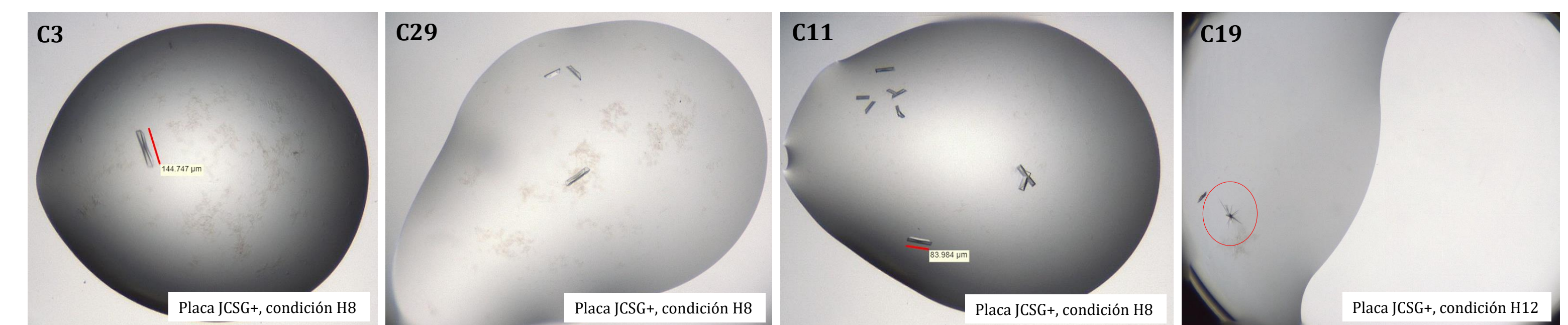


FIGURA 7. Se ensayaron 288 diferentes condiciones de cristalografía para la proteína CA-NC en 4 tipos diferentes de placas de 96 pocillos: Peg I, Peg II, AmSO₄ y JCSG+. Se observan cristales en la condición E8 de las placas JCSG+, que contiene como buffer 0.1 M Na Acet 4.5 pH y sal 1 M (NH₄)₂HPO₄. Además se realizó una optimización de las condiciones de la condición H12 que para C19 presentó pequeños cristales en forma de agujas (sal 0.2 M NH₄ Acet, buffer 0.1 M HEPES pH 7.5 y precipitante 45 %v/v MPD). Este ensayo se encuentra actualmente en proceso, teniendo como fecha de finalización febrero de 2024. Un vez culminado el ensayo se analizan los cristales en sincrotrón para determinar si se obtuvo cristalización de la proteína estudiada o si se obtuvieron cristales de sal.

Conclusiones

- C29 y C37 tienen mayor afinidad por CA_{wild type}, C11 por CA_{mutante} y para C3, C6 y C19 no existen diferencias significativas entre ambas proteínas.
- En presencia de C6 se observa un aumento significativo de la velocidad de multimerización *in vitro* de la CA-NC.
- C6 y C19 se posicionan más profundo en la hendidura de interacción con un monómero, mientras C3, C11, C29 y C37 interaccionan con dos monómeros.

Referencias

- OMS. (2022). Infección por el VIH. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
- 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.Blaiss et al. (2021).
- Drug resistance mutations in HIV: new bioinformatics approaches and challenges. Current opinion in virology, 51, 56-64.
- Blair et al. (2010). HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. PLoS pathogens, 6(12), e1001220.
- Lerner et al. (2022). Advances in HIV-1 Assembly. Viruses, 14(3), 478.

Agradecimientos

Agencia Nacional de Investigación e Innovación (FCE, 3, 2022, 1, 172494).
Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA).
Comisión Académica de Posgrado, Universidad de la República por otorgar beca de Maestría.
Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay.