Búsqueda de inhibidores de la multimerización de la proteína de la cápside del virus de inmunodeficiencia humana

Ciclo de Metodología Científica II
Grupo Nº 110

Autores:
Acuña, Agustina[1]
Fagundez, Facundo[1]
Peculio, Enzo[1]
[1]Ciclo de Metodología Científica II 2021, Dr. en Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.
Tutores:
Corvo, Ileana[2]
Randall, Lía[2]
[2] Laboratorio I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Uruguay.
Institución participante:
Laboratorio de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Sede Paysandú, Universidad de la República.

Índice de contenidos

Índice de figuras **3**

Resumen **4**

Abstract 5

Introducción 5

Generalidades de la infección por VIH 6

Ciclo viral y estructura de la cápside del VIH 6

La proteína CA como blanco farmacológico 8

Objetivos **11**

Objetivos general 11

Objetivos específicos 11

Metodología **12**

Transformación de E. coli BL21(DE3) 13

Expresión de la CANC del VIH en E. coli BL21(DE3) 13

Purificación de la CANC del VIH 13

Puesta a punto del ensayo in vitro de multimerización de la proteína CANC 15

Selección de las moléculas a ensayar en el screening 15

Screening de potenciales inhibidores de la multimerización de la proteína CANC 16

Resultados y discusión **17**

Transformación de bacterias con el plásmido conteniendo la secuencia de interés 17

Expresión y purificación de CANC de VIH recombinante 17

Cromatografía de intercambio catiónico 18

Cromatografía de exclusión molecular 19

Puesta a punto del ensayo de multimerización 20

Evaluación del efecto de los compuestos sobre la multimerización de CANC-VIH 24

Conclusiones y perspectivas **28**

Referencias bibliográficas **29**

Índice de figuras

Figura 1: Estructura y ensamblaje del core de la cápside del VIH-1 **8**
Figura 2: Secuencia y esquema de CANC **12**
Figura 3: Placa de transformación de *E. coli* BL21(DE3) con pET11a CANC **17**
Figura 4: Evaluación de la expresión y purificación de CANC recombinante mediante SDS-PAGE **18**
Figura 5: Cromatografía de intercambio catiónico **19**
Figura 6: Cromatografía de exclusión molecular **20**
Figura 7: Ensayo de multimerización de la proteína CANC-VIH en placa **22**
Figura 8: Ensayo de multimerización de la proteína CANC-VIH en cubeta **23**
Figura 9: Multimerización de CANC-VIH **24**
Figura 10: Estructura y porcentaje de inhibición de los compuestos evaluados **25**

Índice de tablas

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de los compuestos evaluados **27**

Resumen

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus perteneciente a la subfamilia de los lentivirus. Es un virus ARN con la capacidad de regular su replicación dentro de la célula del hospedero. Su estructura básicamente se compone por una bicapa externa, por debajo de esta envoltura se encuentra la matriz y, en el centro, se encuentra el *núcleo* del virus con forma cónica cuya proteína principal es la proteína CA, proteína central en este estudio. Esta proteína forma parte de la poliproteína Gag cuyo procesamiento proteolítico da lugar a las proteínas que forman la matriz y la nucleocápside (1).

La cápside del VIH-1 juega un rol crucial tanto en pasos tempranos como en etapas más tardías de la infección. Su correcto ensamblaje y estructura es fundamental para la infectividad del virus (2). Varios factores del huésped interaccionan con la cápside del VIH-1, y las sustituciones de aminoácidos o inhibidores químicos que perturban estas interacciones pueden inhibir la infección por el VIH. Además, compuestos y péptidos que previenen la formación de la cápside viral madura pueden inhibir la replicación del virus. La alta conservación de su secuencia aminoacídica y su alta sensibilidad a la mutagénesis, apoyan el rol fundamental de la misma en el éxito de supervivencia del virus. Estos factores permiten suponer que los antivirales dirigidos a la cápside viral podrían convertirse en terapias efectivas frente al VIH-1 (3).

Identificar moléculas que puedan inhibir el ensamblaje de la cápside viral (específicamente la multimerización de la proteína de la cápside) permitiría aportar un nuevo modelo de fármacos para el tratamiento de la infección por VIH-1.

Abstract

The Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a retrovirus belonging to the subfamily of lentiviruses. It is an RNA virus with the ability to regulate its replication within the host cell. Its structure basically consists of an external bilayer, below this envelope is the matrix and, in the center is the core of the cone-shaped virus whose main protein is the CA protein, the central protein in this study. This protein is part of the Gag polyprotein whose proteolytic processing gives rise to the proteins that form the matrix and the nucleocapsid (1).

The HIV-1 capsid plays a crucial role in both early and later stages of infection. Its correct assembly and structure is essential for the infectivity of the virus (2). Several host factors interact with the HIV-1 capsid, and amino acid substitutions or chemical inhibitors that disrupt these interactions can inhibit HIV-1 infection. In addition, compounds and peptides that prevent the formation of the mature viral capsid can inhibit virus replication. The high conservation of its amino acid sequence and its high sensitivity to mutagenesis support its fundamental role in the survival success of the virus. These factors suggest that antivirals targeting the viral capsid could become effective therapies against HIV-1 (3).

Identifying molecules that can inhibit viral capsid assembly (specifically capsid protein multimerization) would provide a new drug model for the treatment of HIV-1 infection.

Palabras clave

VIH
CANC
Multimerización
Inhibidores
Cápside

Introducción

Generalidades de la infección por VIH

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) afecta cerca de 37 millones de personas en el mundo (4). En Uruguay la prevalencia de infección por virus de inmunodeficiencia humana es inferior al 1%. En la actualidad se cree que aproximadamente 13.350 personas son seropositivas (5). La historia natural de la infección por el VIH consiste en una primoinfección, que es asintomática o pasa desapercibida en más de la mitad de los casos, seguida de un período de latencia clínica de varios años en el que el virus sigue replicándose de forma activa en diversos compartimentos y en sangre periférica. En el siguiente período, la mayoría de los pacientes desarrollan infecciones oportunistas o neoplasias como consecuencia de una profunda inmunodepresión. A esta fase o período final se le denomina síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La introducción de tratamientos antirretrovirales (TARV) muy potentes a partir de 1996 ha conseguido restaurar parcialmente la inmunidad celular, retrasar considerablemente o evitar la progresión clínica y reducir de forma notable la mortalidad (6).

De los 28 fármacos aprobados por la FDA que se utilizan actualmente en el TARV, ninguno de ellos inhibe directamente la estabilidad de la cápside viral. La mayoría de los medicamentos disponibles en el mercado contra el VIH se dirigen a las enzimas transcriptasa inversa y proteasa. En general, los compuestos implicados en el tratamiento de esta infección pertenecen a uno de los siguientes tipos: (a) inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleosídicos; (b) inhibidores de la transcriptasa inversa nucleosídicos; y (c) inhibidores de la proteasa del VIH (7). Debido a los efectos secundarios de los fármacos y la aparición de variantes virales resistentes a múltiples fármacos, que se ha visto en aumento, generando una complicación adicional para el tratamiento de esta enfermedad (6), es necesario identificar nuevos fármacos que sean adecuados para su uso a largo plazo y que puedan complementar los regímenes de medicamentos actualmente disponibles. Algunos de los nuevos fármacos candidatos han sido revisados en la literatura y se han identificado sus ventajas y desventajas para una posible quimioterapia anti-VIH, incluyendo a la proteína de la cápside viral (CA) como posible blanco molecular (7).

Ciclo viral y estructura de la cápside del VIH

El VIH es un virus ARN perteneciente a la familia retroviridae, presenta una morfología esférica recubierto por una envoltura lipídica proveniente de la membrana citoplasmática de la célula del huésped. El *core* se presenta en forma de cono truncado, formado por una proteína que

contiene en su interior la información genética viral en dos monohebras casi idénticas de ARN, un ARN de transferencia y tres enzimas requeridas para la replicación viral: retrotranscriptasa, proteasa e integrasa (8). El comienzo de la infección por VIH implica la fusión de las membranas del virus con la del hospedero. Posterior a este primer paso se introduce en el citoplasma la cápside viral. Esta estructura está compuesta por aproximadamente 1500 unidades de proteína CA y dentro de esta envoltura se encuentra el material genómico viral y proteínas necesarias para la transcripción reversa del mismo (9). Por lo tanto la cápside constituye una capa protectora del componente genético del virus desde la infección hasta la integración en los cromosomas de la célula humana.

La cápside se genera mediante proteólisis de los precursores Gag y Gag Pol. De estos dos precursores provienen también las proteínas de la matriz (MA), la nucleocápside (NC), el péptido espaciador 1 (SP1), el péptido espaciador 2 (SP2) y el péptido 6. La proteína CA forma hexámeros y pentámeros con otras proteínas CA. En los precursores Gag y Gag Pol la proteína CA está unida a MA y SP1 (2). Aproximadamente el 11% de Gag también consiste en fusiones con proteasas, polimerasas e integrasas (8). Durante el procesamiento de estos precursores, primero se escinde la unión CA-MA y posteriormente, tras un cambio conformacional de SP1, se escinde la unión SP1-CA; obteniendo así la proteína CA libre y apta para la multimerización (2). La CA adquiere así la capacidad de formar nuevas interacciones entre las subunidades; sufre un cambio conformacional donde se colapsa con NC y forman un núcleo cónico, mientras la MA permanece asociada a la envoltura viral (8). Varios estudios han demostrado que la CA sola o como parte de la proteína de fusión CA-NC puede multimerizar en dímeros, oligómeros y tubo-polímeros en distintas condiciones (8). La proteína CA se compone estructuralmente por dos dominios globulares, uno N-terminal (NTD) y otro C-terminal (CTD) interconectados por un espaciador flexible. El NTD está formado por siete hélices alfa y una horquilla beta mientras que el CTD está compuesto por cuatro hélices alfa. Cada uno de estos dominios multimeriza formando hexámeros y pentámeros (2). Aproximadamente 250 hexámeros junto a 12 pentámeros conforman la estructura del cono de fulereno de 120 nm de largo y 60 nm de ancho; aunque esto puede variar debido al alto grado de pleomorfismo de la proteína CA (Figura 1) (2).

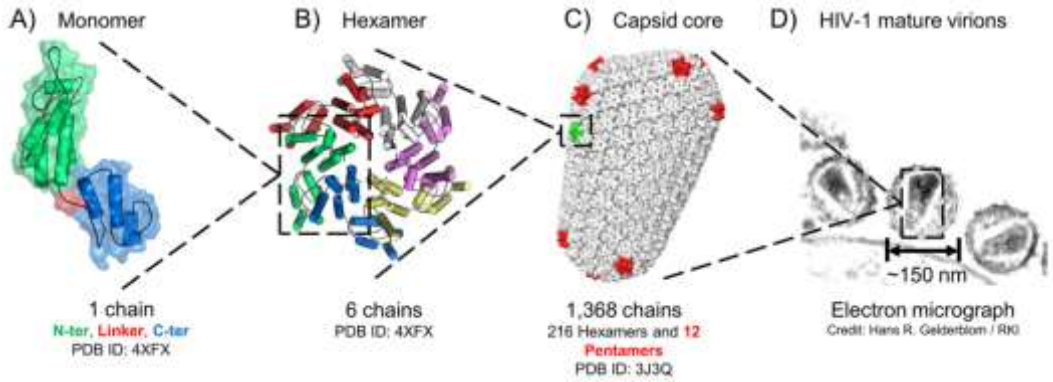


Figura 1. Estructura y ensamblaje del core de la cápside del VIH-1. La proteína de la cápside se pliega para formar dos dominios conectados por un enlazador flexible **(A)** y forma hexámeros **(B)** y pentámeros (rojo) en el núcleo maduro **(C)**, que encierra el ARN viral y finalmente alberga la transcripción inversa **(D)**. Figura tomada de (10).

La cápside juega un papel importante tanto en las etapas iniciales como en las tardías del ciclo de replicación del VIH-1. Después de la entrada del virus en las células huésped, la cápside en forma de cono intacta se libera en el citosol celular y se desmonta de forma coordinada para permitir la transcripción inversa y la integración del genoma para un establecimiento eficaz de la infección por el VIH (11). Durante el ensamblaje de las partículas del virus, los dominios de la cápside interactúan con la poliproteína Gag que sufre una escisión proteolítica y transforman las partículas inmaduras a viriones maduros (11). Tras la formación de viriones maduros, los monómeros de CA se ensamblan empaquetando el genoma de ARN viral y otras proteínas (11).

La proteína CA como blanco farmacológico

La proteína CA de la cápside del VIH-1 es un blanco molecular relativamente poco explorado para el desarrollo de inhibidores de este virus que ha atraído una atención considerable en los últimos años (11). Estudios recientes revelan que la infección por VIH depende fundamentalmente de las funciones de la cápside viral, por ello la importancia de descubrir moléculas que se unan a la misma en diferentes pasos donde esté implicada, para impedir la infección (12). El tratamiento de esta enfermedad infecto-contagiosa no es curativo, por lo que los pacientes deben recibir TARV durante toda su vida. La terapia antirretroviral que utiliza varias combinaciones de inhibidores de moléculas pequeñas ha sido muy eficaz para controlar el VIH. Sin embargo, los medicamentos que se utilizan en este régimen son costosos, causan efectos secundarios y enfrentan resistencia viral (13).

Luego de la penetración del virus a la célula diana se dan una serie de procesos para desmontar la cápside, conocidos como desenmascaramiento. Si la cápside viral está inestabilizada por algún factor, puede darse un desenmascaramiento prematuro dando así una transcripción inversa

atenuada y una infección inefectiva. Dentro de la célula y en su camino hacia el interior del núcleo la cápside interactúa con diversas estructuras que pueden favorecer la infección (10). En este sentido, moléculas pequeñas que tienen afinidad por la cápside pueden alterar la estabilidad de la estructura, competir por la unión con el componente del huésped e interferir en la infección. También algunas moléculas inhibidoras podrían interferir con la fase final de la replicación del virus, al momento del montaje de la cápside, donde los procesos de ensamblaje de CA son críticos, así como también lo es su maduración (12).

La importancia de la cápside viral como blanco atractivo para el desarrollo de fármacos se vio reforzada durante los últimos años por la identificación de varios inhibidores de su ensamblaje. Hasta ahora, solo una de estas moléculas, Bevirimat, entró en ensayos clínicos de fase II. Bevirimat es un inhibidor de la maduración del precursor proteico Gag que se une a éste en el sitio de escisión CA/SP1 inhibiendo específicamente la escisión de la proteína CA de la proteína espaciadora SP1. La proteína de la cápside permanece unida a SP1 dando como resultado la producción de partículas virales inmaduras no infecciosas (2).

Por otro lado, se han identificado varias moléculas pequeñas que se unen a la cápside, inhibiendo la replicación viral (14). Uno de los inhibidores más estudiados es el PF-3450074, también conocido como PF74 (15). Esta molécula inhibe la infección, bloquea la transcripción inversa y previene la replicación *in vitro*, uniéndose en la interfaz de CA entre el NTD y el CTD (3, 16, 17). Por lo tanto, PF74 ha resultado ser una molécula pequeña y atractiva para estudiar el papel de CA en la infección por VIH-1 (3).

Por su lado, los inhibidores de la cápside del VIH-1, GS-CA1 y GS-6207 recientemente evaluados, son los primeros compuestos de su clase con potencial de acción prolongada. Según se informa, ambos compuestos tienen mayor potencia que los fármacos anti-VIH aprobados actualmente. Aún no se ha definido un mecanismo detallado de su inhibición pero se sabe que se unen en el bolsillo que comparten los inhibidores de CA (18).

También se ha trabajado sobre el diseño de un péptido cíclico que combina unidades estructurales de GS-CA, factores del huésped e inhibidores de la cápside previamente informados. El péptido resultante (Pep-1) se une a CA-hexámero con una puntuación de acoplamiento comparable a los compuestos de GS-CA. La determinación de la afinidad mediante ensayos de termoforesis MicroScale (MST) mostró que CA se une a Pep-1 con una afinidad ~ 7 veces mayor que el inhibidor de la cápside PF74 bien estudiado, lo que sugiere que puede desarrollarse como un posible inhibidor de CA (18).

Los resultados obtenidos de los análisis estructurales comparativos y de acoplamiento flexible presentados en (18) muestran que los compuestos GS-CA1 y GS-6207 contienen características estructurales que están presentes en varios inhibidores de moléculas pequeñas de

CA previamente descubiertos, así como en factores del huésped que interactúan con CA. Un tamaño significativamente mayor de GS-CA1 y GS-6207 en comparación con PF74 probablemente asegura contactos adicionales con CA (18).

Como se comentó anteriormente, la proteína CA tiene múltiples funciones en el ciclo viral, postulándose como una buena diana terapéutica. Característicamente CA es muy sensible a las mutaciones, por tanto su secuencia es muy conservada, lo que permite asumir una menor generación de resistencia a fármacos dirigidos contra esta proteína y mayor durabilidad terapéutica (12). En este sentido, en este trabajo se plantea expresar y purificar la proteína CANC recombinante para identificar moléculas capaces de inhibir su multimerización *in vitro* como potenciales fármacos para el tratamiento de la infección por el VIH.

Objetivos

Objetivo general

Identificar moléculas capaces de inhibir la multimerización de la proteína de la cápside del VIH *in vitro.*

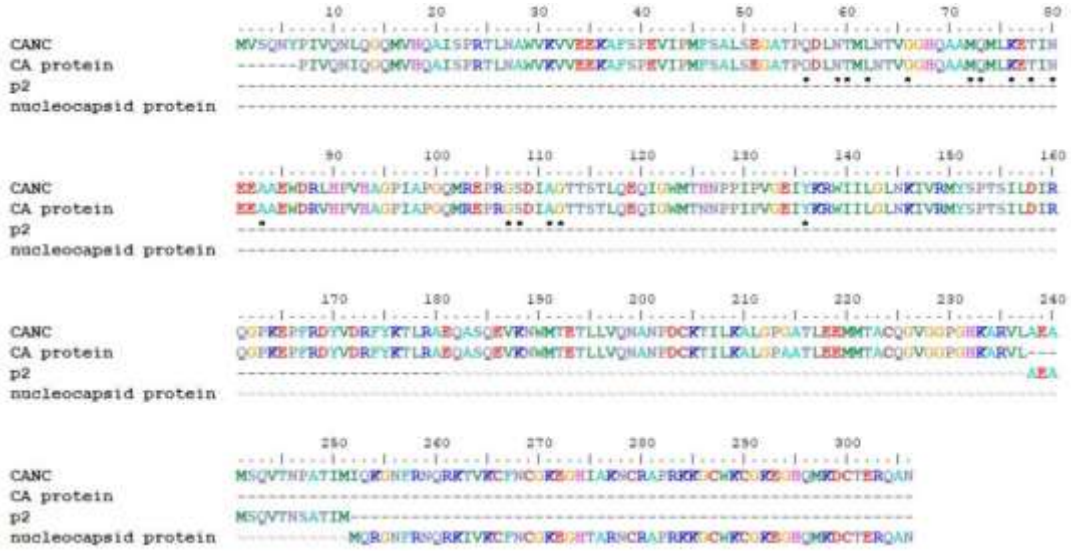
Objetivos específicos

1. Transformar *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido conteniendo la secuencia codificante de CANC.
2. Expresar y purificar la proteína de la cápside del VIH-1 recombinante.
3. Poner a punto el ensayo de multimerización *in vitro*.
4. Evaluar el efecto a dosis fija de distintas moléculas en la multimerización de la proteína de la cápside.

Metodología

Para la expresión de la proteína de la cápside del VIH se utilizará una construcción gentilmente cedida por el laboratorio del Dr. Michael Summer (University of Maryland, Baltimore County), donde el gen CANC está clonado en el plásmido pET11a. CANC es parte del gen policistrónico codificante de la proteína Gag del VIH, contiene la secuencia que codifica para la proteína de la cápside (CA), el péptido espaciador SP1 y la proteína de la nucleocápside (NC) (Figura 2).

A



B

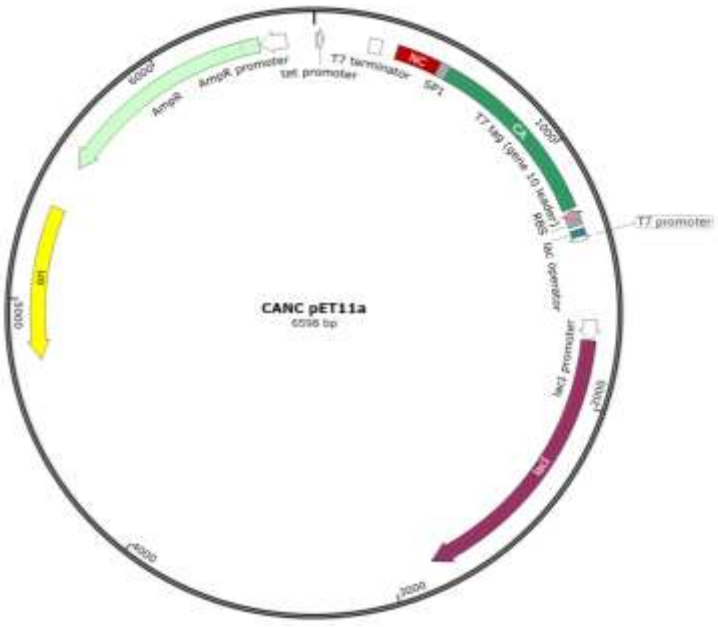


Figura 2. (A) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína CANC con la proteína CA, el péptido p2 y la proteína de la nucleocápside del VIH. Con asteriscos se señalan los residuos conservados que interaccionan con Nup153. **(B)** Esquema de la CANC clonada en el vector pET11a bajo el control del promotor T7. Figuras generadas en Bioedit (A) y Snapgene (B)

Como se observa en la Figura 2 la proteína CANC tiene un total de 307 aminoácidos. Utilizando la herramienta ExPASy (https://web.expasy.org/compute_pi/) se determinó el peso molecular (PM) estimado en 34.1 kDa y el punto isoeléctrico en 9.06.

Transformación de *E. coli* BL21(DE3)

Se preparan los medios y soluciones a utilizar y se esterilizan mediante autoclavado o filtración por 0.22 µm. Para el crecimiento de *E. coli* se emplea medio Luria Bertani (LB). Se preparan bacterias quimiocompetentes en el laboratorio mediante dos lavados sucesivos con $CaCl_2$ 100 mM y se transforman por choque térmico (3 min. a 37°C) con 100 ng del plásmido conteniendo la secuencia del gen de fusión CANC, según lo descrito en (19). Luego de la transformación se siembran en placas LB agar con 50 µg/mL de ampicilina para la selección de los clones transformados.

Expresión de la CANC del VIH en *E. coli* BL21(DE3)

Se inoculan 3 mL de medio de cultivo LB con ampicilina 50 µg/mL con una colonia de las bacterias previamente transformadas. El precultivo crece toda la noche en agitación orbital a 37°C. Al día siguiente se realiza el escalado a matraces de 5 L con 1 L de LB con ampicilina 50 µg/mL. Se crecen las bacterias en agitación orbital a 37°C hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.6. Se induce la expresión de la proteína con IPTG 1 mM y se deja agitando a 20°C toda la noche. Se colectan las bacterias por centrifugación a 6.500 x g, 15 min a 4°C. Se recolecta el *pellet* obtenido, se pesa y se congela a -20°C. La inducción de la expresión de la proteína recombinante se verifica por electroforesis SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras.

Purificación de la CANC del VIH

Lisis. Las bacterias obtenidas durante la expresión se descongelan en hielo. Se resuspenden en amortiguador fosfato de potasio 25 mM, 500 mM NaCl, pH 6.0 conteniendo 5 mM ß-mercaptoetanol (ß-ME), lisozima 1 mg/mL e inhibidores de proteasas. Se utilizan 100 mL de amortiguador de lisis cada 2 L de medio de cultivo. Se sonican las bacterias hasta la homogeneización de la suspensión. Se clarifica la fracción soluble por centrifugación a 13.000 x g, durante 15 minutos a 4°C.

Precipitación con polietilenimina (PEI). Se agregan 1.5 mL de PEI al 10% cada 100 mL de lisado. Se incuba en agitación orbital a 4°C por 2 horas. Pasado ese tiempo se centrifuga a 13.000 x g, por 15 minutos a 4°C.

Precipitación con sulfato de amonio ($AmSO_4$). Se realiza un primer paso de precipitación con sulfato de amonio al 10%. Para calcular la masa de $AmSO_4$ a agregar se utiliza la aplicación de www.encorbio.com. Se deja incubar en agitación orbital a 4°C durante 1 hora. Pasado ese tiempo se centrifuga a 13.000 x g, durante 15 minutos a 4°C. Se recupera el sobrenadante y se agrega $AmSO_4$ hasta un 25% (partiendo del 10% anterior). Se deja nuevamente en agitación orbital a 4°C durante 1 hora. Se centrifuga a 13.000 x g, a 4°C durante 15 minutos y se descarta el sobrenadante. Se resuspende el precipitado en amortiguador fosfato de potasio 25 mM, 1.5 mM fosfato de sodio, pH 6.0, con 5 mM ß-ME (30 mL cada 2 L de cultivo). Se dializa toda la noche contra 2 L de amortiguador fosfato de potasio 25 mM, 50 mM NaCl, pH 6.0, 5 mM ß-ME, en agitación orbital a 4°C. En cada uno de estos pasos se toma una alícuota de 20 µL que se guarda a -20ºC para posteriormente analizar por SDS-PAGE.

Cromatografía de intercambio iónico. Finalizada la diálisis, se recupera el lisado celular y se centrifuga a 18.000 x g, 30 min a 4°C. Se recupera la fracción soluble, se filtra con jeringa y filtro de 0.45 µm y se siembra en una columna CM FF 16/10 (GE) conectada a un equipo AKTA Pure, previamente lavada y equilibrada con amortiguador fosfato de sodio 25 mM, 50 mM, pH 6.0 con 5 mM ß-ME. Se colecta la fracción no unida y se lava la columna con el mismo amortiguador, colectando la fracción correspondiente. Se eluye mediante gradiente lineal de 0 a 100% en 10 volúmenes de columna con amortiguador fosfato de potasio 25 mM, 1 M NaCl, pH 6.0, 5 mM ß-ME. Se colectan las fracciones con absorbancia a 280 nm y se analizan por SDS-PAGE.

Cromatografía de exclusión molecular (SEC). Se colectan las fracciones del intercambio iónico conteniendo la proteína de interés y se concentran por centrifugación a 4°C hasta obtener un volumen de 500 µL. Se centrifuga a 18.000 x g, 30 minutos a 4°C y se siembra la muestra obtenida y clarificada en una columna Superdex 75 10/300 (GE) conectada a equipo AKTA Pure, previamente lavada y equilibrada con amortiguador 20 mM Tris, 5 mg $MgCl_2$, 140 mM KCl, 10 mM NaCl, 5 mM ß-ME, pH 7.5. Se sigue la corrida por absorbancia a 280 nm y se colectan las fracciones correspondientes a los picos de absorbancia para ser analizadas por SDS-PAGE. Las fracciones conteniendo proteína pura se juntan, se les realiza un espectro de absorbancia para cuantificar la CANC, se alicuotan y se congelan a -20°C hasta su uso.

Análisis de las fracciones colectadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). Las fracciones colectadas durante la purificación se analizan en geles desnaturalizantes al 12% acrilamida, en presencia de un agente reductor. Los geles se prepararon siguiendo el protocolo descrito en (20). Se utilizó el marcador de PM GE (17-0446-01).

Cuantificación de la CANC. Previo a cada experimento, se descongela la proteína, se centrifuga durante 5 minutos a 10.000 x g y se recupera el sobrenadante. Para determinar la

concentración de proteína se realizan diluciones en amortiguador y se realiza un espectro de absorbancia entre 250 y 350 nm. Los valores de absorbancia a 280 nm se promedian y se calcula la concentración utilizando la ecuación de Lambert-Beer y el valor del coeficiente de absortividad molar teórico (40.950 $M^{-1}cm^{-1}$) obtenido a partir de la secuencia de aminoácidos utilizando la herramienta ProtParam de Expasy (https://web.expasy.org/cgi-bin/protparam/protparam).

Puesta a punto del ensayo *in vitro* de multimerización de la proteína CANC

Los ensayos cinéticos de multimerización *in vitro* se realizaron siguiendo la turbidez a 350 nm, según lo descrito en (21). La mezcla de reacción de ensamblaje de CANC se realizó en un volumen final de 100 µL en placas de 96 pocillos o en cubeta de cuarzo utilizando una concentración final de proteína entre 11 y 180 µM, en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0. La absorbancia a 350 nm se midió en función del tiempo, en un lector de placas Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™) o en espectrofotómetro Cary 60 UV-Vis durante 30-60 minutos. Para la puesta a punto del ensayo se evaluó la reacción de multimerización a diferentes concentraciones de la proteína CANC y se siguieron dos estrategias: (i) la multimerización en presencia de sales se realizó a 25°C en presencia de 1.12 ó 2.25 M NaCl, (ii) la multimerización en ausencia de sales se ensayó siguiendo la turbidez a 37°C. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el programa OriginPro 9.1.

Selección de las moléculas a ensayar en el *screening*

Las moléculas a utilizar fueron proporcionadas por la empresa Atomwise en el marco de un convenio en marcha con el laboratorio (número de expediente 311170-000625-20, Project IDA19-478). Para esto, Atomwise realizó un *screening* virtual de la interacción de la proteína de la cápside del VIH con millones de moléculas comerciales utilizando la plataforma AtomNet®, una red neuronal de aprendizaje profundo para el diseño y descubrimiento de fármacos basado en estructuras, que permite predecir la afinidad de unión de moléculas pequeñas a proteínas cuya estructura esté disponible. Para dicho *screening*, se seleccionó una región estructuralmente conservada del NTD en la proteína CA de VIH y del virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), el sitio de unión al péptido Nup153, una nucleoporina celular cuya unión a la cápside es esencial para la infección (Figura 2). El programa utilizó el pdb 4NX4 de la CA de VIH, y seleccionó un subconjunto final de 72 compuestos que fueron enviados al laboratorio para realizar los estudios *in vitro* planteados, algunos de los cuales se utilizaron en este trabajo.

***Screening* de potenciales inhibidores de la multimerización de la proteína CANC**

Los compuestos se ensayaron a una dosis inicial fija de 50 μM, en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, siguiendo la absorbancia a 350 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Cada compuesto se disolvió en DMSO a una concentración final de 20 mM. La concentración final de DMSO en los pocillos del ensayo fue de 0.5% v/v. El inicio de la multimerización se realizó agregando NaCl o llevando la mezcla de reacción a 37°C. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el programa OriginPro 9.1.

Resultados y discusión

1. Transformación de bacterias con el plásmido conteniendo el gen CANC

Luego de la incubación a 37ºC durante 16 h se observó el crecimiento de varias colonias de la morfología esperada en la placa de transformación (Figura 3). Se seleccionó una colonia para realizar la expresión de la proteína recombinante siguiendo el protocolo descrito en la metodología.

Figura 3. Placa de transformación de *E. coli* BL21(DE3) con pET11a CANC. Siembra de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plásmido pET11a CANC en agar ampicilina 100 µg/mL crecidas 16 h a 37°C.

2. Expresión y purificación de CANC de VIH recombinante

Para la expresión de CANC recombinante, se siguieron los pasos descritos en la metodología. El proceso se evaluó mediante SDS-PAGE (Figura 4). En el carril 3 de la Figura 4A se observa la presencia de una banda predominante del tamaño esperado para la CANC de VIH (34.1 kDa), ausente en la muestra tomada previo al agregado de IPTG (Figura 4A, carril 2). Luego de realizar la lisis de las bacterias, se observa que la CANC está presente tanto en la fracción soluble como en la insoluble. La presencia de CANC en la fracción insoluble puede deberse a la precipitación de la proteína durante la expresión o a la lisis parcial de las bacterias, entre otras. En el primer caso se podría trabajar en la optimización de las condiciones de expresión para maximizar la cantidad de proteína expresada en forma soluble, como disminuyendo la temperatura post inducción o disminuyendo la concentración de IPTG. En el segundo caso se puede realizar una segunda instancia de lisado del *pellet* remanente u optimizar las condiciones en la primera lisis. Se continua la purificación a partir de la fracción soluble,

mediante precipitación secuencial con PEI y $AmSO_4$. En la Figura 4A se evidencia la presencia de CANC en forma mayoritaria en las fracciones solubles de la precipitación con PEI y $AmSO_4$ 10% (carriles 7 y 9). En el gel de la Figura 4B se observa que la CANC se recupera en la fracción insoluble de la precipitación con $AmSO_4$ 25%, según lo esperado (Figura 4B, carril 4). Por lo tanto, en estos pasos sucesivos de precipitación con PEI y $AmSO_4$ se logra eliminar gran parte de las proteínas contaminantes de *E. coli*. La fracción insoluble de la precipitación con $AmSO_4$ 25% se resuspende y dializa previo a la purificación mediante intercambio catiónico (Figura 4B, carril 4).

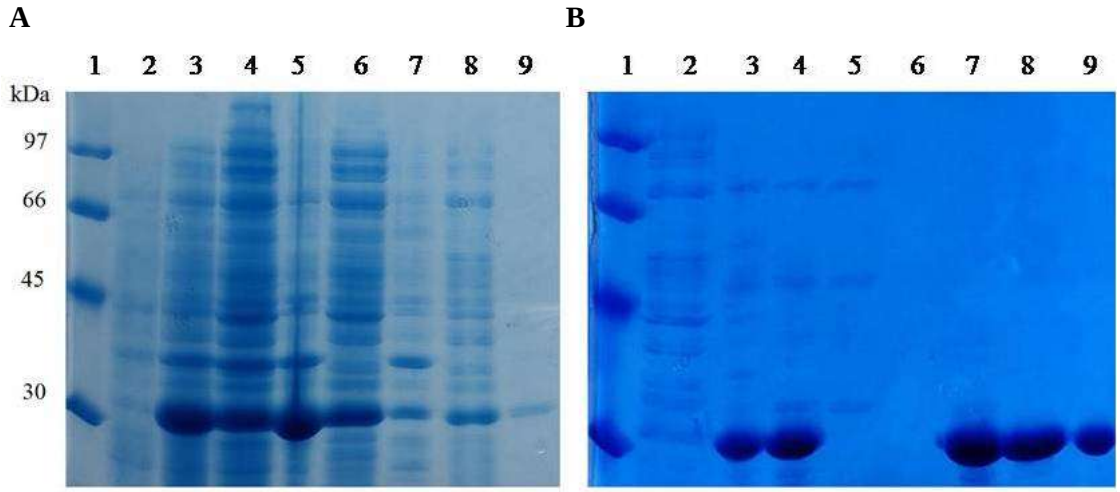


Figura 4. Evaluación de la expresión y purificación de CANC recombinante mediante SDS-PAGE. (A) 1-Marcador de PM, 2-Fracción sin inducir, 3-Fracción inducida, 4-Fracción soluble del lisado, 5-Fracción insoluble del lisado, 6-Fracción soluble PEI, 7-Fracción insoluble PEI, 8-Fracción soluble precipitación 10% $AmSO_4$, 9-Fracción insoluble precipitación 10% $AmSO_4$. **(B)** 1-Marcador de PM, 2-Fracción soluble 25% $AmSO_4$, 3-Fracción insoluble 25% $AmSO_4$, 4-Diálisis de la muestra del carril 3 resuspendida, 5-Fracción no unida CM, 6-Lavado CM, 7-Pico 1 CM, 8-Hombro CM, 9-Pico 1 SEC.

Cromatografía de intercambio catiónico

Luego de resuspender y dializar la muestra de la última precipitación, se somete a purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico, utilizando una columna CM FF 16/10 equilibrada con amortiguador 25 mM fosfato de potasio, 50 mM NaCl, 5 mM β-ME, pH 6.0, y se eluye mediante gradiente con amortiguador 25 mM fosfato de potasio, 1 M NaCl, 5 mM β-ME, pH 6.0. En la Figura 5 se observa el cromatograma obtenido. Al aplicar el gradiente de NaCl, se observa el aumento en la conductancia y la elución de un pico mayoritario. Se colectan fracciones de 1 mL durante la elución, y se juntan las fracciones con absorbancia a 280 nm en dos tubos: uno correspondiente al pico mayoritario (fracciones 99-145) y otro correspondiente al hombro (146-155) para analizarlas por SDS-PAGE e identificar cuáles contienen la proteína de interés.

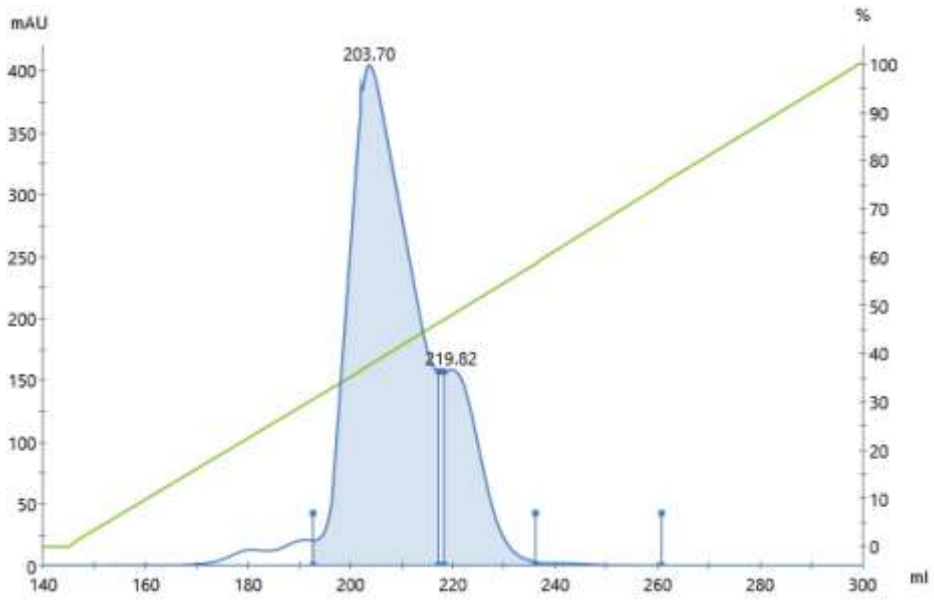


Figura 5. Cromatografía de intercambio catiónico. Resultado de la cromatografía de intercambio catiónico de la muestra obtenida tras la diálisis de la fracción conteniendo la proteína CANC (carril 3 de la Figura 4B), utilizando una columna CM FF 16/10. La curva azul muestra la absorbancia a 280 nm en función del volumen de elución (mL). La curva verde representa el gradiente del amortiguador de elución.

En el gel de la Figura 4B se observa que durante la cromatografía de intercambio catiónico, la mayoría de la proteína CANC queda unida a la fase estacionaria, ya que no se observa proteína en el carril 5, y se aprecia que se logran eliminar algunos contaminantes de mayor peso molecular. No se visualiza pérdida de la proteína CANC durante el lavado. Se evidencia la presencia de la proteína CANC con alto grado de pureza tanto en el pico mayoritario como en el hombro colectados durante la elución.

Cromatografía de exclusión molecular

El *pool* conteniendo las fracciones correspondientes al pico y hombro de la cromatografía de intercambio catiónico se concentra hasta llevarlo a un volumen de 1 mL y luego se realiza un segundo paso de purificación inyectando en una columna de exclusión molecular Superdex 75 (10/300). Debido a la alta concentración de proteína se decide dividir la muestra y cargar dos veces la columna de gel filtración. En ambas purificaciones se colectan fracciones de 0.3 mL cada una. En la Figura 6 se observa que eluyen dos picos, uno mayoritario y otro de menor amplitud. Las fracciones de cada purificación se analizan por separado para evaluar pureza mediante SDS-PAGE y en base a este resultado definir aquellas con las cuales trabajar. Se obtuvo el mismo resultado en ambas purificaciones.

Se observa que en todas las fracciones del primer pico la proteína CANC tiene un alto grado de pureza constituyendo siempre la proteína ampliamente mayoritaria, por lo que se realiza un *pool* con todas ellas. El *pool* conteniendo las fracciones del primer pico de las cromatografías de exclusión molecular se analiza por SDS-PAGE como se muestra en el carril 9 de la Figura 4B.

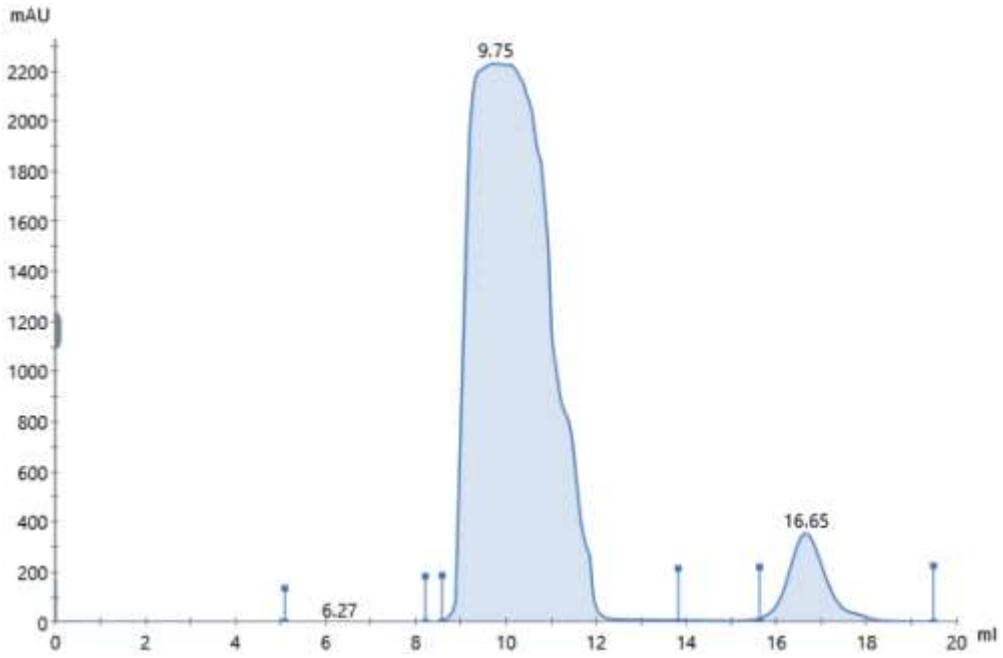


Figura 6. Cromatografía de exclusión molecular. Cromatograma de la purificación de la proteína CANC mediante cromatografía de exclusión molecular obtenido con el software Unicorn en el equipo AKTA PURE de GE. Se muestra la absorbancia a 280 nm en función del volumen de elución (mL).

3. Puesta a punto del ensayo de multimerización

La multimerización proteica depende de varios factores, entre los que se incluyen factores intrínsecos (estructura primaria, secundaria, terciaria o cuaternaria de las proteínas) y factores extrínsecos, del ambiente en el que la proteína está presente, como la fuerza iónica, el pH del medio, la concentración proteica y la temperatura (22). El aumento y/o la disminución de la temperatura logrará desestabilizar la proteína y puede promover su agregación. El aumento de temperatura puede presentar efectos adicionales que conducen a la formación acelerada de agregados. Entre estos efectos se incluyen la reducción de la energía de activación, mejora de la interacción hidrofóbica, aumento de la difusión de proteínas y mayor frecuencia de colisiones moleculares. Por otro lado, el pH de la solución determina el tipo y la distribución de las cargas superficiales de las proteínas, que afectan las interacciones de plegamiento intramolecular y las

interacciones proteína-proteína intermoleculares. Si se cambia el pH de la solución puede cambiar indirectamente los mecanismos que limitan la velocidad de agregación y la morfología de los agregados. La concentración proteica, la fuerza iónica y el tipo de sal también modulan los procesos de agregación. Debido a la existencia de diferentes vías de agregación, al aumentar la concentración de proteína podría provocar disminución de la agregación debido al efecto de *crowding*, mayor agregación debido a una mayor probabilidad de asociación o precipitación debido al límite de solubilidad (22).

En base a lo anteriormente mencionado, para poner a punto el ensayo de multimerización de la CANC de VIH, se probaron distintas condiciones, cuyos resultados se describen a continuación. Para empezar, se buscó la concentración de proteína necesaria para visualizar una curva sigmoide y poder realizar el ajuste de la pendiente para valorar la velocidad de multimerización. El ensayo se puso a punto en placas de 96 pocillos para poder realizar el *screening* con varios compuestos en simultáneo en un lector de placas Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™) siguiendo el aumento en la absorbancia a 350 nm. En una primera etapa, se evaluó el efecto de la concentración proteica en la multimerización. Está descrito que un incremento de 2 veces la concentración de proteína genera un aumento de 16 veces la velocidad de ensamblaje, lo que sugiere un proceso de polimerización por nucleación y ensamblaje cooperativo (21). En base a esto, se realizó el ensayo utilizando concentraciones entre 11 y 180 μM de CANC, en amortiguador NaH_2PO_4 50 mM, pH 7.4, según lo reportado en (21). En estos experimentos, el proceso de multimerización se indujo con el agregado de 2.25 M NaCl y las corridas se realizaron a 17°C. Las curvas obtenidas no presentaron el comportamiento sigmoideo esperado, y en muchos casos, la multimerización era tan rápida que no se obtenían suficientes puntos para realizar un ajuste lineal y estimar la velocidad. En la Figura 7 se presentan algunos resultados obtenidos a modo de ejemplo.

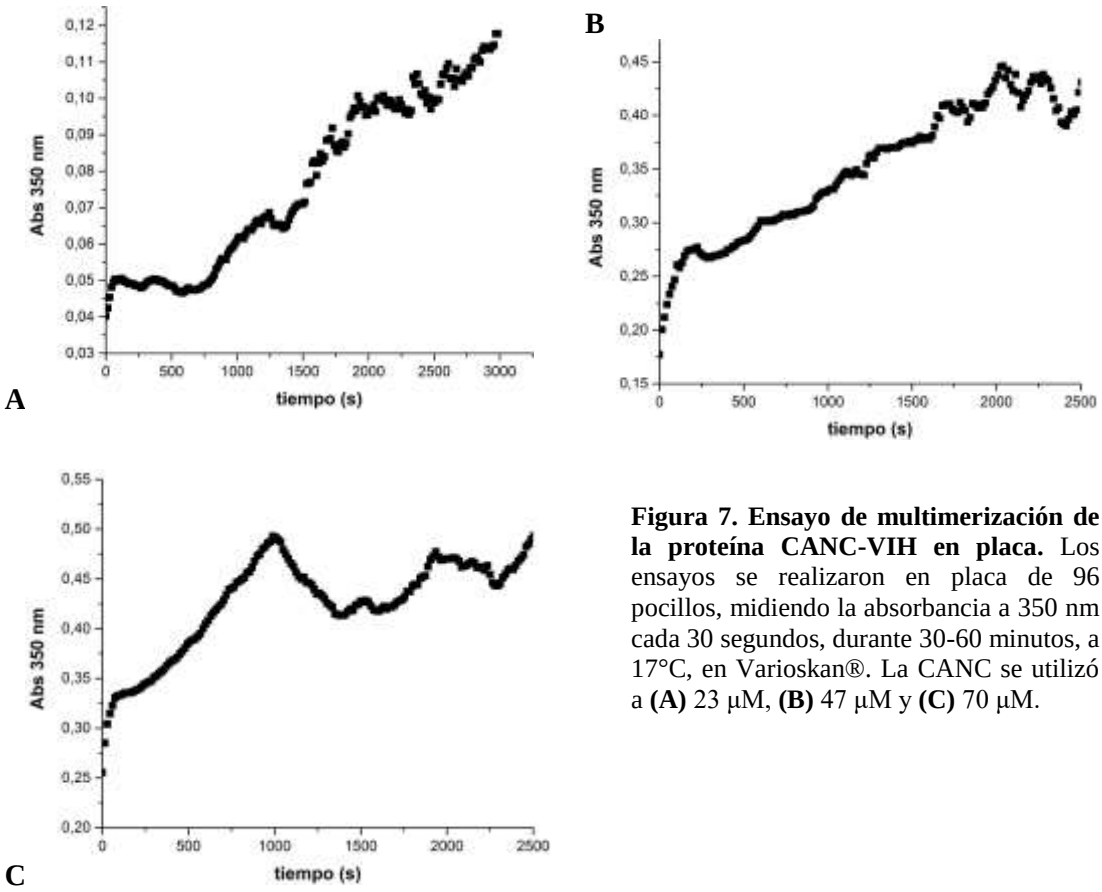


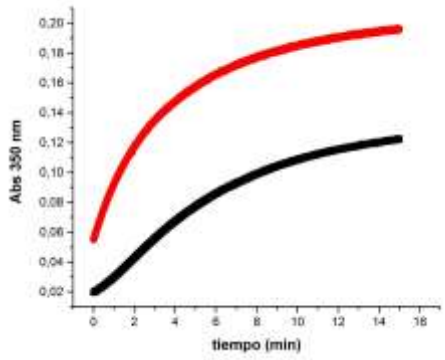
Figura 7. Ensayo de multimerización de la proteína CANC-VIH en placa. Los ensayos se realizaron en placa de 96 pocillos, midiendo la absorbancia a 350 nm cada 30 segundos, durante 30-60 minutos, a 17°C, en Varioskan®. La CANC se utilizó a **(A)** 23 μM, **(B)** 47 μM y **(C)** 70 μM.

Como se observa en la Figura 7, a mayor concentración de proteína, mayores los valores de absorbancia obtenidos. Sin embargo, como era de esperar, también aumenta la velocidad de multimerización, y en este esquema experimental no se lograron registrar suficientes puntos de la pendiente a analizar.

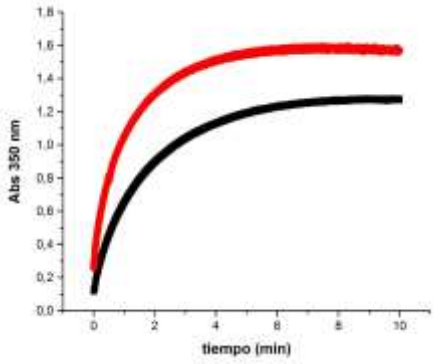
A continuación se repitió el ensayo utilizando la mitad de la concentración de NaCl (1.12 M), buscando disminuir la velocidad de la reacción de multimerización pero no se observaron cambios en la dinámica de la reacción al modificar la concentración de sales.

Si bien se observa la tendencia al aumento de la velocidad de ensamblado de la CANC a medida que incrementamos la concentración de proteína, en varios de los ensayos aparece interferencia que dificulta la correcta visualización de las curvas. Para evitar el ruido provocado por las burbujas vinculadas al pipeteo en placa, se repitieron las medidas a 5, 11 y 22 μM CANC y 2.25 mM NaCl en cubeta, utilizando un volumen final de 100 μL y midiendo en espectrofotómetro UV-Visible (Figura 8).

A



B



C

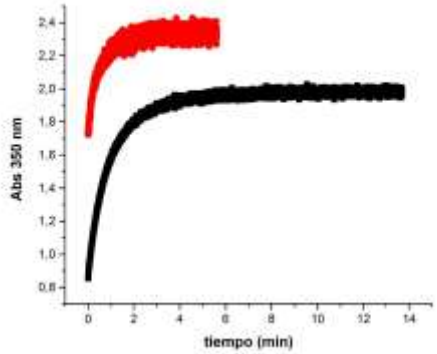


Figura 8. Ensayo de multimerización de la proteína CANC-VIH en cubeta. Los ensayos se realizaron en cubeta, midiendo la absorbancia a 350 nm en el tiempo en un espectrofotómetro Uv-Vis Cary, a 17°C. La CANC se utilizó a **(A)** 5.5 µM, **(B)** 11 µM y **(C)** 22 µM. En negro y en rojo se muestran los duplicados para cada condición.

Nuevamente, las curvas obtenidas no mostraron el comportamiento sigmoideo esperado y la alta velocidad de multimerización no nos permitió estimar las pendientes iniciales, incluso en el ensayo en el que se utilizó la menor concentración de CANC. A pesar de ello, se aprecia que hay una dependencia entre la concentración de CANC y la velocidad de multimerización. Sin embargo, notamos una falta de reproducibilidad de un ensayo a otro, incluso al utilizar una misma concentración de CANC y NaCl, por lo que consideramos necesario probar otras condiciones de optimización del ensayo.

Como está descrito en (23) la multimerización de la proteína de CA de FIV puede ser inducida al aumentar la temperatura, al trabajar con concentraciones elevadas de proteína. Si bien obtuvimos un buen rendimiento en la producción y purificación de la CANC de VIH con el protocolo utilizado, la concentración proteica necesaria para inducir la multimerización únicamente frente a cambios de temperatura es mucho mayor que la utilizada en las pruebas anteriores con NaCl. Por este motivo no se planteó esta estrategia inicialmente. Dado que el ensayo en cubeta no arrojó los resultados esperados, se decidió evaluar la multimerización mediante incubación a 37ºC y continuar la puesta a punto del ensayo nuevamente en las placas

de 96 pocillos, para luego ser empleado para el *screening* de los compuestos. En este ensayo se utilizó la CANC a una concentración de 130 μM en un volumen final de 100 μL en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0 y se incubó durante 30 minutos a 37ºC. Como se observa en la Figura 9, en este ensayo se logró obtener una curva con el comportamiento sigmoideo esperado, por lo que se continuó trabajando con estas condiciones.

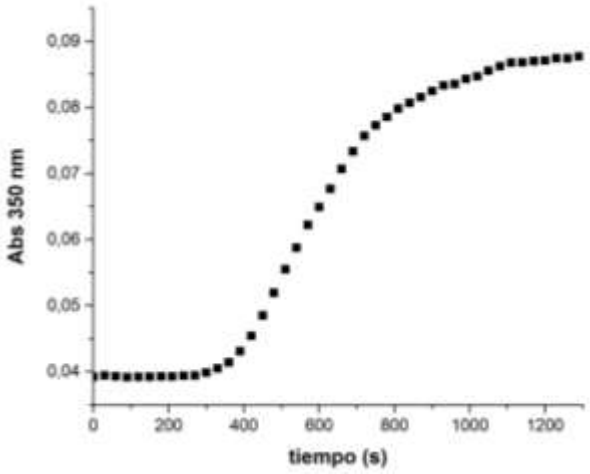
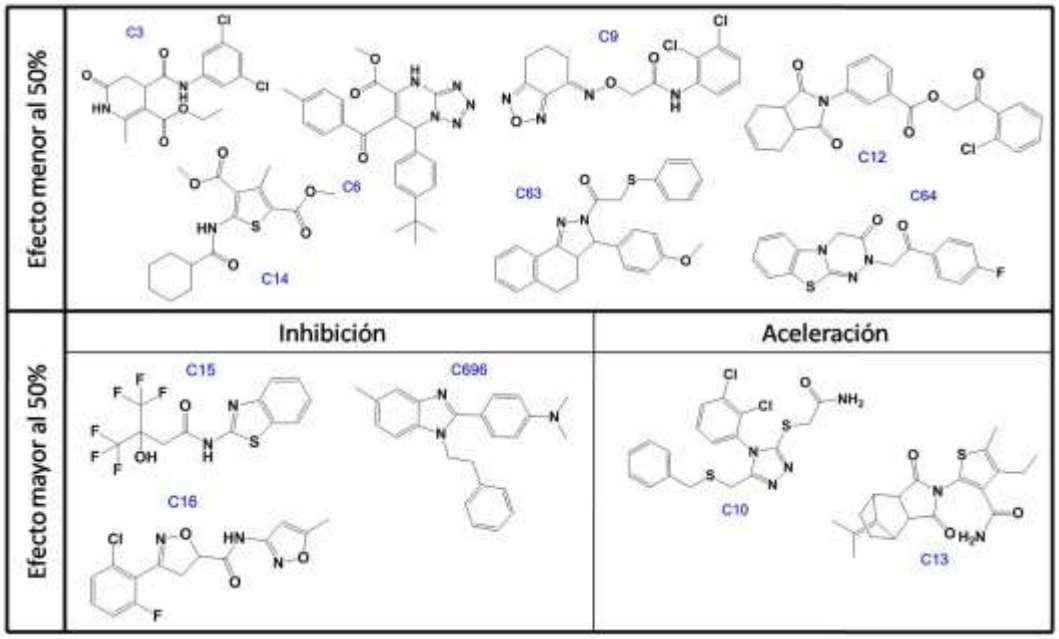


Figura 9. Multimerización de CANC-VIH. La proteína se llevó a 130 μM en amortiguador fosfato de sodio 50 mM, pH 8.0, y se midió la absorbancia a 350 nm a 37°C.

4. Evaluación del efecto de los compuestos sobre la multimerización de CANC-VIH

En base a los resultados de la puesta a punto de los ensayos se decidió evaluar los compuestos a 50 μM en placas de 96 pocillos con una concentración de CANC de 130 μM en un volumen final de 100 μL. La solución *stock* de los compuestos se preparó en DMSO a 10 mM, para usar una concentración final de DMSO de 0.5% en el ensayo. Previo al *screening* con los compuestos, se realizó un ensayo de multimerización a tres concentraciones de DMSO, 0.25%, 0.5% y 1%, para verificar que este solvente no interfiriera con el ensamblado de la CANC, corroborando que no modifica la velocidad de multimerización a las concentraciones ensayadas.
Se evaluaron inicialmente 12 compuestos seleccionados al azar a partir de la quimioteca enviada por Atomwise, y el compuesto 696 se incluyó como control positivo de inhibición dado que fue reportado como inhibidor de la multimerización de la proteína CA del FIV (23). Se incluyó también un control positivo de polimerización, incubando la CANC con 0.5% de DMSO. Cada condición se evaluó por triplicado. Para determinar el porcentaje de inhibición de la multimerización de los compuestos ensayados se estimó la velocidad inicial mediante regresión lineal a partir de la pendiente de la curva sigmoidea utilizando el programa Origin Pro 9.1 y se comparó este valor con el control positivo, expresándose los resultados como un porcentaje de inhibición (Figura 10).

A



B

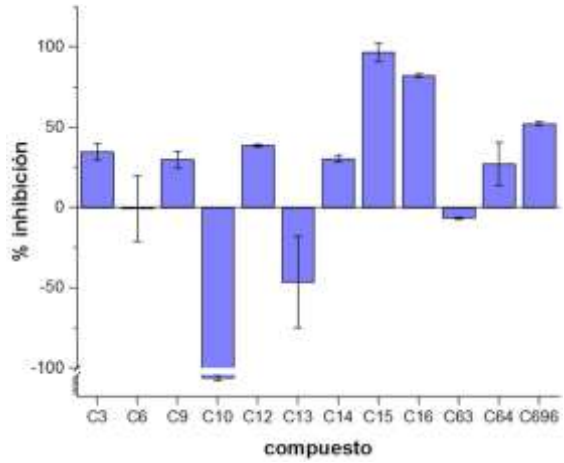


Figura 10. (A) Estructura de los compuestos evaluados. **(B)** Gráfica del promedio del porcentaje de inhibición de los 12 compuestos evaluados por triplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Al igual que se describe en Sierra *et al.* (24), a partir de este ensayo lograron identificarse dos comportamientos en relación al efecto de los compuestos sobre la velocidad de multimerización de la CANC: un aumento en la pendiente o una disminución de la misma. En el citado artículo, los autores discuten que el incremento en la pendiente puede asociarse a un aumento en el diámetro de las estructuras ensambladas y podría resultar en una cápside desordenada o alterada perturbando así el ciclo viral. Por su parte, la inhibición es el efecto clásico esperado para una molécula capaz de impedir la formación de la cápside.

En este sentido, en este experimento se identificaron 5 moléculas que tuvieron un efecto en la multimerización de la proteína mayor a 50%. Esto incluye tanto moléculas que inhibieron la multimerización (C15, C16 y C696), como moléculas con las que la pendiente se vio aumentada (C10 y C13). Es importante mencionar que el compuesto 696 a pesar de haberse usado como

control positivo por inhibir la multimerización de proteínas análogas de FIV (24), no había sido previamente evaluado en este sistema. A pesar de haber podido evaluar un pequeño número de compuestos en el contexto de este trabajo, es importante resaltar que de las 12 moléculas seleccionadas, se identificaron 5 *hits*. Esto implica un elevado porcentaje de éxito, en comparación con otros trabajos en los cuales no se parte del *screening* virtual guiado por *machine learning* en base al cual se seleccionaron las moléculas a ser ensayadas. Por ejemplo, en el trabajo (24) previamente desarrollado en el laboratorio, los autores parten de 400 compuestos seleccionados en base a similitudes estructurales con inhibidores reportados de la multimerización de la cápside de VIH y obtienen 48 inhibidores en el *screening* inicial *in vitro* con la CA de FIV.

La química medicinal juega un papel central en la optimización de compuestos candidatos a fármacos, tanto a través de la identificación de farmacóforos y relaciones estructura-actividad, como potenciando la eficacia y selectividad, y reduciendo su toxicidad. Para lograrlo deben considerarse las propiedades fisicoquímicas de las moléculas, como solubilidad, lipofilicidad y ionizabilidad. Estas propiedades, a su vez, influyen en la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y farmacodinámica (acceso al blanco, efectos secundarios indeseables, duración de la acción, ventana terapéutica) de los fármacos (25). El número de moléculas evaluadas en este trabajo es pequeño y no nos permite estudiar relaciones estructura-actividad, pero las mismas podrán determinarse cuando se complete la evaluación de las 72 moléculas.

En la Tabla 1 se presentan algunas de las propiedades fisicoquímicas y la dosis letal teórica (LD50) de los compuestos ensayados. Las propiedades fisicoquímicas, solubilidad, lipofilicidad, absorción gastrointestinal e inhibición de las enzimas CYP450 se estimaron utilizando la herramienta *online* SwissADME en http://www.swissadme.ch/ y la dosis letal 50 utilizando el programa T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool). La dosis letal 50 es un parámetro que estima la toxicidad aguda de un compuesto, y corresponde a la dosis que provoca la muerte del 50% de la población de ratas en estudio en un período determinado y se expresa en mg/kg (mg de compuesto administrado por kg de peso del animal). El programa utiliza relaciones cuantitativas de estructura-actividad para predecir la toxicidad aguda de las moléculas, por lo que en caso de no estar reportada la toxicidad de compuestos similares estructuralmente el programa no puede estimarla (N/D). Si bien sólo pudo predecirse este parámetro para los compuestos C3, C6 y C696, ninguno se estima que sea tóxico, y dos de ellos, C3 y C696 tendrían muy baja toxicidad (LD50 > 2000 mg/kg).

La solubilidad y lipofilicidad pueden afectar *in vitro* la reproducibilidad de los bioensayos, mientras que *in vivo* la escasa solubilidad en agua y la baja permeabilidad de

membranas se citan con mayor frecuencia como las razones de la escasa biodisponibilidad de los fármacos. En la Tabla 1 se puede observar que la mayoría de los compuestos ensayados son solubles o moderadamente solubles, siendo C63 el único compuesto para el cual se predice escasa solubilidad. Se desprende también que todas las moléculas menos C10 tendrían una alta absorción gastrointestinal, lo cual es deseable para que el fármaco pueda ser administrado por vía oral. Por otra parte, conocer la capacidad de inhibición e inducción de enzimas del citocromo P450 permitirá predecir si los compuestos tienen el potencial de alterar la duración de acción de un fármaco dado, volviéndolo ineficaz o precipitando la aparición de efectos adversos al modular la actividad de enzimas metabólicas específicas. Finalmente, cabe destacar que las estimaciones teóricas son una primera aproximación al estudio de las propiedades de los compuestos, pero estos parámetros y muchos otros, como la unión a proteínas plasmáticas y la vida media de eliminación, por mencionar algunos, deberán ser determinados en modelos *in vitro* e *in vivo* en las siguientes etapas del proceso de desarrollo preclínico.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos evaluados. Los parámetros de solubilidad, lipofilicidad, absorción gastrointestinal (GI) y la inhibición de CYP450 se estimaron en http://www.swissadme.ch/ y la dosis letal 50 (LD50) se estimó con el programa T.E.S.T (Toxicity Estimation Software Tool); N/D: no disponible. #: código asignado a cada compuesto. PM: peso molecular en g/mol.

#	PM (g/mol)	Solubilidad	Lipofilicidad	Absorción GI	Inhibe CYP450	LD50 en rata (mg/kg)
C3	371	Soluble	2.05	Alta	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	2091.83
C6	431.5	Moderadamente soluble	4.84	Alta	CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	896.63
C9	355	Soluble	2.96	Alta	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	N/D
C10	439	Moderadamente soluble	4.11	Baja	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4	N/D
C12	424	Moderadamente soluble	3.82	Alta	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	N/D
C13	372.5	Soluble	2.92	Alta	CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	N/D
C14	339	Moderadamente soluble	4.15	Alta	CYP12, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4	N/D
C15	358	Moderadamente soluble	3.8	Alta	CYP1A2, CYP2C19	N/D
C16	324	Soluble	2.63	Alta	CYP1A2, CYP2C19	N/D
C63	428.6	Pobremente soluble	5.34	Alta	CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4	N/D
C64	341	Moderadamente soluble	2.94	Alta	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9	N/D
C696	355.5	Moderadamente soluble	5.48	Alta	CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4	2427,16

Conclusiones y perspectivas

El objetivo del desarrollo de fármacos es identificar entidades químicas capaces de modificar un estado de enfermedad, interrumpiendo, potenciando o controlando una ruta biológica determinada. Los compuestos prometedores transitan por una serie de rigurosas etapas de optimización antes de su progresión hacia el desarrollo preclínico y los ensayos clínicos donde finalmente se evalúa su eficacia terapéutica (25).

En este trabajo transitamos por una de las primeras etapas del desarrollo preclínico de fármacos, que es la identificación de moléculas con una actividad biológica deseada. En este sentido, se llevaron a cabo exitosamente los diferentes objetivos propuestos: se logró transformar bacterias *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido que contiene la secuencia codificante para la proteína CANC del VIH-1 y se expresó y purificó la proteína recombinante, verificando su pureza por SDS-PAGE.

Se puso a punto el ensayo de multimerización de la CANC-VIH *in vitro* en placa de 96 pocillos, utilizando la temperatura como desencadenante de la agregación proteica. Se realizó un *screening* a dosis fija en presencia de moléculas previamente identificadas como potenciales inhibidores en el *screening* virtual realizado por Atomwise.

Se identificaron 5 moléculas capaces de afectar la multimerización de manera significativa, incluyendo compuestos que aumentan la velocidad de multimerización (C10 y C13) y moléculas que la inhiben (C15, C16 y C696). En cuanto a los resultados de este estudio se pudieron visualizar potenciales moléculas inhibidoras de la multimerización de la CANC del VIH entre las que se destacan los compuestos 15 y 16, los cuales mostraron mayor inhibición de la multimerización en las condiciones ensayadas.

Este trabajo pone en evidencia la eficiencia del método de *screening* virtual previamente utilizado para la selección de las moléculas a ensayar, el cual utiliza métodos de inteligencia artificial (*machine learning*) para identificar moléculas con potencial actividad inhibitoria.

Para el futuro se plantea terminar de ensayar las moléculas enviadas por Atomwise, y con los *hits* identificados realizar ensayos dosis-respuesta para profundizar en el análisis de la inhibición de las mismas. Asimismo, deberá completarse el estudio de la toxicidad de las moléculas así como el estudio de la capacidad inhibitoria de la replicación viral en células en cultivo, a partir de los cuales se podrán seleccionar moléculas que sean candidatas a evaluarse en modelos animales *in vivo*.

Referencias bibliográficas

1. Santana A, Domínguez C, Lemes A, Molero T, Salido E. Biología celular y molecular del virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Revista de Diagnóstico Biológico. 2003;52:07-18.
2. Thenin-Houssier S, Valente ST. HIV-1 Capsid Inhibitors as Antiretroviral Agents. Current HIV research. 2016;14(3):270-82.
3. Shi J, Zhou J, Shah VB, Aiken C, Whitby K. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization. Journal of virology. 2011;85(1):542-9.
4. Organization WH. Number of people (all ages) living with HIV 2021 [cited 2021 06/05/2021]. Available from: http://www.who.int/gho/hiv/epidemic_status/cases_all_text/en/.
5. Pública MdS. Informe epidemiológico - Día Nacional del VIH/SIDA 2020 2020 [cited 2021 06/05/2021]. Available from: https://www.gub.uy/ministerio-salud-publica/comunicacion/publicaciones/informe-epidemiologico-dia-nacional-del-vihsida-2020.
6. Artigas JG, Meda JM, Suñé TP, Cahn P. Infecciones causadas por los virus de inmunodeficiencia humana de tipos 1 y 2. In: España E, editor. Farreras Rozman Medicina Interna. 1. 18 ed. Barcelona, España2016. p. 2371-84.
7. Neira JL. The capsid protein of human immunodeficiency virus: designing inhibitors of capsid assembly. The FEBS journal. 2009;276(21):6110-7.
8. Cordeiro N, Taroco R, Ruchansky D. Retrovirus. Virus de inmunodeficiencia humana. In: FEFMUR OdL, editor. Temas de bacteriología y virología médica. Montevideo Uruguay2008.
9. Ganser BK, Li S, Klishko VY, Finch JT, Sundquist WI. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core. Science. 1999;283(5398):80-3.
10. Craveur P, Gres AT, Kirby KA, Liu D, Hammond JA, Deng Y, et al. Novel Intersubunit Interaction Critical for HIV-1 Core Assembly Defines a Potentially Targetable Inhibitor Binding Pocket. mBio. 2019;10(2).
11. Ali SA, Teow SY, Omar TC, Khoo AS, Choon TS, Yusoff NM. A Cell Internalizing Antibody Targeting Capsid Protein (p24) Inhibits the Replication of HIV-1 in T Cells Lines and PBMCs: A Proof of Concept Study. PloS one. 2016;11(1):e0145986.
12. Carnes SK, Sheehan JH, Aiken C. Inhibitors of the HIV-1 capsid, a target of opportunity. Current opinion in HIV and AIDS. 2018;13(4):359-65.
13. Balasubramaniam M, Zhou J, Addai A, Martinez P, Pandhare J, Aiken C, et al. PF74 Inhibits HIV-1 Integration by Altering the Composition of the Preintegration Complex. Journal of virology. 2019;93(6).
14. Xu JP, Francis AC, Meuser ME, Mankowski M, Ptak RG, Rashad AA, et al. Exploring Modifications of an HIV-1 Capsid Inhibitor: Design, Synthesis, and Mechanism of Action. Journal of drug design and research. 2018;5(2).
15. Siddiqui MA, Saito A, Halambage UD, Ferhadian D, Fischer DK, Francis AC, et al. A Novel Phenotype Links HIV-1 Capsid Stability to cGAS-Mediated DNA Sensing. Journal of virology. 2019;93(16).
16. Blair WS, Pickford C, Irving SL, Brown DG, Anderson M, Bazin R, et al. HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention. PLoS pathogens. 2010;6(12):e1001220.

17. Quinn TC. HIV epidemiology and the effects of antiviral therapy on long-term consequences. Aids. 2008;22 Suppl 3:S7-12.
18. Singh K, Gallazzi F, Hill KJ, Burke DH, Lange MJ, Quinn TP, et al. GS-CA Compounds: First-In-Class HIV-1 Capsid Inhibitors Covering Multiple Grounds. Frontiers in microbiology. 2019;10:1227.
19. Wood E. Molecular cloning. A laboratory manual. Laboratory CSH, editor. New York1982.
20. Gallagher S. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. Inc. JWS, editor. USA1995. 1-44 p.
21. Lanman J, Sexton J, Sakalian M, Prevelige PE, Jr. Kinetic analysis of the role of intersubunit interactions in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro. Journal of virology. 2002;76(14):6900-8.
22. Wang W, Nema S, Teagarden D. Protein aggregation--pathways and influencing factors. International journal of pharmaceutics. 2010;390(2):89-99.
23. Long M, Cantrelle FX, Robert X, Boll E, Sierra N, Gouet P, et al. Identification of a Potential Inhibitor of the FIV p24 Capsid Protein and Characterization of Its Binding Site. Biochemistry. 2021;60(24):1896-908.
24. Sierra N, Folio C, Robert X, Long M, Guillon C, Alvarez G. Looking for Novel Capsid Protein Multimerization Inhibitors of Feline Immunodeficiency Virus. Pharmaceuticals. 2018;11(3).
25. Veale CGL. Into the Fray! A Beginner's Guide to Medicinal Chemistry. ChemMedChem. 2021;16(8):1199-225.