

IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO BLANCO TERAPÉUTICO Y DE UN NOVEDOSO CANDIDATO A FÁRMACO PARA EL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (1)

AUTORAS PRINCIPALES: Celia Berta Fernández Ortega (1), Anna Caridys Ramírez Suárez (1)

OTROS AUTORES: Dionne Casillas Casanova (1), Taimi Paneque Guerrero (1), Raimundo Ubieta Gómez (1), Marta Dubed Echevarría (2), Leonor Navea Leiva (2), Lila Castellanos-Serra (1), Carlos Duarte Cano (1), Viviana Falcón Cama (1), Osvaldo Reyes Acosta (1), Hilda Garay Pérez (1), Eladio Silva Cabrera (2), Enrique Noa Romero (2), Yassel Ramos Gomez (1), Vladimir Besada Pérez (1), Lázaro Betancourt Núñez (1)

COLABORADORES: Leonor Lobaina (2), Giselle Alvarez (2), Gerardo Guillén (1), Ivón Menéndez (1), María Cristina de la Rosa (1), Dalila Paz (1), Jeovanis Gil (1), Luis Javier González (1), Marta Ayala (1), Lissette López (1), Alejandro Fuentes (1), Yoslaine Ruiz (1), Aylin Nordelo (1), Natacha Carlos (1), Karelía Cosme (1), Dania Bacardí (1), Emilio Acosta (3), Sonia González (1), Ever Pérez (1), Juan Hernández (1), David Diago (1), Antonio J. Antequera (1), Elsa Rodríguez (1), Rocío Garateix (1), Freya Freire (1), Yahima Chacón (1), Lainet Merencio (1), Maday Fernández (1), Carlos Espinosa (1), Lillian Gómez (1), Karla Pereira (1), Mariuska Díaz (1)

OTRA ENTIDAD PARTICIPANTE:

Centro de Investigaciones Científicas de la Defensa Civil (2)
Centro de Estudios Avanzados de Cuba (3)

AUTOR PARA LA CORRESPONDENCIA:

Celia Berta Fernández Ortega
Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa, AP: 6162, La Habana 10600, Cuba
Fax: 7 2504494.
Correo electrónico: celia.fernandez@cigb.edu.cu

RESUMEN:

La terapia antirretroviral contra el VIH/sida ha logrado una reducción en la morbilidad, la mortalidad e incluso en la transmisión viral. Sin embargo, esta terapia aún presenta desventajas, en especial la poca adherencia y la generación de resistencia viral, lo que

impone la necesidad de buscar nuevos antirretrovirales. En el presente trabajo, a través de un estudio de proteómica, se determinó que el tratamiento de la línea celular MT4, con una fracción leucocitaria con actividad anti-VIH, modula negativamente los niveles de vimentina, una de las proteínas que forman los filamentos intermedios (FI) del citoesqueleto. Para dilucidar la relación de esta proteína con la infección del VIH se estableció la metodología para inducir el silenciamiento génico post-transcripcional de la vimentina en células MT4, uno de los hospederos de elección para los ensayos de evaluación de actividad anti-VIH, y se generó una línea celular *knockdown* para vimentina. Adicionalmente, se desarrolló un sistema basado en un vector lentiviral de tercera generación que expresa la proteína verde fluorescente, para evaluar las primeras etapas de la replicación del VIH de manera segura, ya que no requiere condiciones de bioseguridad de nivel III. Utilizando este sistema de reto, así como el ensayo tradicional de infección con VIH replicativo, se evidenció por primera vez que la disminución en los niveles de vimentina reduce drásticamente la replicación viral. A través de microscopía electrónica de transmisión y microscopía de fluorescencia se demostró que un péptido sintético, CIGB-210, derivado de la queratina 10, modifica los FI de vimentina. Se evidenció, también por primera vez, la potente actividad inhibitoria de este péptido y su baja toxicidad, lo cual lo convierte en un promisorio candidato a fármaco contra el VIH/sida. En su conjunto los resultados de esta investigación demuestran por primera vez que la vimentina es una diana terapéutica potencial contra la infección por el VIH y que está involucrada en las etapas tempranas de la infección. A partir de estos hallazgos se propuso una novedosa estrategia para inhibir la replicación del VIH, a través del reordenamiento de la estructura de los FI de vimentina. El hecho de que el blanco sea una proteína celular en lugar de una proteína viral reduce considerablemente las posibilidades de que el virus desarrolle resistencia al tratamiento. Los resultados obtenidos están avalados por tres publicaciones internacionales: *Viruses* 2016 (Factor de Impacto 3.042), *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2004 (Factor de Impacto 2.371) y *Biotechnología Aplicada* 2008, 1 patente concedida en Cuba y en EE.UU., Europa, Japón, Australia, Rusia, Sudáfrica y Tailandia, 17 participaciones en eventos nacionales e internacionales con 3 carteles premiados, 2 tesis de Maestría y 6 de Diploma, así como 3 logros científico-técnicos del CIGB. El candidato a fármaco para la terapia contra el VIH/Sida, CIGB-210 se encuentra en etapa de desarrollo tecnológico en el CIGB.

COMUNICACIÓN CORTA

A pesar de los notables avances experimentados durante la última década en la terapia antirretroviral contra el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el sida continúa siendo una de las diez primeras causas de muerte en el mundo y la segunda en países de bajo recursos [1]. La Terapia Antirretroviral (TAR) ha sido efectiva porque logra controlar la replicación viral a niveles mínimos, disminuye las morbilidades asociadas al sida y aumenta la esperanza de vida de los pacientes [2,3,4]. Sin embargo, la eficacia a largo plazo de la TAR se ve limitada principalmente por el fenómeno de aparición de variantes virales resistentes a los antirretrovirales entre otros problemas [5]. Una de las

líneas de investigación más promisorias de la actualidad consiste en desarrollar inhibidores dirigidos contra blancos celulares relacionados con la replicación viral. Varios candidatos se encuentran en un estado avanzado de desarrollo clínico [6,7,8,9]. El empleo de proteínas del hospedero como blancos terapéuticos debe, en teoría, retrasar la aparición y selección de variantes virales resistentes ya que estos fármacos actuarían sobre componentes celulares estables y no sobre las mucho más variables proteínas virales [5,10].

El citoesqueleto es un estructura dinámica, compuesta por numerosas proteínas formadoras de redes [11]. Algunas proteínas del citoesqueleto han sido asociadas con diferentes eventos del ciclo replicativo del VIH [12,13,14]. Otros autores han reportado que la vimentina, una proteína que forma filamentos intermedios (FI) en células de origen mesenquimático, es capaz de interactuar con algunas proteínas del VIH, aunque las funciones concretas de estas interacciones y su consecuencia para el ciclo replicativo del VIH no han sido aún establecidas [15,16].

Nuestro grupo había descrito previamente la presencia de una actividad inhibidora de la replicación del VIH en el extracto dializable de leucocitos (EDL) [17] y en una fracción de este denominada B cuando se tratan las células durante 7 días. En este trabajo recogemos una secuencia de experimentos que comienza con el hallazgo de que el EDL es capaz de inhibir la replicación del VIH tras una incubación de solo 24 horas en las células MT4, la identificación de vimentina como nuevo blanco terapéutico y culmina con la definición de un péptido candidato a fármaco contra el VIH. A continuación resumiremos los principales resultados.

El EDL inhibe la replicación del VIH luego de una incubación previa de 24 h con las células MT4.

En el presente trabajo se estudió la actividad anti-VIH del EDL cuando las células son tratadas por 24 horas previas al reto. Se estudiaron EDL obtenidos tanto de leucocitos inducidos (EDL-ind) como de leucocitos no inducidos (EDLn/i). Los cultivos celulares se trataron con 0,3 U/mL de EDL durante 24 horas o 7 días y se retaron con la cepa BRU del VIH a 0,05 o 0,1 multiplicidad de infección (m.o.i.). Se observó una inhibición del VIH-1 por encima del 80% cuando las células se pre-incubaron durante 24 horas con el EDL. **Este resultado permitió reducir hasta 24 h el tiempo requerido por el EDL para inducir un estado no permisivo a la replicación del VIH [18,19].**

La fracción B1 del EDL también es capaz de inhibir la replicación del VIH luego de una incubación previa de 24 h con las células MT4.

Con el objetivo de delimitar más las moléculas responsables de la actividad anti VIH del EDL, el extracto se fraccionó mediante cromatografía de exclusión molecular y se evidenció que una de las fracciones, denominada B1, retenía la capacidad inhibidora después de 24 horas de pre-tratamiento a las células MT4 pero no a las 3 h [20].

El tratamiento de las células MT4 con la fracción B1 modula negativamente la expresión de la vimentina

Para identificar proteínas celulares que fueran moduladas por el tratamiento con la fracción B1 se implementó un estudio de proteómica comparada entre células MT4 tratadas durante 3 h y 24 h con la fracción B1 y sus controles de células no tratadas. La hipótesis esbozada fue que algunas de las proteínas que se mueven a las 24 h, pero no a las 3h de incubación con la fracción B1, podrían estar involucradas en el efecto antiviral observado. Las células tratadas por 24 horas mostraron una reducción muy marcada de la expresión de vimentina, mientras que a las 3 h la disminución fue mucho más modesta. **Este experimento nos permitió hipotetizar que pudiera existir una relación causal entre la fracción B1, la vimentina y la inhibición de la replicación del VIH [20,21].**

Generación de una línea celular con una reducción permanente de los niveles de vimentina y de una línea celular control

Para indagar más profundamente sobre la relación entre la vimentina y el VIH se construyó una línea MT4 knockdown para este gen a través de la introducción en el genoma de un shRNA (del inglés short hairpin RNA) específico para el gen de vimentina. Esta línea se generó a través de la transducción de las MT4 con un vector lentiviral que expresa el shRNA específico para vimentina (pLenti-shRNAvim). En paralelo se obtuvo una línea control transducida con el mismo vector lentiviral pero sin el casete de expresión con el shRNA ni el promotor U6. Ambas líneas presentaron características morfológicas y tiempo de doblaje similares entre sí y con respecto a la línea celular MT4 que les dio origen [19]. **Este experimento nos permitió contar con un clon (MT4sh/Vim) con niveles de expresión vimentina reducidos en relación a una línea control (MT4mock) [20,21].**

La reducción permanente de los niveles de vimentina en células MT4 inhibe las etapas tempranas de la replicación del VIH

Para determinar si la reducción de los niveles de vimentina afecta alguna de las etapas tempranas en la infección por VIH, las líneas celulares MT4sh/Vim y MT4mock se retaron con un vector lentiviral basado en el VIH-1 (pLGW) que expresa la eGFP. Las líneas MT4sh/Vim y MT4mock se incubaron con el pLGW a diferentes m.o.i. La expresión de eGFP se monitoreó a las 72 h de cultivo por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. En este experimento se evidenció una reducción marcada de la expresión de la eGFP en la línea MT4sh/Vim en comparación con la intensa fluorescencia observada en la línea MT4mock. Los resultados de microscopía se confirmaron por la cuantificación del número de células fluorescentes por citometría de flujo, donde se evidenció una disminución de alrededor del 80% en el número de células fluorescentes en la MT4sh/Vim. **Estas evidencias sugieren que la vimentina está involucrada en uno de las etapas tempranas en el ciclo replicativo del VIH, en este caso comprenden desde el instante posterior a la entrada de la nucleocápsida al citoplasma, hasta la inserción del ADN proviral al genoma y su posterior transcripción [20,21].**

La reducción permanente de los niveles de vimentina en células MT4 inhibe la

replicación de una cepa infectiva del VIH

A continuación investigamos si la reducción de vimentina era también capaz de inhibir la replicación de una cepa infectiva del VIH en un ensayo de múltiples ciclos de infección. Para ello se infectaron las líneas MT4sh/Vim y MT4mock con la cepa BRU. Se evidenció una reducción de más del 90% en los niveles de p24 en la línea MT4sh/Vim en comparación con las células MT4mock. **Estos resultados aportan una evidencia robusta de que la reducción de los niveles de vimentina afectan la replicación de VIH y sugieren fuertemente que esta proteína desempeña un papel importante en el ciclo replicativo de este virus [20,21].**

Un péptido sintético de la queratina 10 es capaz de inhibir la replicación del VIH-1

Para validar la potencialidad de vimentina como blanco para la TAR contra el VIH, se estudió el efecto de varios péptidos de la región 1A del dominio central de vimentina y queratina que habían sido previamente asociados con el desensamblaje de los FI de vimentina [31]. En particular un péptido de 18 mer derivado de la región 1A de la queratina-10 (CIGB-210), se evaluó en un ensayo de inhibición con la cepa BRU del VIH-1. Las células MT4 se pre-trataron por 24 h con el péptido antes de efectuar el reto viral con m.o.i. 0,001. En estos experimentos se evidenció una potente inhibición de la replicación del VIH con una IC50 estimada en $7,92 \pm 1,76$ nM. Por otra parte, el CIGB-210 resultó muy poco tóxico sobre la línea celular MT4, con una CC50 de 1702 ± 255 μ M. **Estos valores son muy alentadores para un candidato a fármaco en las etapas tempranas de su desarrollo pues significa que la concentración efectiva está muy alejada de la concentración citotóxica. Estas evidencias convirtieron a CIGB-210 en un atractivo candidato a fármaco contra el VIH-1 [20,21].**

Efecto de CIGB-120 sobre los filamentos intermedios de vimentina

Para corroborar el efecto de CIGB-210 sobre los filamentos de vimentina las células MT4 tratadas con CIGB-210 durante 24 horas se analizaron por microscopía electrónica de transmisión [21] y por microscopía de fluorescencia. Las microfotografías obtenidas por ambas técnicas evidenciaron cambios en la estructura de los FI en las células tratadas con CIGB-210. La microscopía de fluorescencia permitió observar un reordenamiento de la red de filamentos de vimentina alrededor del núcleo. **Estos resultados evidenciaron que CIGB-210 actúa sobre los filamentos intermedios y específicamente provoca un reordenamiento de los filamentos de vimentina en la línea celular MT4, donde ejerce actividad anti-VIH [20].**

El CIGB-210 es capaz de penetrar las células MT4

Una interrogante muy relevante con vistas a dilucidar el mecanismo de acción del CIGB-210, es si este péptido es capaz de atravesar la membrana plasmática e interactuar con la vimentina —o con otras proteínas— directamente en el interior de la célula. Para responder esta pregunta se trataron células MT4 con 10, 20 o 40 μ M del CIGB-210 marcado con fluoresceína durante 15 min, 60 min o 24 h. Los porcentajes de

células fluorescentes, determinados por citometría de flujo, aumentaron de forma proporcional a la concentración de péptido y el tiempo de incubación. Para excluir la posibilidad de que la señal registrada por el citómetro estuviera provocada por péptidos anclados en la superficie de la célula se introdujo un paso de apagamiento de la fluorescencia externa con azul de tripán [29,30]. El máximo porcentaje de internalización de CIGB-210 en MT4 fue de $83 \pm 3\%$ células fluorescentes luego de 24 h de incubación a una molaridad de $40 \mu\text{M}$. Adicionalmente, una variante biotinilada del CIGB-210 se visualizó en el citoplasma de las células por microscopía de fluorescencia. **Estos resultados demuestran que el CIGB-210 es capaz de atravesar la membrana plasmática sin la ayuda de un péptido penetrador [20].**

La novedad teórica de este trabajo se puede resumir en los siguientes aspectos: Se demuestra por primera vez que la incubación de células MT4 con EDL por 24 horas inhibe la replicación del VIH. Se identificó a la vimentina como una de las proteínas moduladas por la acción del EDL sobre las células MT4. A través de la generación de una línea celular *knockdown* para el gen de vimentina se evidenció por primera vez que la disminución de los niveles de esta proteína en las células MT4 protege contra la replicación del VIH. Se informa por primera vez la inhibición del VIH por un péptido de la queratina 10, con una IC50 en el rango nanomolar bajo y con muy baja toxicidad, lo cual lo convierte en un candidato a fármaco primero en su clase, contra el VIH. Es también novedosa la evidencia de que, a través de la modificación de la red de FI de vimentina, es posible reducir la replicación del VIH. En su conjunto los resultados demuestran que la vimentina puede ser un novedoso y atractivo blanco celular para la terapia del VIH/sida.

La importancia práctica radica en que, no solo se limita a definir la vimentina como un blanco potencial para el sida, sino que se identifica un péptido con una potente actividad antiviral y un índice de seguridad muy atractivo, con el valor añadido de que está dirigido contra una proteína celular muy estable. Estos resultados sientan las bases para el desarrollo de este péptido como candidato a fármaco con aplicabilidad potencial contra el VIH/sida. El mismo transita actualmente por el proceso de desarrollo pre-clínico en el CIGB.

Los resultados obtenidos han formado parte de tres publicaciones científicas, en la revista "Viruses", en "BBRC" y en la revista cubana "Biotecnología Aplicada".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization (WHO). The top 10 causes of death. Updated May 2014. Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index1.html> (accessed on 10 April 2015).
2. Montaner, J.S.G.; Lima, V.D.; Harrigan, P.R.; Lourenc, L., Yip, B.; Nosyk, B.; Wood, E.; Kerr, T.; Shannon, K.; Moore, D.; Hogg, R.S.; Barrios, R.; Gilbert, M.; Kraiden, M.; Gustafson, R.; Daly, P.; Kendall, P. Expansion of HAART Coverage Is Associated with Sustained Decreases in HIV/AIDS Morbidity, Mortality and HIV

- Transmission: The “HIV Treatment as Prevention” Experience in a Canadian Setting. *PLoS ONE* **2014**, 9, 2, e87872. doi:10.1371/journal.pone.0087872
3. Kitahata, M.; Gange, S.J.; Abraham, A.G.; Merriman, B.; Michael, M.A.; Saag, S.; et al. Effect of early versus deferred antiretroviral therapy for HIV on survival. *New Engl J Med* **2009**, 360, 1815-1826.
 4. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS): Global AIDS response progress reporting **2014**. Geneva, Switzerland http://www.unaids.org/sites/default/files/GARPR_2014_guidelines_0.pdf (accessed on 15 April 2015).
 5. Arhel, N.; Kirchhoff, F. Host proteins in HIV infection: New therapeutic target. *Biochimica et Biophysica Acta* **2010**, 1802, 313-321.
 6. Dorr, P.; Westby, M.; Dobbs, S.; Griffin, P.; Irvine, B.; Macartney, M.; Mori, J.; Rickett, G.; Smith-Burchnell, C.; Napier, C.; Webster, R.; Armour, D.; Price, D.; Stammen, B.; Wood, A.; Perros, M. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother* **2005**, 49, 4721-4732.
 7. Nozza, S.; Galli, L.; Antinori, A.; Chiappetta, S.; Mazzotta, F.; Zaccarelli, M.; Ottou, S.; De Battista, D.; Pogliaghi, M.; Di Pietro, M.; Malnati, M.; Ripa, M.; Bonora, S.; Lazzarin, A.; VEMAN Study Group. Maraviroc 150 mg daily plus lopinavir/ritonavir, a nucleoside/nucleotide reverse transcriptase inhibitor-sparing regimen for HIV-infected naive patients: 48-week final results of VEMAN study. *Clin Microbiol Infect* **2014**. doi: 10.1016/j.cmi.2014.12.006.
 8. Zhang, C.; Du, C.; Feng, Z.; Zhu, J.; Li, Y. Hologram quantitative structure activity relationship, docking, and molecular dynamics studies of inhibitors for CXCR4. *Chem Biol Drug Des* **2015**, 85, 2, 119-36. doi: 10.1111/cbdd.12377.
 9. Pace, C.S.; Fordyce, M.W.; Franco, D.; Kao, C.Y.; Seaman, M.S.; Ho, D.D. Anti-CD4 monoclonal antibody ibalizumab exhibits breadth and potency against HIV-1, with natural resistance mediated by the loss of a V5 glycan in envelope. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2013**, 62, 1-9.
 10. Taltynov O, Desimmie BA, Demeulemeester J, Christ F, Debyzer Z: Cellular cofactors of lentiviral integrase: From target validation to drug discovery. *Molecular Biology International* **2012**, doi:10.1155/2012/863405.
 11. Moisan, E.; Girard, D. Cell surface expression of intermediate filament proteins vimentin and lamin B1 in human neutrophil spontaneous apoptosis. *J Leukoc Biol* **2006**, 79, 489-498.
 12. Stolp, B.; Fackler, O.T. How HIV Takes Advantage of the Cytoskeleton in Entry and Replication. *Viruses* **2011**, 3, 293-311.
 13. Jolly, C.; Mitar, I.; Sattentau, Q.J. Requirement for an Intact T-Cell Actin and Tubulin Cytoskeleton for Efficient Assembly and Spread of Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* **2007**, 81, 11, 5547–5560.
 14. Sundquist, W.I.; Kräusslich, H.G. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2012**, 2, a006924.
 15. Shoeman, R.L.; Hüttermann, C.; Hartig, R.; Traub, P. Amino-terminal polypeptides of vimentin are responsible for the changes in nuclear architecture associated with human immunodeficiency virus type 1 protease activity in tissue

- culture cells. *Mol Biol Cell* **2001**, 12,143-154.
16. Karczewski, M.K.; Strebel, K. Cytoskeleton Association and Virion Incorporation of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vif Protein. *J Virol* **1996**, 70, 494-507.
 17. Fernández-Ortega C; Dubed M; Ruibal I; Vilarrubia OL; Menéndez JC; Navea; Ojeda M and M Araña. Inhibition of in vitro HIV infection by Dialyzable Leukocyte Extract. *Biotherapy* **1996**, 9: 33-40.
 18. Fernández-Ortega C, Dubed M, Ramos Y, Navea L, Álvarez G, Lobaina L, López L, Casillas D, Rodríguez L. Non-induced leukocyte extract reduces HIV replication and TNF secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2004**; 325: 1075-1081
 19. Fernández-Ortega C, Dubed M, Álvarez G, Navea L, Casillas D, Ramírez A, Lobaina L, Noa E. Protection of cells against HIV infection by the dialyzable leukocyte extract prior to cell culture duplication. *Biotecnología Aplicada* **2008**; 25(2): 154-159.
 20. Fernández-Ortega C, Ramírez A, Casillas D, Paneque T, Ubieta R, Dubed M, Navea L, Castellanos-Serra L, Duarte C, Falcon V, Reyes O, Garay H, Silva E, Noa E, Ramos Y, Besada V, Betancourt L. Identification of Vimentin as a Potential Therapeutic Target against HIV Infection. *Viruses* **2016**; 8: 98. doi:10.3390/v8060098.
 21. Fernández Ortega C, Ramírez Suárez A, Casillas Casanova D, Paneque Guerrero T, Dubed M, Navea L, Castellanos-Serra L, Duarte C, Falcon V, Reyes O. Método para inhibir la replicación del VIH en células de mamíferos y en humanos. WO2011/12074 A1.