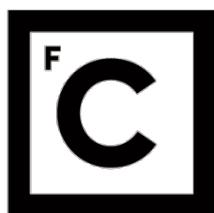


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



**Ciências
ULisboa**

Viruses as a source of antiviral peptide-based drugs

Nuno Rebello de Andrade Bustorff Silva

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Versão pública

Dissertação orientada por:

Professor Doutor Miguel Augusto Rico Botas Castanho

Professora Doutora Ana Isabel Abrantes Coutinho

2016

Resumo

As patologias causadas por infecções contribuem consideravelmente para o número total de mortes que ocorrem mundialmente. Segundo a organização mundial de saúde, o vírus da Imunodeficiência Humana do tipo 1 (VIH-1) é responsável por cerca de 2.7% destas infecções. O VIH-1 foi identificado em 1981 e pertence, de acordo com a classificação de Baltimore, ao grupo dos vírus de cadeia simples de RNA com DNA intermediário (ssRNA-RT), fazendo parte da família *Retroviridae* e género *Lentivirus*. Este retrovírus é o responsável pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e a sua infecção é caracterizada por causar uma rápida depleção na população de linfócitos T CD4⁺ do hospedeiro, tornando-o imunocomprometido e vulnerável a infecções oportunistas. Apesar dos esforços da comunidade científica ao longo dos anos, ainda não existe uma vacina ou tratamento totalmente eficaz. Atualmente os tratamentos disponíveis incluem vários medicamentos aprovados para uso clínico e aumentaram significativamente a esperança de vida dos pacientes infetados. O tratamento anti-retroviral (TARV) consiste num regime triplo de fármacos dirigidos a, pelo menos, dois alvos moleculares distintos e hoje em dia, é aceite como a forma mais eficaz de controlar a virémia. No entanto, o potencial deste tipo de terapia é limitado pelo desenvolvimento da resistência do VIH-1 aos fármacos. Assim, o estudo continuado de novos medicamentos eficazes é fundamental para combater estirpes que se tornam resistentes.

O desenvolvimento de novos medicamentos peptídicos tem vindo a aumentar nos últimos anos. Os péptidos, tipicamente constituídos por sequências de 2 a 50 resíduos de aminoácidos, podem ser encontrados naturalmente em diferentes organismos onde desempenham várias funções nomeadamente como parte integrante do sistema imunitário. Nos últimos anos tem sido demonstrado que vários péptidos possuem propriedades anti-VIH-1, onde se incluem péptidos que derivam de proteínas do VIH e péptidos antimicrobianos (AMPs). Os AMPs fazem parte da imunidade inata de diversos organismos multicelulares e possuem um largo espetro de ação contra bactérias, fungos e vírus. As defensinas e as catelicidinas são as principais famílias de AMPs com ação conhecida contra o VIH-1. Adicionalmente, são vários os péptidos derivados de proteínas do VIH-1 que possuem atividade antiviral. De entre estes o que mais se destaca é o T20 por ser o único membro da classe dos inibidores de fusão aprovado para uso clínico. Este péptido deriva da glicoproteína do envelope gp41 e é um exemplo de sucesso no desenvolvimento de péptidos antivirais.

Os AMPs de origem natural são normalmente encontrados em microorganismos, plantas e animais. No entanto, trabalhos de investigação recentes do nosso laboratório mostraram que sequências de péptidos com atividade antibacteriana podem também ser encontradas em proteínas virais, o que indica que estas proteínas são uma fonte inexplorada de péptidos bioativos. Assim, o trabalho aqui apresentado pretendeu explorar a hipótese de proteínas virais serem também uma fonte de novas sequências de péptidos antivirais (AVPs) e assim contribuir para o desenvolvimento de novos péptidos com atividade anti-HIV-1. A identificação de sequências de aminoácidos com potencial atividade antiviral foi realizada com recurso à ferramenta bioinformática AVPPred utilizando todas as proteínas estruturais de vírus anotadas na Uniprot. Tendo em conta todas as sequências com potencial atividade antiviral, obtidas de acordo com a classificação dos modelos de avaliação da ferramenta AVPPred, treze péptidos foram escolhidos para serem testados experimentalmente contra a estirpe laboratorial VIH-1_{NL4.3}. De forma a entender a influência da carga de cada péptido na sua previsão enquanto AVP, foi necessário traçar um gráfico da carga dos péptidos positivos em função da sua previsão enquanto potencial péptido antiviral. Apesar de empiricamente ser visível uma correlação entre estas duas variáveis, estatisticamente esta não foi significativa. Assim, através desta análise entende-se que a carga dos péptidos antivirais não deverá ter uma influência direta na sua atividade antiviral.

Através da realização de ensaios de infecção viral com células suscetíveis na presença de diferentes concentrações dos vários péptidos, foi possível determinar para cada péptido a concentração capaz de inibir cinquenta por cento (IC_{50}) da infecção viral. Estes ensaios foram realizados com células cuja expressão de luciferase é regulada pela proteína viral trans-ativadora da transcrição (Tat). Esta proteína ao ligar-se ao promotor *Long Terminal Repeat* (LTR) inicia a sua transcrição e, permite a quantificação da infecção viral pela intensidade de luminescência observada, após a conversão de luciferina a oxi-luciferina que é catalisada enzimaticamente pelo luciferase. Através dos resultados obtidos foi possível observar que seis péptidos revelaram uma baixa atividade com um IC_{50} superior a 100 μ M; cinco péptidos apresentaram atividade moderada com um IC_{50} entre os 12.5 μ M e os 100 μ M; e os péptidos vAVP 1472 e vAVP 1137 revelaram uma elevada atividade antiviral com um IC_{50} de 61.6 nM e de 5.63 μ M, respetivamente.

As curvas de dose-resposta obtidas na determinação da atividade antiviral dos dois péptidos com elevada atividade foram distintas sendo que, para a concentração mais elevada de péptido testada, o vAVP 1472 inibiu na totalidade a infecção viral, enquanto o vAVP 1137 só foi capaz de inibir 80% da infecção viral. Esta diferença pode ser explicada de forma empírica pelo passo do ciclo replicativo do vírus em que os péptidos atuam. O péptido vAVP 1472 ao inibir a infecção nos primeiros passos do ciclo replicativo, antes da integração do genoma viral, não permite a expressão de Tat, pelo que, não é possível haver produção de luciferase, o que se traduz num sinal praticamente nulo. Por outro lado, o péptido vAVP 1137 ao inibir a infecção após o passo de integração do genoma viral, possibilita que haja uma produção residual de luciferase, mesmo estando o péptido a inibir a infecção eficazmente.

Comparando os resultados bioinformáticos com os resultados obtidos através dos ensaios antivirais foi possível observar algumas disparidades. Enquanto que a previsão obtida pela ferramenta AVPPred dava os treze péptidos com antivirais, nos resultados dos ensaios *in vitro* para três dos péptidos testados o seu valor de IC_{50} foi indeterminado.

Os resultados obtidos neste trabalho permitiram identificar dois péptidos derivados de proteínas virais com elevada atividade anti-VIH-1: o péptido vAVP 1472, que provém da proteína da cápside do vírus da Dengue tipo 3, e o péptido vAVP 1137, que provém da proteína da cápside do Coronavírus humano. Atualmente existem duas bases de dados de péptidos antivirais, a HIPdb e a AVPdb, que contêm todas as sequências peptídicas conhecidas de diferentes origens, cuja atividade foi descrita contra o VIH-1, ou outros vírus, respetivamente. Através da análise da informação disponível nestas bases de dados foi possível constatar que a maioria dos péptidos de origem viral é ativo, ou a sua atividade apenas foi descrita contra o vírus de origem. De fato os resultados obtidos para o péptido vAVP 3400 estão de acordo com este princípio. Este péptido que tinha sido descrito previamente como tendo elevada atividade antiviral contra o seu vírus de origem, o vírus sincicial respiratório, VSR, demonstrou apenas atividade moderada contra o VIH-1. No entanto os resultados obtidos com os péptidos que demonstraram elevada atividade anti-VIH-1, o vAVP 1472 e o vAVP 1137, mostram que é possível encontrar péptidos com elevada atividade contra vírus diferentes do vírus que contêm as proteínas de onde estes péptidos são derivados.

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que as proteínas virais têm de fato potencial para serem usadas como fonte de péptidos bioativos, com destaque para a identificação de dois péptidos com elevada atividade anti-VIH-1.

Palavras-chave: VIH-1; Péptidos antivirais (AVPs); AVPPred; Concentração capaz de inibir cinquenta por cento da infecção (IC_{50}).

Abstract

The annual number of infections observed worldwide contributes greatly to the total number of deaths, in which the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) is responsible for 2.7% of them. Even after the breakthroughs observed since its discovery in the early 80's, currently, about thirty-seven million people live with the virus. According to Baltimore classification, this retrovirus belongs to the group of viruses containing a single strand of RNA with DNA intermediate (ssRNA-RT), and it is responsible for the depletion of the host lymphocytes T CD4⁺, leading to an immunocompromised state, which is denominated by acquired immune deficiency syndrome (AIDS). The therapies used throughout the years faced different scenarios, from the use of a single inhibitor to the combination of three inhibitors targeting at least two different steps of the viral cycle in single day pill known as highly active antiretroviral therapy (HAART). Despite the improvement observed, the constant development of new drug resistant strains to the presently used inhibitors demand an incessant search for alternative treatments.

Peptides appear as good substitutes to small molecules, given their high specificity, and low toxicity. Regarding the combat of viral infections, antiviral peptides (AVPs) have been discovered in the past years. Although the majority are also known as antimicrobial peptides (AMPs), which are characterized by their broad spectrum of action (from bacteria to virus, passing through fungi) with different mechanisms depending on the targeted pathogen, AVPs can also be found in proteins from the virus itself. The Defensins, and Cathelicidins are two families of AMPs with anti-HIV-1 activity. On the other hand, one of most successful AVPs, the enfuvirtide, is derived from the HIV-1 envelope protein gp41 and its currently the only anti-HIV-1 fusion inhibitor peptide in the market. Moreover, a recently published research from our lab uncovered the potential of viral proteins as an unexplored source for bioactive peptides. Therefore, the present work intended to scan viral proteins as a source of novel antiviral peptides sequences with anti-HIV-1 activity.

The presence of small regions with antiviral propensity (20 residues long) in multifunctional viral proteins was examined using a trained online tool named AVPpred. From these, a pool of thirteen peptides, containing the best single protein derived peptides, was selected according to their antiviral potential determined by the AVPpred models. Moreover, given the importance of the net charge of the peptides to the AMP activity, this property was studied for its influence in AVP prediction. Therefore, a plot of the net charge of each peptide against its antiviral predicted value was made. Empirically was observed a correlation between the two variables. However, statistically the correlation was irrelevant. Finally, the antiviral potential of these was experimentally analyzed to validate the viability of using viral proteins as an antiviral peptidic source.

The pseudovirus HIV-1_{NL4.3} was used to calculate the concentration of peptide needed to inhibit fifty percent (IC₅₀) of the viral infection in a single cycle assay. From the tested peptides, six had low activity (IC₅₀ ≥ 100 μM); five had moderate activity (100 μM > IC₅₀ > 12.5 μM); and the peptides vAVP 1472 and vAVP 1137 were highly active against HIV-1_{NL4.3} and appeared to have different mechanism of action. The mode of action of these last two peptides was proposed based on their dose-response curves. Despite the high activity of the vAVP 1137, the maximum concentration of peptide used was able to inhibit only 80% of HIV-1 infection, whereas the maximum concentration of vAVP 1472 used was able to completely inhibit the HIV-1 infection. This difference can be explained by different inhibition targets of the peptides in different steps of the viral cycle.

The single cycle assay was conducted using cells expressing luciferase, which is regulated by the trans-activator of transcription (Tat) protein, and allows to quantify the efficacy of viral infection. The amount of luciferase expressed was measured by its enzymatic conversion of luciferin to oxy-luciferin, which irradiates bioluminescence. The inhibition of the viral infection at early steps of its

ABSTRACT

cycle (before integration) disables the expression of Tat and therefore the expression of luciferase, whereas the inhibition of the viral infection at late steps (post integration) enables a basal expression of luciferase, even with a successful inhibition of viral infection.

A comparison between the prediction of AVP by AVPpred and the results obtained through the *in vitro* assays was made. In opposite to the prediction, three peptides did not reveal any anti-HIV-1 activity. Instead, these peptides promoted the viral infection in a dose dependent manner.

The results obtained with the present work showed that the peptide derived from the capsid protein of Dengue virus type 3, vAVP 1472, and the peptide derived from the capsid protein of Human coronavirus, vAVP 1137 were highly active against HIV-1. From two databases present in the literature, containing peptides from diverse origins with described activity against HIV-1 (HIPdb), and other viruses (AVPdb) was observed that the majority of the peptides derived from viral proteins targeted their virus of origin. The results obtained for the vAVP 3400 supported this observation, since the peptides was already described with anti-respiratory syncytial virus activity (the virus of origin), and its activity against HIV-1 was moderate. Nevertheless, with the results obtained for the highly active peptides, the spectrum of action of these peptides was increased.

In conclusion, the potential of using viral proteins as antiviral peptides was confirmed, giving more insights for the use of antiviral peptides.

Key words: HIV-1; AVPpred; Antiviral peptides (AVPs); Fifty percent inhibitory concentration (IC₅₀).