

Título em Português:	Triagem de compostos para a identificação de fármacos contra o vírus Chikungunya utilizando sistema replicon subgenômico
Título em Inglês:	Screening of compounds for the identification of drugs against the Chikungunya virus using a subgenomic replicon system
Autor:	Lucca Rocha Policastro
Instituição:	Instituto de Física de São Carlos
Unidade:	Instituto de Física de São Carlos
Orientador:	Glaucius Oliva
Área de Pesquisa / SubÁrea:	Biofísica Molecular
Agência Financiadora:	FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Triagem de compostos para a identificação de fármacos contra o vírus Chikungunya utilizando sistema replicon subgenômico

Lucca Rocha Policastro

Isabela Dolci

Rafaela Sachetto Fernandes

Laura Helena Vega Gonzales Gil

Glaucius Oliva

USP São Carlos

lrpolicastro@gmail.com

Objetivos

O objetivo deste projeto foi utilizar a linhagem replicon repórter, BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650, para a triagem de alta performance (*high-throughput screening*, HTS) de bibliotecas de compostos na busca por potenciais inibidores da replicação do vírus Chikungunya (CHIKV). A inibição da replicação viral foi avaliada através da atividade da proteína repórter (*Gaussia* luciferase). Para os compostos selecionados, os quais exibiram inibição da atividade da luciferase $\geq 80\%$ e viabilidade celular $\geq 80\%$, foram determinados os parâmetros farmacodinâmicos de EC_{50} (efetividade) e de CC_{50} (citotoxicidade), bem como o índice de seletividade ($IS = CC_{50}/EC_{50}$).

Métodos e Procedimentos

A linhagem BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650 foi desenvolvida em colaboração com a equipe da Profa. Dra. Laura Helena V. G. Gil, do Instituto Aggeu Magalhães (IAM - Fiocruz), por recombinação homóloga em levedura. As células expressam o replicon viral contendo as sequências gênicas das proteínas não-estruturais do CHIKV, a *Gaussia* luciferase

(Gluc) como proteína repórter substituindo as proteínas estruturais, e a neomicina fosfotransferase, que permite a manutenção do sistema nas células de forma estável.

Nos ensaios HTS, as células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB) e o antibiótico geneticina (G418) a 500 $\mu\text{g/mL}$ até atingirem 70-90% de confluência. Então, foram semeadas em placas de 96 poços transparentes (2×10^4 células em 100 μL de meio por poço), em meio DMEM 10% SFB sem G418. Após 24 horas, o meio foi trocado para DMEM 2% SFB e compostos adicionados em concentração de 10 μM . Como controle positivo foi utilizada a suramina, inibidor conhecido da replicação do CHIKV *in vitro* (Albulescu et al., 2020). Como controle negativo foi usado o dimetilsulfóxido (DMSO 1%), que apresenta 0% de inibição. Após 48 h, a inibição da replicação viral pelos compostos foi avaliada por meio da atividade da proteína repórter, Gluc (Xie et al. 2016), e a toxicidade destes foi analisada por ensaio de proliferação celular baseado em MTT (Li et al. 2018). Os compostos cuja inibição da atividade da Gluc foi $\geq 80\%$ e a toxicidade foi baixa para as células replicon (ou seja, viabilidade celular $\geq 80\%$), foram selecionados e avaliados individualmente de maneira dose-dependente, através de curvas de

diluição seriada fator 2, em duplicata e em dois ensaios independentes.

Resultados

Foram avaliadas duas bibliotecas do MMV/DNDi, a COVID Box e Pandemic Response Box, totalizando 560 compostos testados. Destes, 7 atenderam aos critérios pré-estabelecidos, inibindo ao menos 80% da atividade da Gluc e mantendo ao menos 80% da proliferação celular (Figura 1). No entanto, 3 dos 7 compostos não exibiram inibição dose-dependente e outro, a Tomatidina, já havia sido descrito na literatura como inibidor da replicação do CHIKV *in vitro* (Troost et al., 2020).

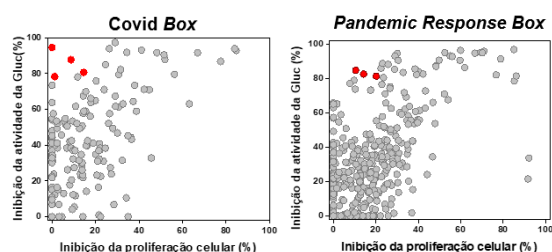


Figura 1: Gráficos de dispersão do HTS da inibição da atividade da Gluc em relação à inibição da proliferação celular para as bibliotecas testadas.

Em relação aos demais, foi possível obter os dados de efetividade, citotoxicidade e o índice de seletividade para cada um, conforme apresentado na Tabela 1. O composto MMV637528, o antifúngico itraconazol, presente na COVID Box, exibiu $EC_{50} = 6,1 \pm 1,0 \mu M$, $CC_{50} > 50 \mu M$ e, portanto, $IS > 8,2$. O composto MMV690621, da Pandemic Response Box, um antiviral sem nome comercial, apresentou $EC_{50} = 1,0 \pm 0,05 \mu M$, $CC_{50} > 10 \mu M$ e $IS > 10$. Por fim, o MMV1580796, o antiviral rubitecan, também da Pandemic Response Box, obteve $EC_{50} = 0,6 \pm 0,1 \mu M$, $CC_{50} > 10 \mu M$ e $IS > 16$.

Composto	Classificação	Nome	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IS
MMV637528	Antifúngico	Itraconazol	$6,1 \pm 1,0$	>50	$>8,2$
MMV690621	Antiviral	-	$1,0 \pm 0,05$	>10	>10
MMV1580796	Antiviral	Rubitecan	$0,6 \pm 0,1$	>10	>16

Tabela 1: Parâmetros de EC_{50} , CC_{50} e IS dos compostos avaliados de forma dose-dependente.

Conclusões

Os ensaios baseados na linhagem replicon repórter BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650 demonstraram eficiência para a triagem de pequenas moléculas das bibliotecas do MMV/DNDi. Do total de compostos analisados, 3 tiveram resultados promissores, com índices de seletividade de $> 8,2$, > 10 e > 16 . Como perspectiva, ensaios de infecção viral serão realizados em colaboração com a Profa. Ana Carolina Jardim, da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a fim de corroborar os resultados antivirais obtidos com os ensaios baseados em replicon.

Referências Bibliográficas

- I. C. Albulescu et al. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Replication by Interacting with Virions and Blocking the Early Steps of Infection. *Viruses*. 2020
- X. Xie et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. *EBioMedicine*. 2016
- L. JQ et al. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika vírus. *Antiviral research*. 2018
- B. Troost et al. Tomatidine, a natural steroidal alkaloid shows antiviral activity towards chikungunya virus *in vitro*. *Scientific Reports*. 2020

Screening of compounds for the identification of drugs against the Chikungunya virus using a subgenomic replicon system

Lucca Rocha Policastro

Isabela Dolci

Rafaela Sachetto Fernandes

Laura Helena Vega Gonzales Gil

Glaucius Oliva

USP São Carlos

lrpolicastro@gmail.com

Objectives

The aim of this project was to use the reporter replicon cell line, BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650, for high-throughput screening (HTS) of compound libraries in the search for potential inhibitors of Chikungunya virus (CHIKV) replication. Inhibition of viral replication was assessed through the activity of the reporter protein (Gaussia luciferase). For the selected compounds, which decreased the luciferase activity in $\geq 80\%$ and displayed a cell viability $\geq 80\%$, the pharmacodynamic parameters of EC_{50} (effectiveness) and CC_{50} (cytotoxicity), as well as the selectivity index ($IS = CC_{50}/EC_{50}$) were determined.

Materials and Methods

The BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650 cell line was developed in collaboration with the group of Prof. Dr. Laura Helena V. G. Gil, from the Instituto Aggeu Magalhães (IAM - Fiocruz), by homologous recombination in yeast. The cells express the viral replicon containing the gene sequences of the non-structural proteins of CHIKV, the Gaussia luciferase (Gluc) as a reporter protein replacing the structural proteins,

and neomycin phosphotransferase, which allows the system to be stably maintained in the cells.

For the HTS assays, cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and the antibiotic geneticin (G418) at 500 $\mu\text{g/mL}$ until they reached 70-90% confluence. Then, they were seeded in clear bottom 96-well plates (2×10^4 cells in 100 μL of medium per well) in 10% SFB DMEM medium without G418. After 24 hours, the medium was replaced to DMEM 2% SFB and compounds were added at a 10 μM concentration. Suramin, a known inhibitor of CHIKV replication *in vitro* (Albulescu et al., 2020), was used as a positive control. As a negative control, dimethyl sulfoxide (DMSO 1%) was used (0% inhibition). After 48 h, the inhibition of viral replication by the compounds was assessed through the activity of the reporter protein Gluc (Xie et al. 2016) and their toxicities were analyzed by MTT-based cell proliferation assay (Li et al. 2018). Compounds showing an inhibition of Gluc activity in $\geq 80\%$ and a low toxicity for replicon cells (i.e., cell viability $\geq 80\%$) were selected and evaluated individually in a dose-dependent manner by serial factor 2 dilution curves, in duplicate and in two independent assays.

Results

Two MMV/DNDi libraries, COVID Box and Pandemic Response Box, were evaluated totaling 560 compounds tested. Of these, 7 met the pre-established criteria, inhibiting at least 80% of Gluc activity and maintaining at least 80% of cell viability (Figure 1). However, 3 of the 7 compounds did not exhibit dose-dependent inhibition and another, named Tomatidine, had already been described in the literature as an inhibitor of CHIKV replication *in vitro* (Troost et al., 2020).

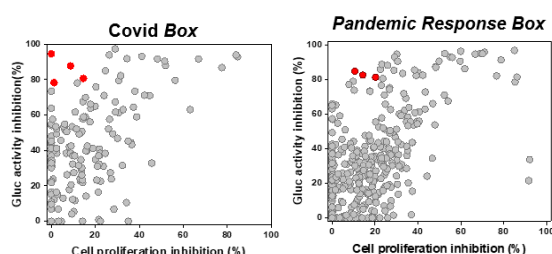


Figure 1: HTS scatter plots of Gluc activity inhibition versus cell proliferation inhibition for the tested libraries.

Regarding the other compounds, it was possible to obtain the effectiveness, cytotoxicity, and the selectivity indexes for each, as presented in Table 1. Compound MMV637528, the antifungal itraconazole, present in COVID Box, exhibited $EC_{50} = 6.1 \pm 1.0 \mu M$, $CC_{50} > 50 \mu M$ and thus $IS > 8.2$. Compound MMV690621, from Pandemic Response Box, an antiviral with no commercial name, displayed $EC_{50} = 1.0 \pm 0.05 \mu M$, $CC_{50} > 10 \mu M$ and $IS > 10$. Finally, MMV1580796, the antiviral rubitecan, also from Pandemic Response Box, obtained $EC_{50} = 0.6 \pm 0.1 \mu M$, $CC_{50} > 10 \mu M$ and $IS > 16$.

Compound	Classification	Name	EC_{50} (μM)	CC_{50} (μM)	IS
MMV637528	Antifungal	Itraconazole	6.1 ± 1.0	>50	>8.2
MMV690621	Antiviral	-	1.0 ± 0.05	>10	>10
MMV1580796	Antiviral	Rubitecan	0.6 ± 0.1	>10	>16

Table 1: EC_{50} , CC_{50} and IS parameters of the compounds evaluated in a dose-dependent manner.

Conclusions

Reporter replicon-based assays using BHK-21-Rep-T7-Gluc-nSP-CHIKV-99650 cell line, demonstrated to be efficient for screening small molecules from MMV/DNDi libraries. Of the total compounds analyzed, 3 showed promising results, with selectivity indexes of > 8.2 , > 10 and > 16 . As a perspective, viral infection assays will be performed in collaboration with Prof. Ana Carolina Jardim, from the Federal University of Uberlândia (UFU), to corroborate the antiviral results obtained with the replicon-based assays.

References

- I. C. Albulescu et al. Suramin Inhibits Chikungunya Virus Replication by Interacting with Virions and Blocking the Early Steps of Infection. *Viruses*. 2020
- X. Xie et al. Zika Virus Replicons for Drug Discovery. *EBioMedicine*. 2016
- L. JQ et al. Development of a replicon cell line-based high throughput antiviral assay for screening inhibitors of Zika vírus. *Antiviral research*. 2018
- B. Troost et al. Tomatidine, a natural steroidal alkaloid shows antiviral activity towards chikungunya virus *in vitro*. *Scientific Reports*. 2020