

|                                    |                                                                                                                   |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Título em Português:</b>        | Triagem de compostos para a identificação de fármacos contra o vírus Zika utilizando sistema replicon subgenômico |
| <b>Título em Inglês:</b>           | Screening of compounds for the identification of drugs against the Zika virus using a subgenomic replicon system  |
| <b>Autor:</b>                      | Isabela Dolci                                                                                                     |
| <b>Instituição:</b>                | Instituto de Física de São Carlos                                                                                 |
| <b>Unidade:</b>                    | Instituto de Física de São Carlos                                                                                 |
| <b>Orientador:</b>                 | Rafaela Sachetto Fernandes                                                                                        |
| <b>Área de Pesquisa / SubÁrea:</b> | Biologia Molecular                                                                                                |
| <b>Agência Financiadora:</b>       | FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo                                                     |

## Triagem de compostos para identificação de fármacos contra o vírus Zika utilizando sistema replicon subgenômico.

Isabela Dolci

Lucca Rocha Policastro

Glaucius Oliva

Rafaela Sachetto Fernandes

USP São Carlos

isabela@estudante.ufscar.br

### Objetivos

O objetivo deste trabalho foi realizar a triagem de alta performance (*high-throughput screening*, HTS) de bibliotecas de pequenas moléculas para identificação de agentes antivirais contra o Zika vírus (ZIKV), utilizando a linhagem replicon repórter, denominada BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo. Para os compostos selecionados nesta primeira etapa ( $\geq 80\%$  de inibição da atividade da luciferase e  $\geq 80\%$  de viabilidade celular), as curvas dose-resposta de  $EC_{50}$  (efetividade) e  $CC_{50}$  (citotoxicidade) foram determinadas para se obter o índice de seletividade ( $IS = CC_{50}/EC_{50}$ ) destas moléculas. Para o Remdesivir, que apresentou alto índice de seletividade ( $IS = 88,6$ ), também foi realizada uma transcrição reversa associada a uma PCR quantitativa para determinar a porcentagem de inibição do RNA replicon nas células tratadas com este composto.

### Métodos e Procedimentos

A linhagem BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo (Fernandes et al. 2021), expressa o replicon de Zika vírus que possui as proteínas não-estruturais, que formam o complexo de replicação do genoma viral, uma proteína repórter, a *Renilla* luciferase (Rluc), substituindo

as proteínas estruturais do vírus e o gene Neo (neomicina fosfotransferase), que permite a expressão do RNA replicon nas células de mamífero, BHK-21 (*Baby hamster kidney*), de forma estável.

Para os ensaios HTS, as células foram cultivadas em garrafas contendo 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, quando então foram semeadas em placas de 96 poços transparente ( $2 \times 10^4$  células em 100  $\mu\text{L}$  de meio por poço). Após 24 horas, os compostos foram adicionados em concentração de 10  $\mu\text{M}$ . Como controle positivo foi utilizado o composto NITD008 (100% de inibição), um conhecido inibidor da replicação de ZIKV e para controle positivo o dimetilsulfóxido (DMSO 1%) (0% de inibição). Após 48 h, a inibição da replicação viral pelos compostos foi avaliada através da atividade da proteína repórter, Rluc (Xie et al. 2016) e a toxicidade dos mesmos foi verificada por ensaio de proliferação celular baseado em MTT (Li et al. 2018). Os compostos que inibiram a atividade da Rluc em  $\geq 80\%$  e se mostraram pouco tóxicos para as células replicon (viabilidade celular acima de 80%) foram selecionados e avaliados de maneira dose-dependente por meio de curvas de diluição seriada fator 2, em duplicada e em dois ensaios independentes. Para confirmar e quantificar a

inibição da replicação pelo Remdesivir (RDV) que resultou em alto índice de seletividade (88,6), este foi adicionado em sua concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) aos poços de placas de 6 poços, contendo  $3 \times 10^5$  células, e após 48 h de incubação, o RNA foi extraído das células, utilizado como molde para síntese de cDNA e uma PCR quantitativa foi realizada em seguida, tendo como controle negativo células tratadas com DMSO 1%.

## Resultados

Duas bibliotecas do MMV/DNDi foram testadas, totalizando 560 compostos, sendo 160 da biblioteca COVID Box e 400 da biblioteca Pathogen Box. Destes, 11 reduziram o sinal da luciferase em  $\geq 80\%$  com baixa toxicidade e foram submetidos à análise dose-resposta, resultando em 4 compostos com resposta dose-dependente.

O Silmitasertib, um agente antitumoral, apresentou índice de seletividade  $\geq 14$ , a Bedaquilina, um agente antimicobacteriano, apresentou índice de seletividade  $\geq 1,9$ , o composto MMV020391, um antimalárico, apresentou índice de seletividade  $\geq 2,3$  e o Remdesivir, o composto mais promissor, apresentou concentração efetiva ( $EC_{50}$ ) de  $0,9 \pm 0,1 \mu M$  e  $CC_{50}$  de  $79,4 \pm 6,4 \mu M$ , resultando num excelente IS de 88,6. Uma RT-qPCR foi então realizada para o Remdesivir, onde obteve-se 73% de redução da replicação viral, como observado na figura 1.

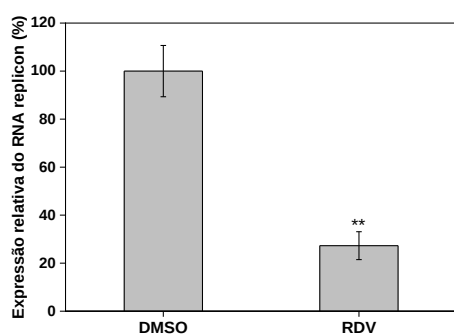


Figura 1. Análise por qRT-PCR da redução da expressão do RNA replicon das células tratadas com RDV a  $0,9 \mu M$ . \*\*\* $p < 0,05$ .

## Conclusões e perspectivas

A utilização da linhagem replicon repórter BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo para triagem de duas bibliotecas de pequenas moléculas do MMV/DNDi, se mostrou bastante eficaz para a identificação de inibidores da replicação viral, resultando em 4 compostos com índices de seletividade variando de  $\geq 1,9$  a 88,6. O Remdesivir, identificado como potente inibidor da replicação do ZIKV através dos ensaios baseados em replicon, é um conhecido antiviral capaz de inibir a RNA polimerase RNA dependente de flavivírus, além de já ser um fármaco aprovado para os vírus da Ébola e da COVID-19. Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que o Remdesivir é uma molécula promissora para ser melhor caracterizada como potencial fármaco anti-ZIKV através de ensaios de infecção viral que serão realizados em colaboração com o grupo da Profa. Ana Carolina Jardim (Universidade Federal de Uberlândia).

## Referências Bibliográficas

- R. Fernandes et al. Discovery of an imidazonaphthyridine and a riminophenazine as potent anti-Zika virus agents through a replicon-based high-throughput screening. Virus Research. 2021
- 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

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

Isabela Dolci

Lucca Rocha Policastro

Glaucius Oliva

Rafaela Sachetto Fernandes

USP São Carlos

isabela@estudante.ufscar.br

### Objectives

The objective of this work was to perform a high-throughput screening (HTS) of small molecule libraries for the identification of antiviral agents against Zika virus (ZIKV), using a reporter replicon cell line, denominated BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo. For the compounds selected in HTS primary assays ( $\geq 80\%$  inhibition of luciferase activity and  $\geq 80\%$  of cell viability), the  $EC_{50}$  (effectivity) and  $CC_{50}$  (cytotoxicity) values were determined to obtain their selectivity indexes ( $SI = CC_{50} / EC_{50}$ ). For Remdesivir, which has a high selectivity index ( $SI = 88.6$ ), a reverse transcription associated with a quantitative PCR was also performed to determine the levels of RNA replicon in cells treated with this compound at its effective concentration.

### Materials and Methods

The BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo (Fernandes et al. 2021) cell line express the Zika virus replicon that contains the non-structural proteins, which form the viral genome replication complex; the reporter protein *Renilla* luciferase (Rluc) replacing the structural proteins of the virus; and the Neo gene (neomycin phosphotransferase), which allows the stable

expression of RNA replicon in BHK-21 (Baby hamster Kidney) mammalian cells.

For the HTS assays, the cells were grown in DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (SFB) and the antibiotic geneticin (G418) at 500  $\mu\text{g/mL}$  until they reach 70-90% confluence, when they were then seeded in 96-well transparent plates ( $2 \times 10^4$  cells in 100  $\mu\text{l}$  of medium per well). After 24 hours, the compounds were added to the cells at 10  $\mu\text{M}$  concentration. NITD008 (100% inhibition), a known inhibitor of ZIKV replication was used as positive control, while DMSO 1% was used as negative control (0% inhibition). After 48 h, the inhibition of viral replication by the compounds was evaluated through the activity of the reporter protein, Rluc (Xie et al. 2016) and their toxicities were analyzed by MTT-based cell proliferation assay (Li et al. 2018). The compounds that inhibited Rluc activity in  $\geq 80\%$  and showed low toxicity to the replicon cells (cell viability above 80%) were selected and evaluated in a dose-dependent manner in duplicates and the experiments were performed twice. To further evaluate the inhibition of the replicon replication by Remdesivir (RDV), which resulted in a high selectivity index (88.6),  $3 \times 10^5$  cells per well in a 6-well plate were treated with this compound at its effective concentration ( $EC_{50}$ ) for 48 h. 1% DMSO was used as negative control. Next, total RNA was extracted from the cells and used as template for the cDNA synthesis. A quantitative PCR was then performed to quantify the levels

of replicon RNA expression in cells treated with RDV.

## Results

The replicon-based HTS assays were performed for 560 compounds from two MMV/DNDi libraries, 160 from the COVID Box and 400 from the Pathogen Box libraries. From the total, 11 reduced the Rluc signals in  $\geq 80\%$  with low toxicity and were evaluated in a dose-dependent manner, resulting in 4 compounds showing specific antiviral activities.

Silmitasertib, an antitumoral agent, showed a SI of  $>14$ ; Bedaquiline, an antimicrobial agent, showed a SI of  $>1.9$ ; the compound MMV020391, an antimalarial, showed a SI of  $>2.3$  and Remdesivir, the most promising compound, displayed an effective concentration ( $EC_{50}$ ) of  $0.9 \pm 0.1 \mu\text{M}$  and a  $CC_{50}$  of  $79.4 \pm 6.4 \mu\text{M}$ , resulting in an excellent SI of 88.6. A RT-qPCR was performed for Remdesivir and a 73% reduction in replicon replication was obtained, as observed in Figure 1.

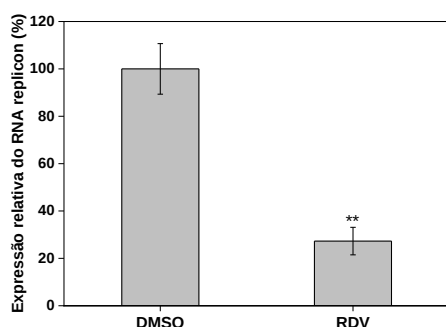


Figure 1. qRT-PCR analysis of the replicon RNA expression of cells treated with RDV at  $0.9 \mu\text{M}$  concentration. \*\*\* $p < 0.05$ .

## Conclusions

The use of the reporter replicon cell line BHK-21-RepZIKV\_IRES\_Neo for the HTS assays of two MMV/DNDi libraries of small-molecule compounds has proved to be quite effective for the identification of viral replication inhibitors, resulting in 4 compounds with selectivity indexes ranging from 1.9 to 88.6. Remdesivir, identified as a potent inhibitor of ZIKV replication through

replicon-based assays, is a known antiviral capable of inhibiting flavivirus RNA-dependent RNA polymerase, and has been approved for the treatment of Ebola and COVID-19. The results obtained herein demonstrate that Remdesivir is a promising molecule to be further characterized as a potential anti-ZIKV drug through viral infection assays that will be performed in collaboration with Prof. Ana Carolina Jardim (Federal University of Uberlândia).

## References

- R. Fernandes et al. Discovery of an imidazonaphthyridine and a riminophenazine as potent anti-Zika virus agents through a replicon-based high-throughput screening. *Virus Research*. 2021
- 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