

DESARROLLO DE NUEVAS ALTERNATIVAS TERAPEÚTICAS FRENTE A LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS



Clara Martín Martín
Directoras:
Dra. Pilar Pérez Romero y Dra. Estéfani
García Ríos

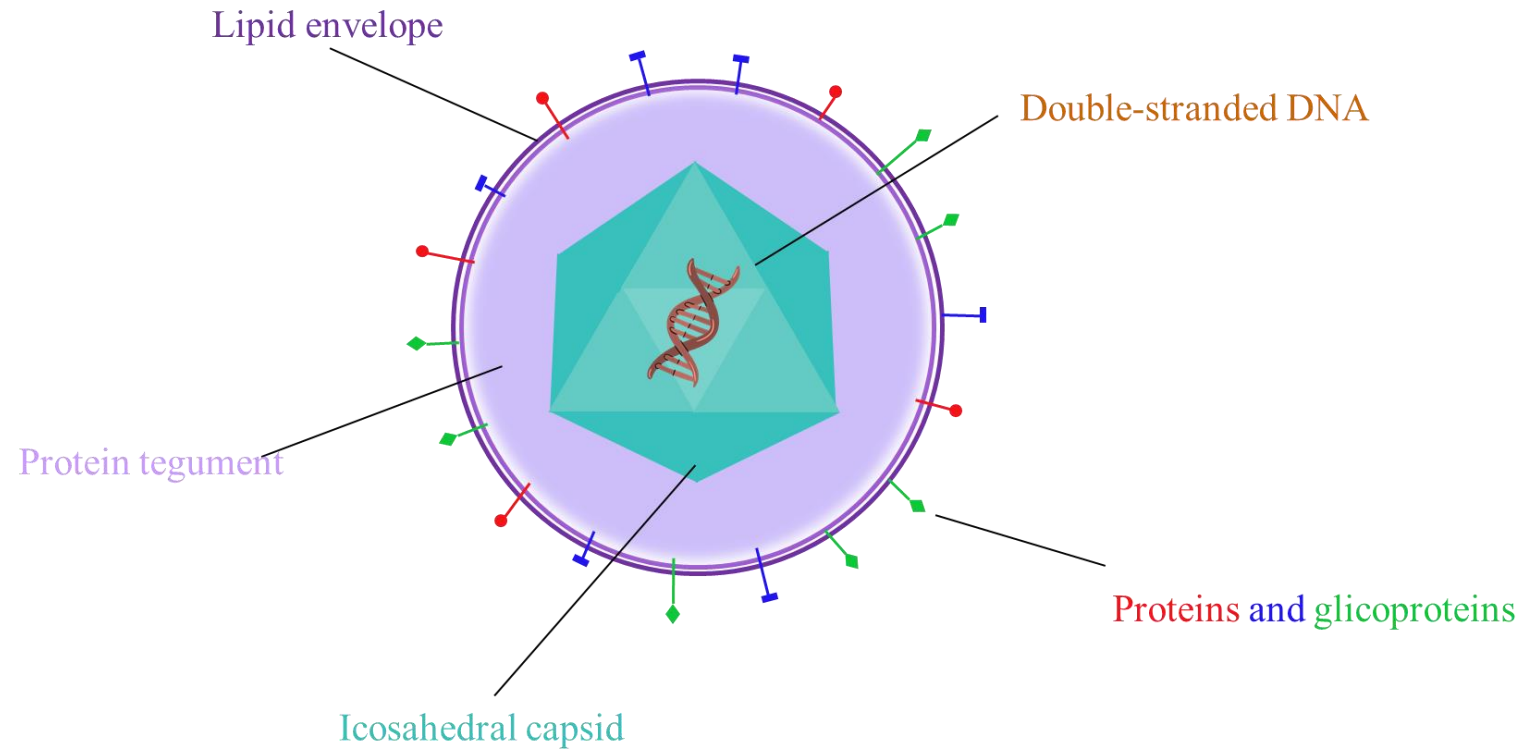


1. Introducción

Citomegalovirus humano (HCMV)

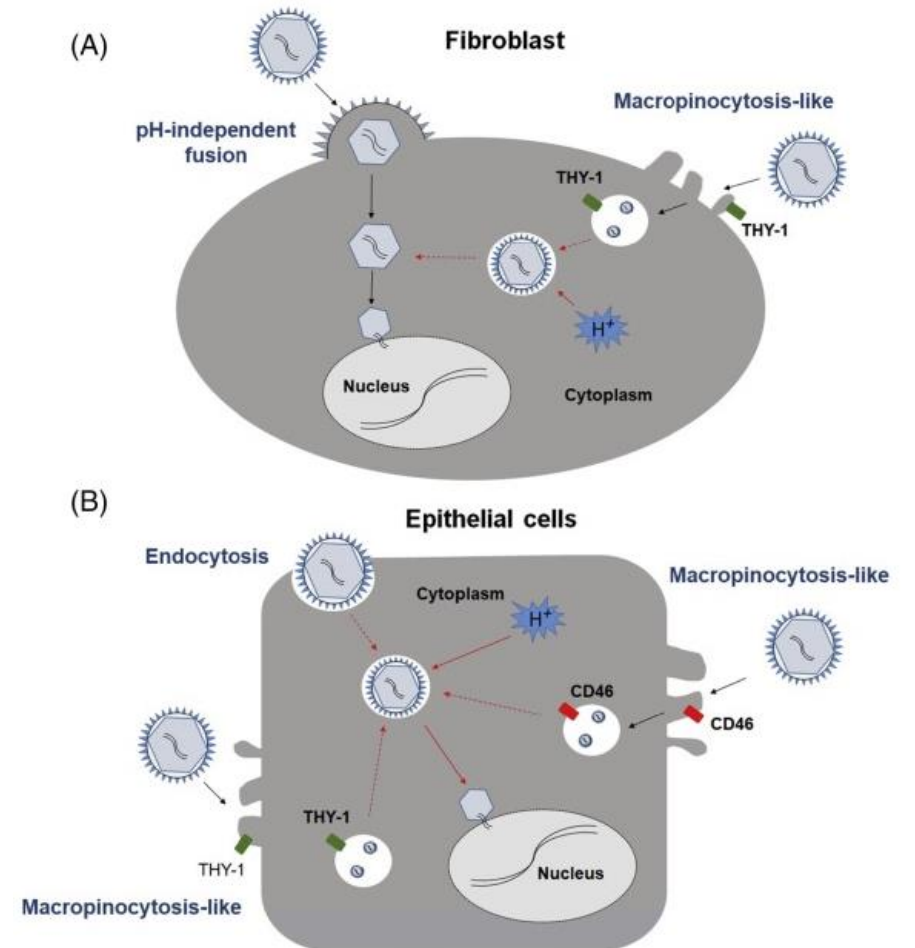
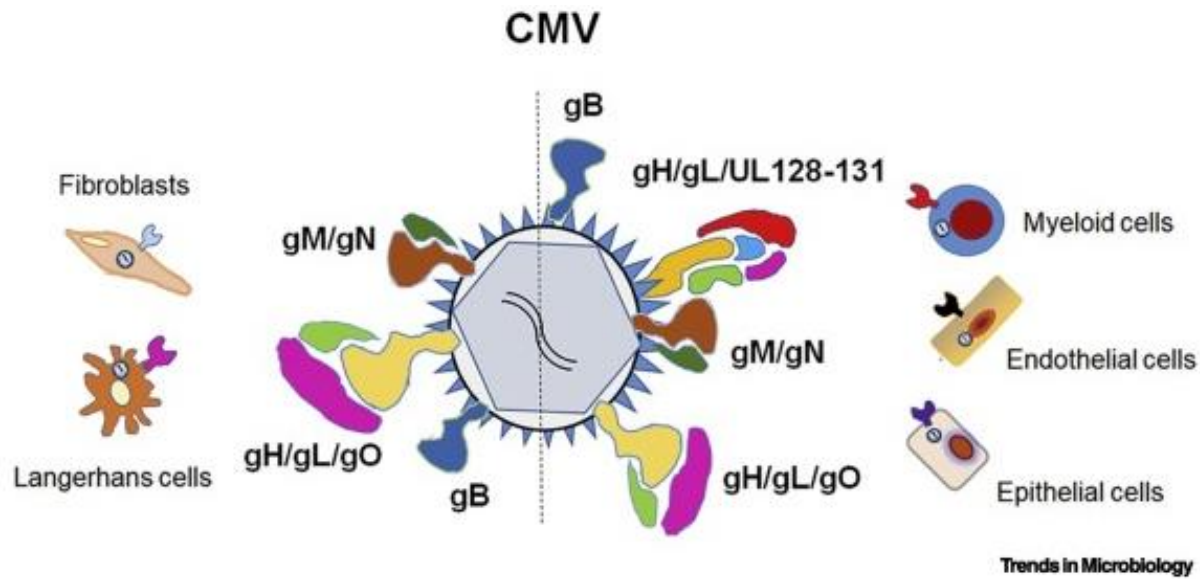
Familia *Herpesviridae*

Subfamilia *Betaherpesviridae*

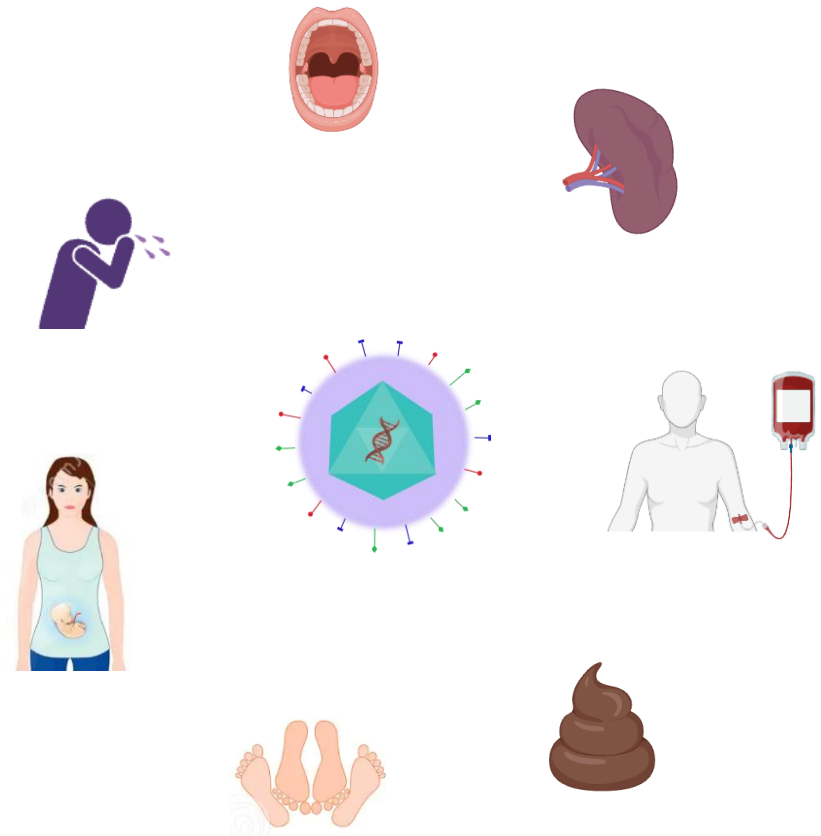
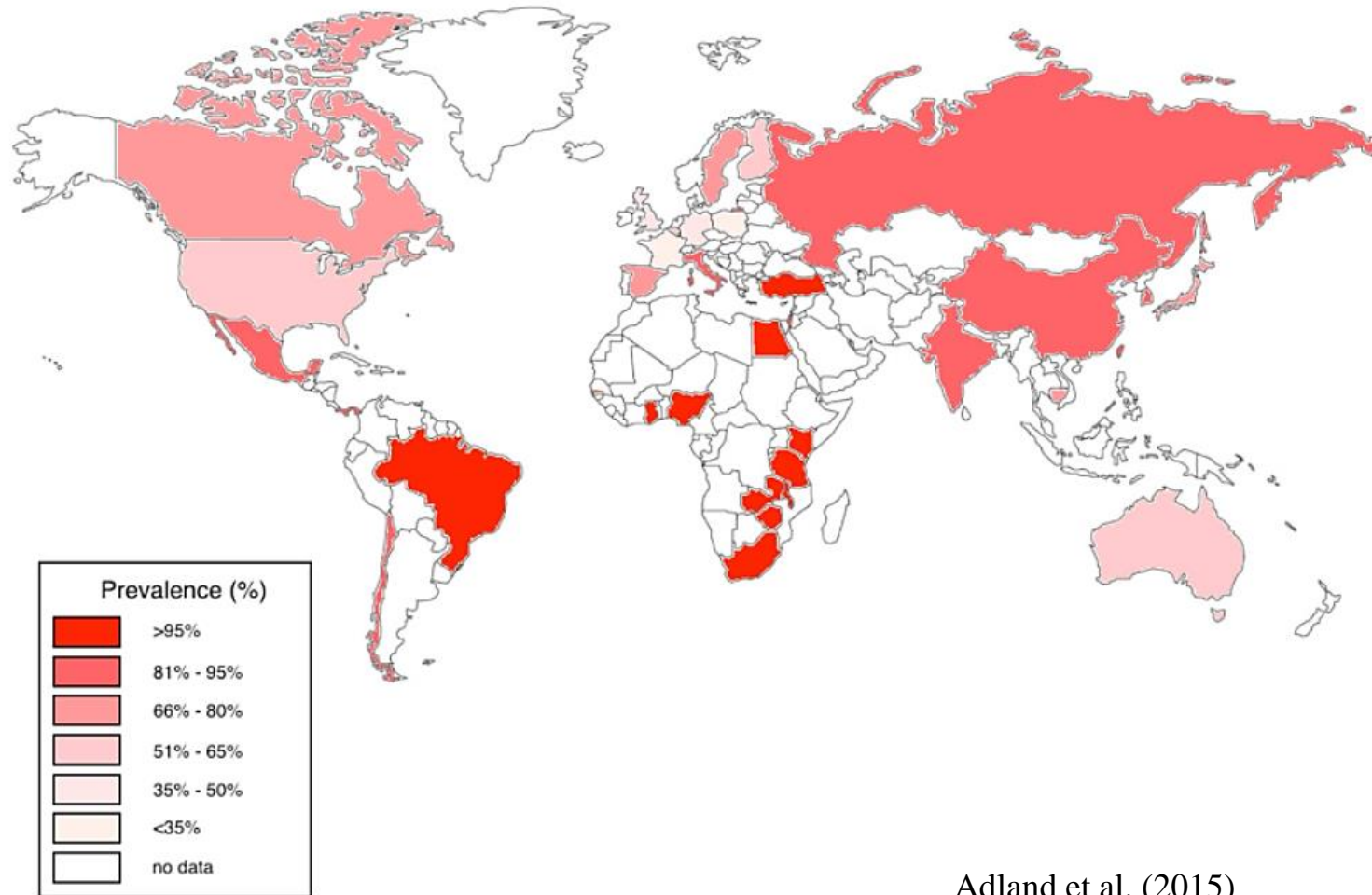


1. Introducción: entrada y tropismo

Citomegalovirus humano (HCMV)



1. Introducción: prevalencia y transmisión



Adland et al. (2015)

1. Introducción: grupos de riesgo

Inmunodeprimidos



Retinitis

Neumonitis

Encefalitis

Aborto espontáneo

Secuelas neurológicas en recién nacidos

↓ Crecimiento intrauterino

...

Inmunocompetentes



Fiebre

Sudoración

Malestar

...

1. Introducción: vacunas

Table 4 - Live HCMV vaccines.

4.1. Towne vaccine	Developed by Plotkin <i>et al.</i> (1975) following 125 passages in HELF, the Towne vaccine exhibited the following properties in Phase I/III clinical studies: 1) no virus excretion; 2) no virus latency; 3) NAb induction; 4) generation of both HCMV-specific CD4 ⁺ and CD8 ⁺ T-cells; 5) partial protection against virus challenge in both the immunocompetent and the immunocompromised host; 6) The molecular basis of attenuation was later attributed to a 2-bp insertion (TT) causing an aa frameshift mutation in 130 (Murphy <i>et al.</i> , 2003).
4.2. AD-169 vaccine	Developed by Elek & Stern in 1974 in London, the AD-169 vaccine was abandoned at the end of the 70s (Neff <i>et al.</i> , 1979). Later in 2012, the mutated PC in AD-169 was restored by serial passages in endothelial cells (Fu <i>et al.</i> , 2012). The revertant AD-169 virus with a restored PC was genetically modified by incorporating a synthetic compound (Shield-1), which allows virus replication only in its presence. This disabled infectious single-cycle (DISC) HCMV vaccine, named V160, was able to induce both humoral and T-cell responses in NHP (Wang <i>et al.</i> , 2016) as well as in humans in a Phase I study (Fu <i>et al.</i> , 2018).
4.3. Towne/Toledo chimera vaccines	Four genetic Towne/Toledo recombinant chimera vaccine candidates were constructed by substituting genomic regions of the low-passage Toledo strain with attenuated Towne strain genomic regions (Kimble <i>et al.</i> , 1996). In a Phase I study, vaccines were well tolerated and not excreted in humans (Adler <i>et al.</i> , 2016).
4.4. Viral vectored HCMV vaccines	The following heterologous viral vectors were used to deliver HCMV antigens (clinical trials Phase I experiments): 1) Canarypox virus vector, delivering either gB (Adler <i>et al.</i> , 1999) or pp65 (Berencsi <i>et al.</i> , 2001) (Phase I). 2) Alphavirus vector, the Venezuelan Equine Encephalitis (VEE) virus delivering extracellular gB and a pp65/IE-1 fusion protein (Reap <i>et al.</i> , 2007a, b) (Phase I). 3) Lymphocyte choriomeningitis virus vector, delivering pp65 and gB in a bivalent vaccine (Schleiss <i>et al.</i> , 2017a) (Phase I). 4) Modified vaccinia Ankara virus (MVA) vector expressing: a) pp65, gB, IE-1, IE-2, PC (Wussow <i>et al.</i> , 2013); b) pp65, IE-1 (exon-4) and IE-2 (exon-5) in the Triplex vaccine (La Rosa <i>et al.</i> , 2017) (Phase I); c) all five PC subunits in HEK cells or following BAC-cloning of MVA vector (Chiuppesi <i>et al.</i> , 2017; Wussow <i>et al.</i> , 2018) (mice). 5) Adenovirus type 6 vector expressing IE-1, IE-2 and pp65 (Tang <i>et al.</i> , 2017) (mice & NHP).
4.5. Alphavirus replicon particles (VRPs) vaccines	A VRP vaccine is an RNA-based vaccine consisting of an attenuated strain of VEE virus, in which the structural VEE virus protein genes are replaced with HCMV genes encoding for gB or the pp65/IE-1 fusion protein and VEE non-structural genes, while two helper RNAs encode for VEE structural proteins allowing replicon RNA packaging into VRPs. 1) A bicistronic vaccine (AVX601) expressing gB and a pp65/IE-1 fusion protein was developed (Reap <i>et al.</i> , 2007a, b) and shown to be safe and immunogenic in humans in a Phase I trial (Bernstein <i>et al.</i> , 2010). 2) Recently, a comparison of VRPs encoding HCMV gH/gL and PC with purified gH/gL and PC complexes showed that PC elicits higher NAb titers than gH/gL in mice (Wen <i>et al.</i> , 2014).

PC, pentameric complex; VEE Venezuelan equine encephalitis virus; MVA, Modified Vaccinia Ankara virus; VRPs, Virus Replicon Particles; NAb, Neutralizing Antibody; HELF, human embryonic lung fibroblasts; aa, aminoacid; HEK, human embryonic kidney; NHP, non-human primates.

Table 5 - Non-living HCMV vaccines.

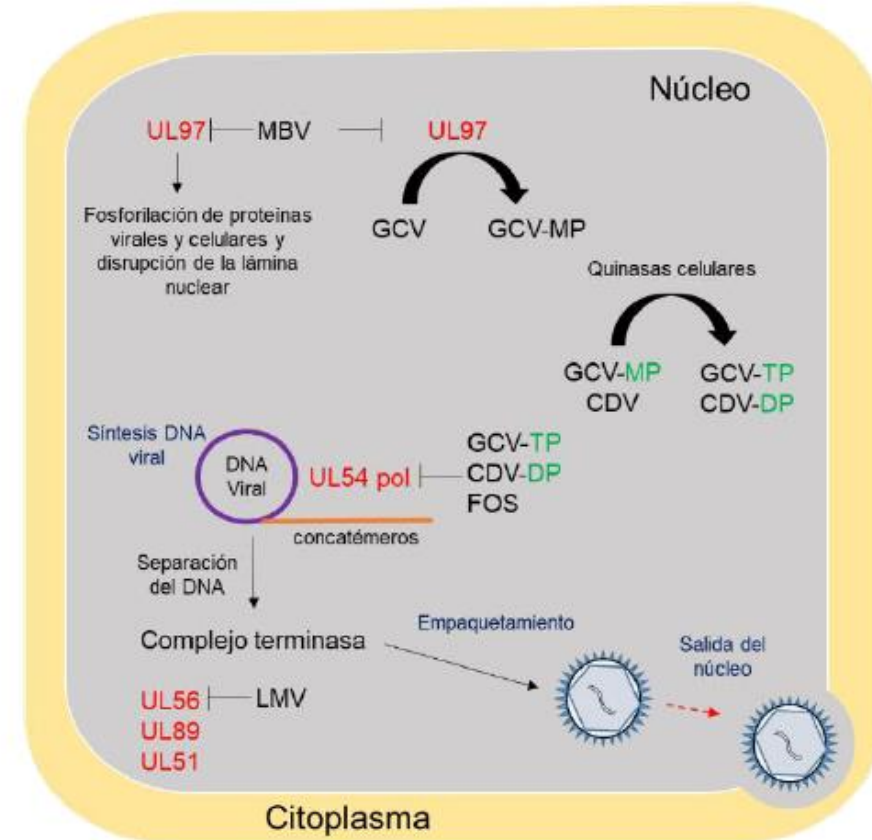
5.1. gB subunit vaccines	1) The first gB vaccine was developed at Chiron (Gonczol <i>et al.</i> , 1990) and administered in Phase II clinical trials to both adults and toddlers (Pass <i>et al.</i> , 1999; Mitchell <i>et al.</i> , 2002). However, the antibody response was short-lived. 2) Subsequently, Novartis and then Pasteur modified the gB subunit vaccine by removing the gB transmembrane domain. This vaccine was tested in several Phase II clinical trials (Pass <i>et al.</i> , 2009; Griffiths <i>et al.</i> , 2011; Bernstein <i>et al.</i> , 2016), showing a fair degree of protection against primary infection in seronegative and a boosting of immune response in seropositive women.
5.2. DNA-based vaccines	Different types of plasmid-based DNA vaccines have been developed, as follows: 1) ASP0113 bivalent vaccine consisting of two plasmids, one containing (VCL-6368) a modified pp65 gene, and the other (VCL-6365) a portion of the genomic region encoding the extracellular domain of AD169 gB (Selinski <i>et al.</i> , 2005). This vaccine has been clinically tested in Phase I (Wlock <i>et al.</i> , 2008) and Phase II trials in HSCT recipients (Kharfan-Dabaja <i>et al.</i> , 2012). In addition, it is being tested in a Phase III trial to investigate the therapeutic effect in HSCT recipients (expected to be completed in 2022). 2) Trivalent DNA vaccine (VCL-CT02) encoding IE1, gB, and pp65 (Jacobson <i>et al.</i> , 2009) (Phase I) showing the priming effect of DNA vaccine in eliciting the immune response. 3) SynCon (Synthetic Consensus sequence) vaccine approach selecting the most conserved aa at each position in the antigen gene sequences, followed by the insertion of the selected sequences into a DNA plasmid (Ramanathan <i>et al.</i> , 2009). 4) Vaccine administration using the Electroporation technique, which allows the formation of transient pores in the cell membranes near the injection site of plasmids, thus facilitating entry of plasmids into the cytoplasm (Flingai <i>et al.</i> , 2013) (mice & other experimental animals).
5.3. mRNA-based vaccines	Multiple options have been developed/proposed: 1) synthetic self-amplifying mRNA expressing a pp65-IE-1 construct and gB was administered to rhesus macaques inducing both NAb and T-cell responses (Novartis). 2) mRNA vaccine formulated with lipid nanoparticles (LNP), encoding gB and PC, was administered to NHP and induced potent NAb response (Moderna Therapeutics). 3) mRNA-based multiantigenic vaccine including pp65, gB and PC inoculated in mice elicited potent humoral and cell-mediated immune responses. However, T-cell responses to pp65 mRNA vaccine were inhibited by presence of other HCMV antigens (John <i>et al.</i> , 2018).
5.4. Virus-like particle (VLPs) vaccines	VLPs are enveloped virus-like particles (eVLPs) simulating wild-type viruses, but lacking viral genome. The following formulations have been proposed: 1) VIB Labs developed an eVLP vaccine expressing the extracellular sequence of gB fused with the transmembrane and the cytoplasmic domains of Vesicular Stomatitis Virus (VSV) G protein (Kirchmeier <i>et al.</i> , 2014) (Phase I, results expected). 2) VIB developed another eVLP vaccine by transfecting HEK-293 cells with a plasmid encoding the gag protein of Moloney murine leukemia virus fused in frame with the HCMV pp65 protein and co-transfecting with a gB plasmid, thus enabling VLP budding from transfected cells. 3) Redvax GmbH (Switzerland), using a baculovirus expression system, developed another eVLP candidate HCMV vaccine (Vicente <i>et al.</i> , 2014).
5.5. Dense body (DBs) vaccine	DBs are enveloped dense bodies accumulating inside HCMV-infected cells and containing glycoproteins and tegument proteins, but not DNA. DB inoculation in mice induced both NAb and T-cell responses (Becke <i>et al.</i> , 2010; Cayatte <i>et al.</i> , 2013).
5.6. Peptide vaccines	Peptide vaccines have been mostly directed to prevention/protection against HCMV disease in HSCT recipients. 1) In this context, HCMV pp65 has been found to be the most effective viral antigen, and its CTL epitope

FAIL

1. Introducción: tratamientos actuales

Tratamiento actual: **Antivirales**

- Ganciclovir
- Valganciclovir
- Foscarnet
- Cidofovir
- Letemovir



Nefrotoxicidad



Elevado coste

Resistencias

Figura 1. Mecanismo de acción de los principales agentes antivirales frente a la infección por CMV

2. Objetivos

- **Búsqueda, identificación y caracterización de nuevos compuestos químicos con actividad antiviral frente a HCMV e identificación de nuevas dianas terapéuticas:**
 - Estudio de componentes de aceites esenciales (EOC): eugenol, timol y vainillina, tanto libres como inmovilizados en partículas de sílice amorfa
 - Reposicionamiento de fármacos utilizando una biblioteca comercial de 1520 compuestos químicos (Biblioteca química de Prestwick).
- Caracterización de cuerpos densos derivados de células epiteliales y fibroblastos como posible enfoque para el desarrollo de una una vacuna contra HCMV

2. Objetivos

- **Búsqueda, identificación y caracterización de nuevos compuestos químicos con actividad antiviral frente a HCMV e identificación de nuevas dianas terapéuticas:**
 - Estudio de componentes de aceites esenciales (EOC): eugenol, timol y vainillina, tanto libres como inmovilizados en partículas de sílice amorfa
 - Reposicionamiento de fármacos utilizando una biblioteca comercial de 1520 compuestos químicos (Biblioteca química de Prestwick).
- Caracterización de cuerpos densos derivados de células epiteliales y fibroblastos como posible enfoque para el desarrollo de una una vacuna contra HCMV

3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

% infección durante 8 horas (pre y post infección)

Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

ARPE-19
MRC-5

3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

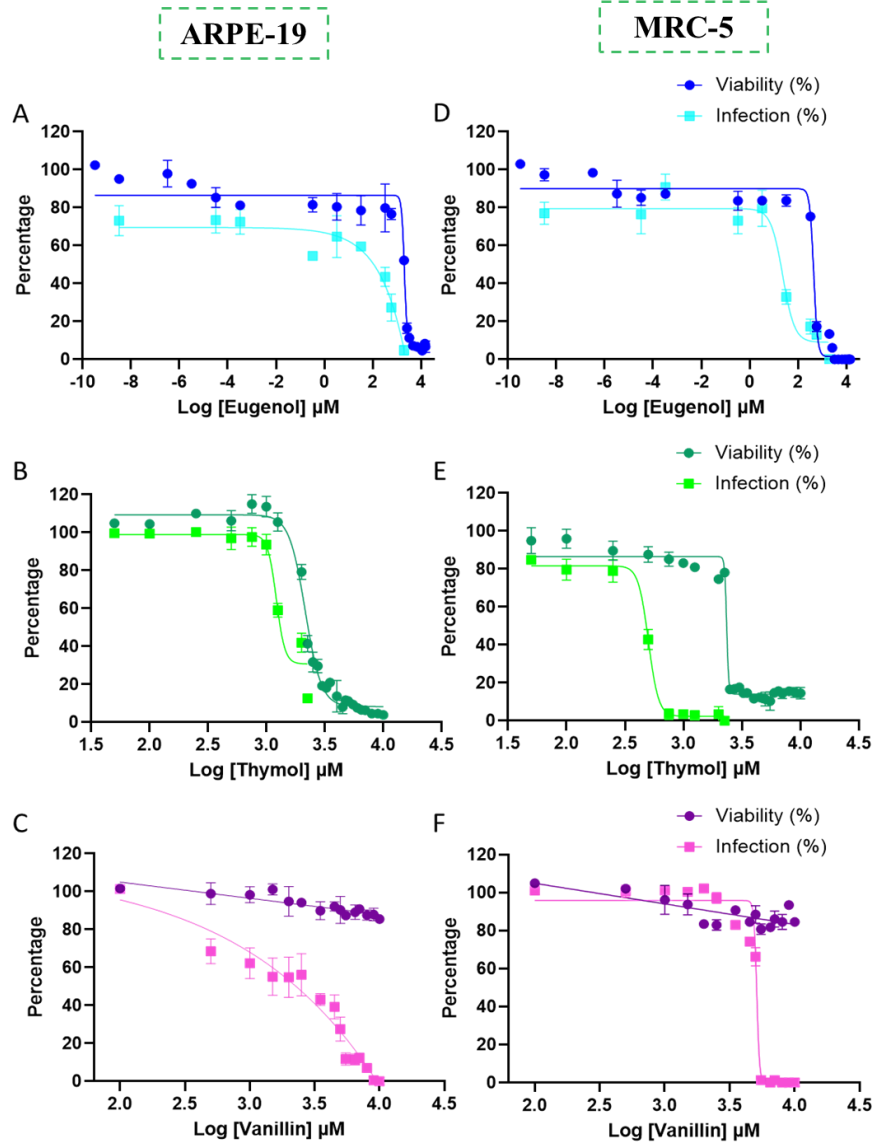
% infección durante 8 horas (pre y post infección)

Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

4. Resultados

Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral



Compuestos libres

La vainillina resultó ser el mejor candidato en ambas líneas celulares debido a su baja citotoxicidad y efecto antiviral ($SI_{\text{ARPE-19}}=15124\text{mM}$; $SI_{\text{MRC-5}}=1739\text{mM}$)

4. Resultados

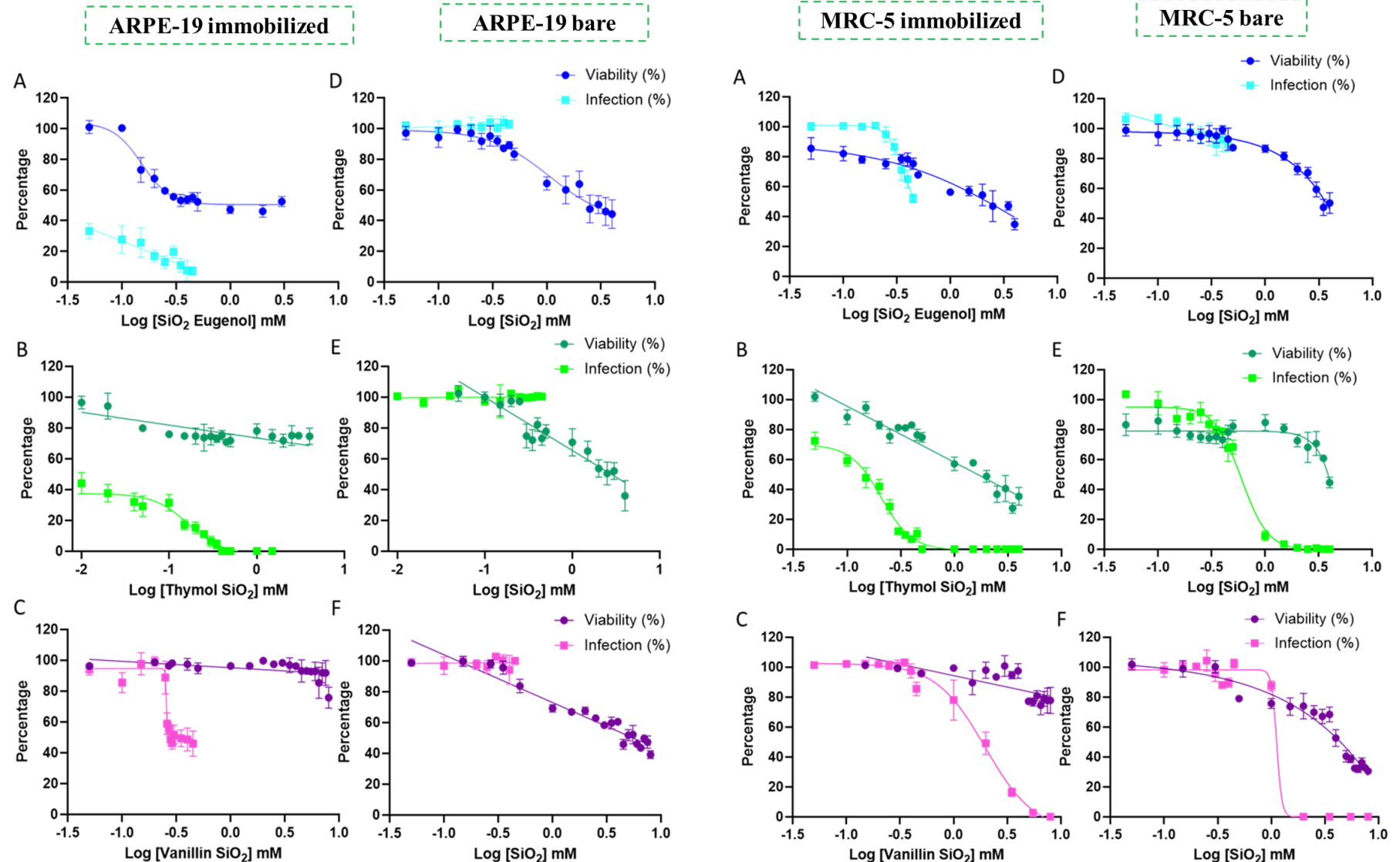
Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

Compuestos funcionalizados

La partícula de sílice vacía no ejerce ningún efecto antiviral

La actividad antimicrobiana de los EOCs libre se ve potenciada cuando estos se inmovilizan en partículas de sílice

La vainillina resultó ser el mejor candidato debido a su baja citotoxicidad y efecto antiviral ($SI_{ARPE-19} = 2.76 \times 10^{11} \text{mM}$; $SI_{MRC-5} = 406 \text{mM}$)



3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

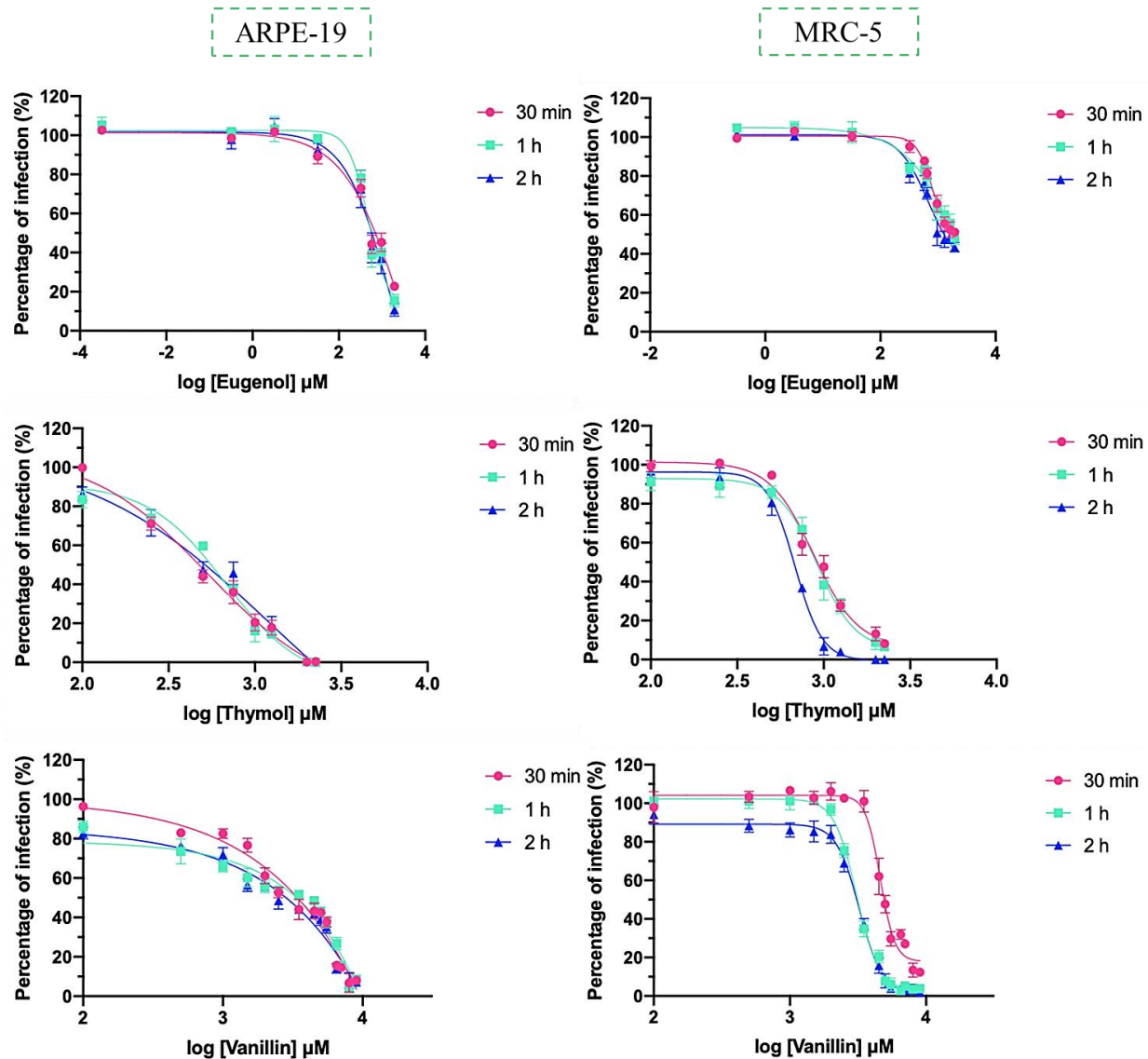
% infección durante 8 horas (pre y post infección)

Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

4. Resultados

Ensayo de neutralización



Compuestos libres

En ambas líneas la vainillina fue el compuesto con mayor actividad virucida

El timol en ARPE-19 parece ejercer un efecto neutralizante importante

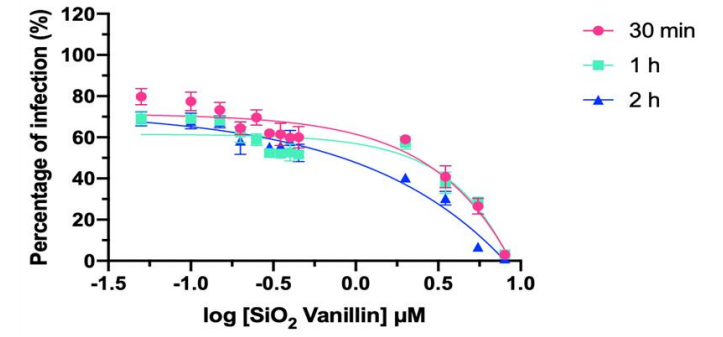
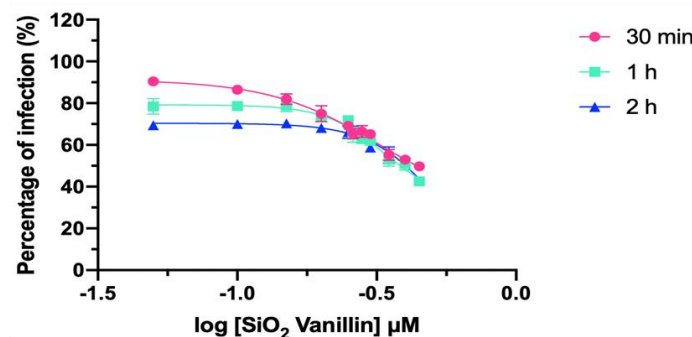
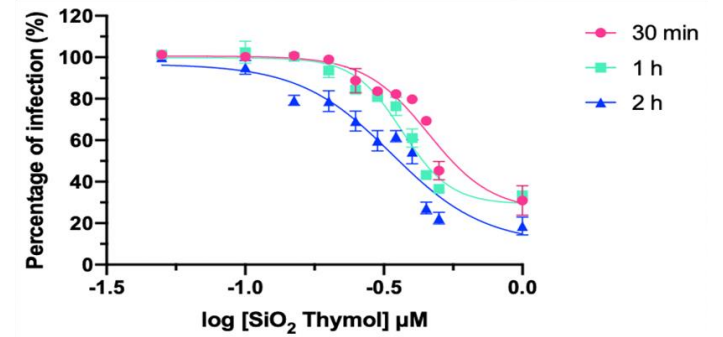
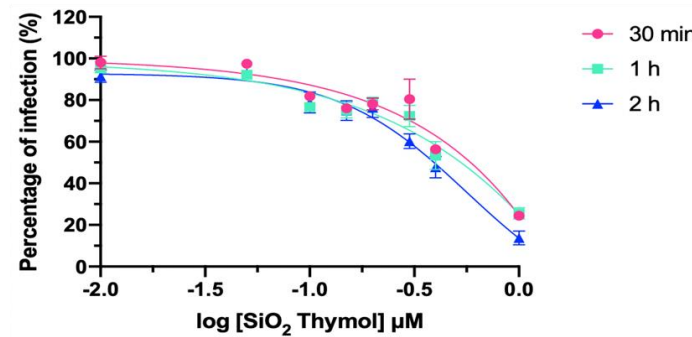
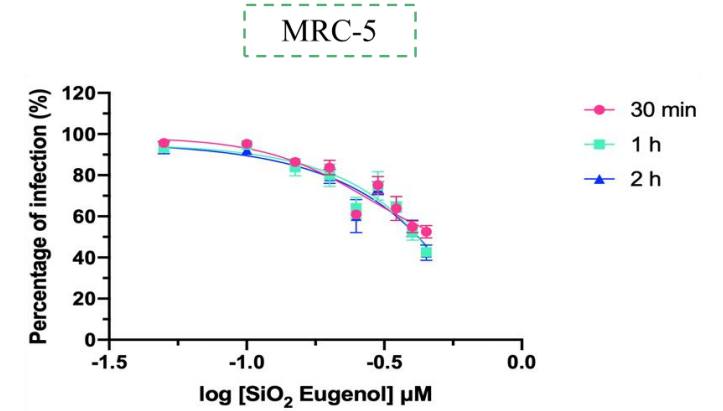
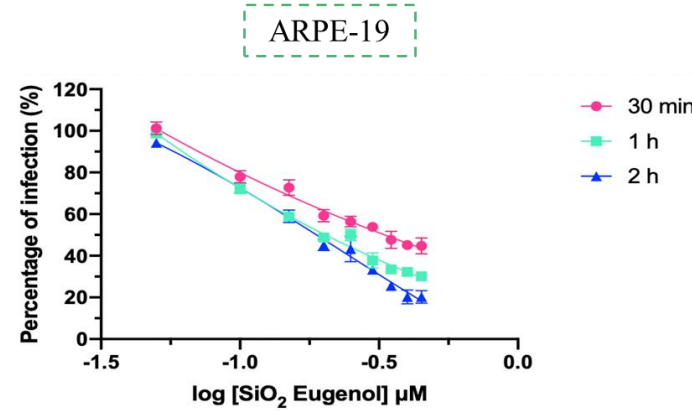
4. Resultados

Ensayo de neutralización

Compuestos funcionalizados

En ambas líneas celulares, la vainillina funcionalizada fue el compuesto con mayor actividad virucida

En ARPE-19 el eugenol parece ejercer un efecto virucida importante



3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

% infección durante 8 horas (pre y post infección)

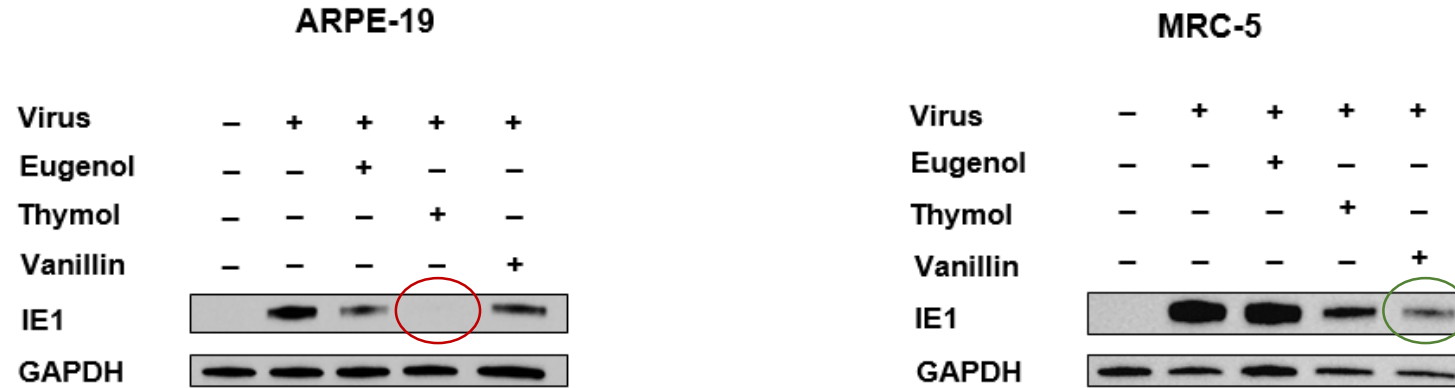
Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

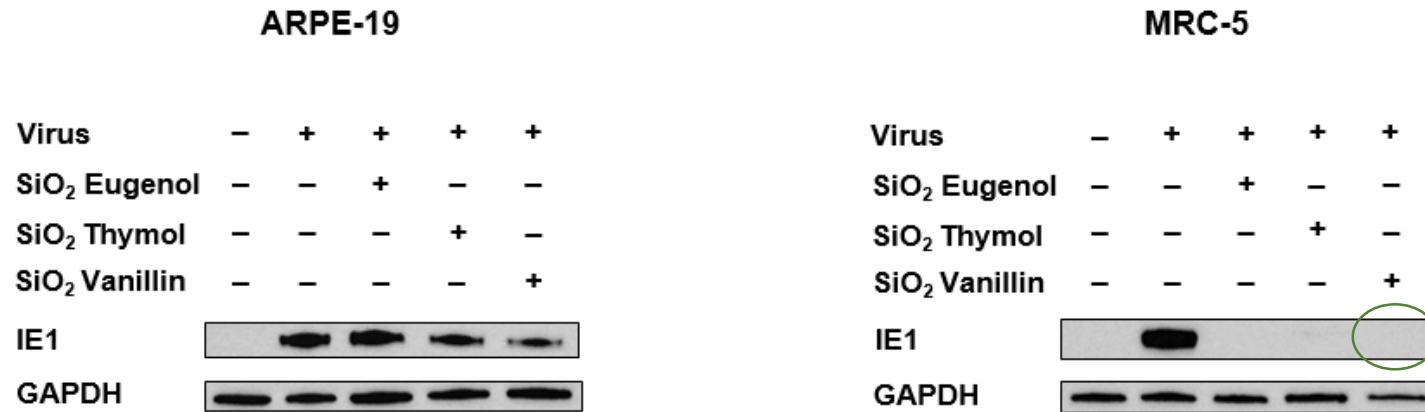
4. Resultados

Análisis de mecanismos moleculares

Free EOCs



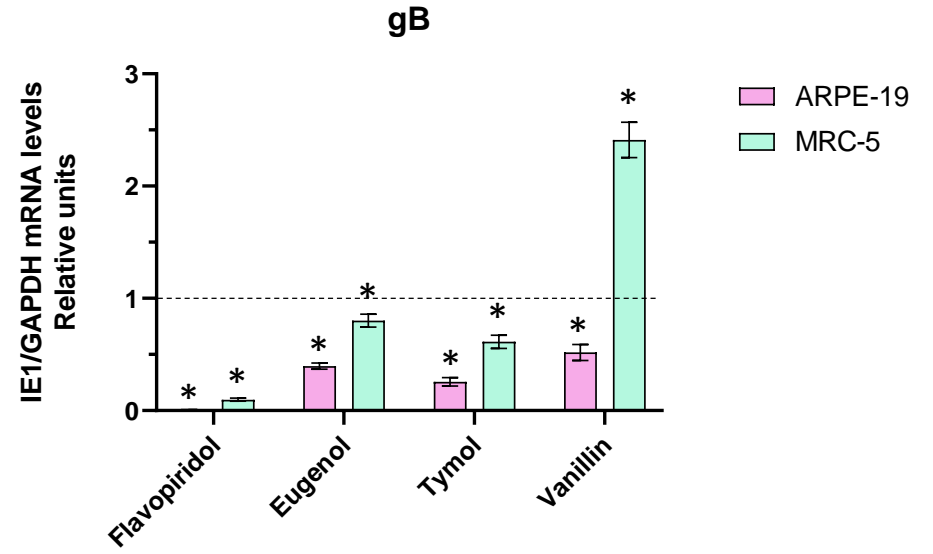
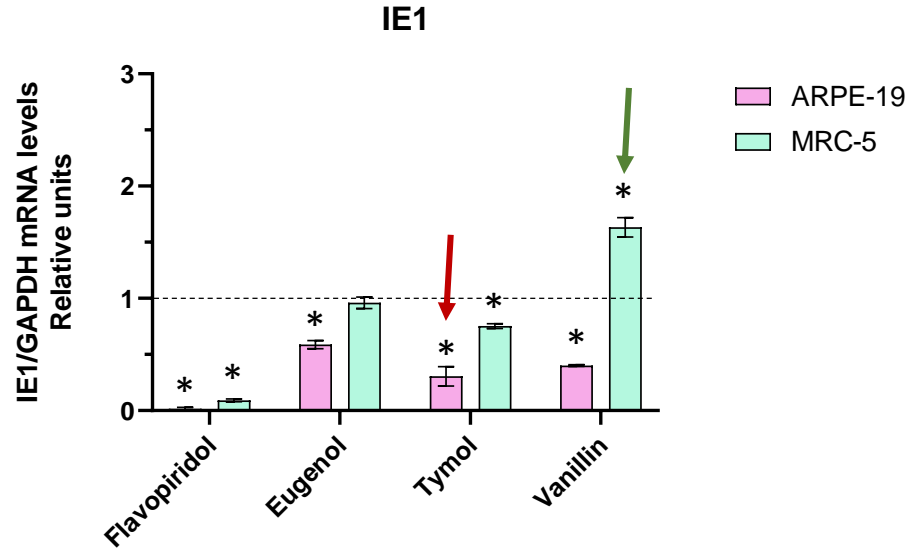
Functionalised EOCs



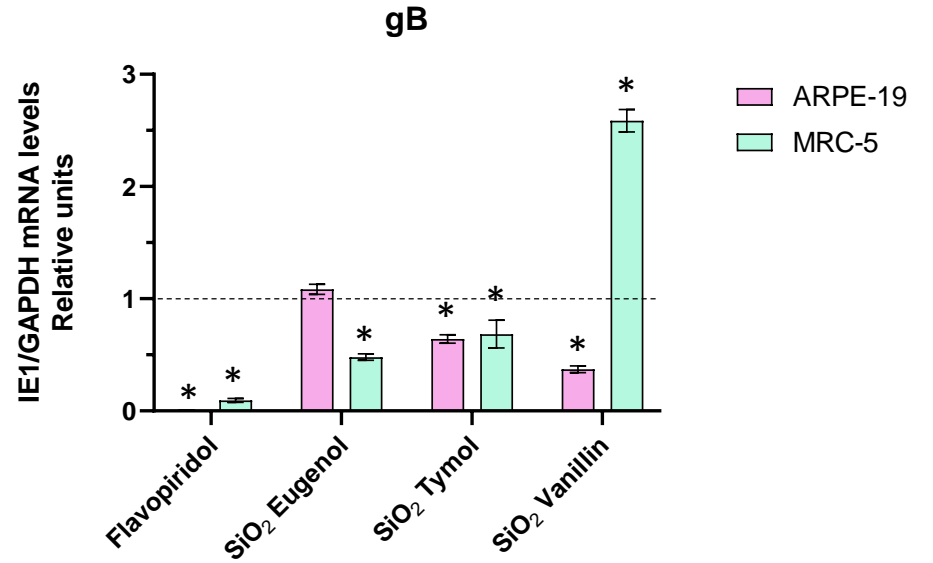
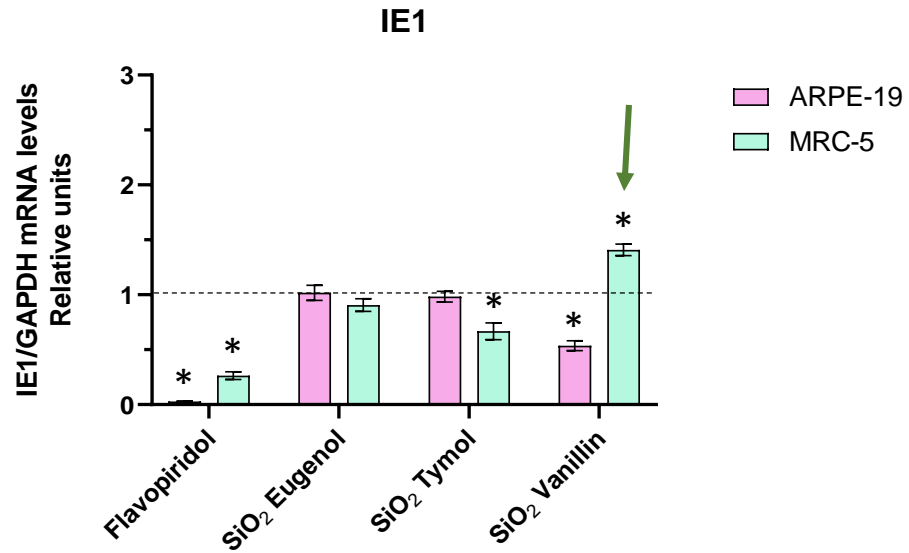
4. Resultados

Análisis de mecanismos moleculares

Free EOCs



Functionalised EOCs



3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

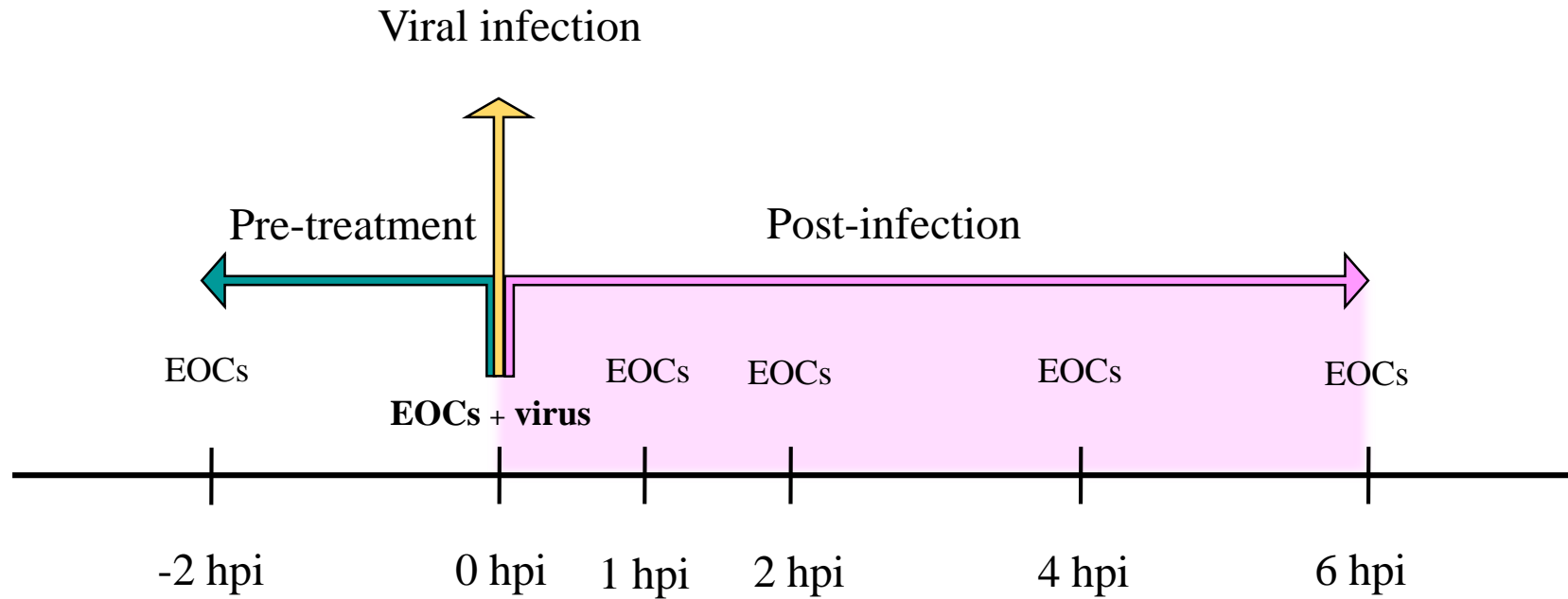
% infección durante 8 horas (pre y post infección)

Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

4. Resultados

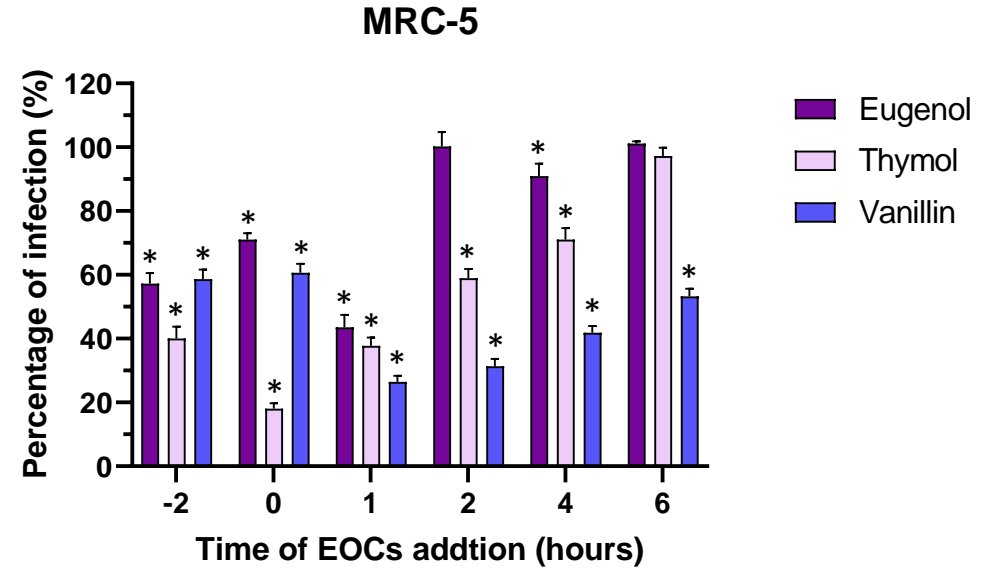
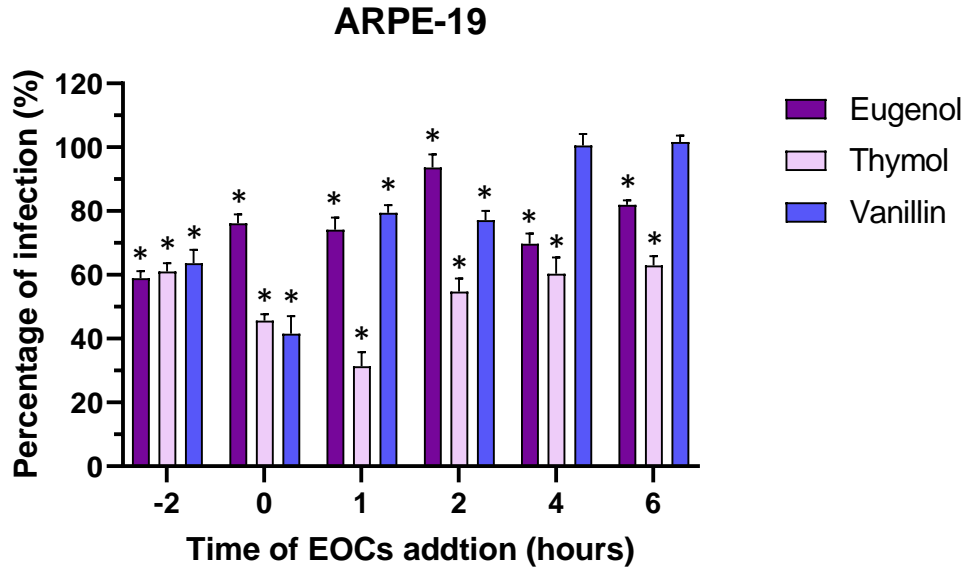
Ensayo *time-of-addition*



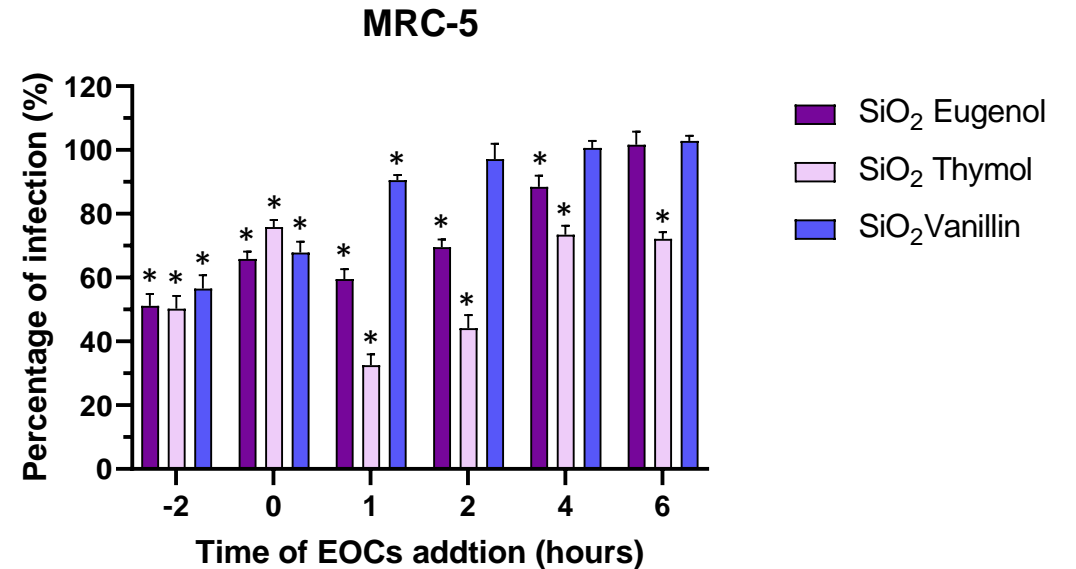
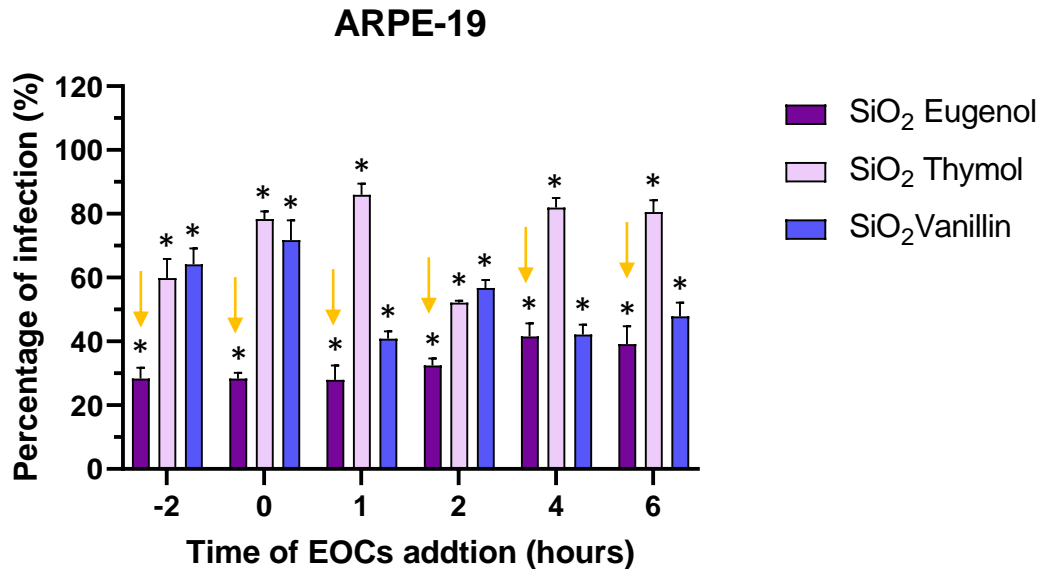
4. Resultados

Ensayo *time-of-addition*

Free EOCs



Functionalised EOCs



3. Metodología



Ensayo de citotoxicidad y de actividad antiviral

- % viabilidad (Alamar blue → células metabólicamente activas) TC_{50}
- % infección (Cytell → células infectadas fluorescentes) IC_{50}
- Selectivity index (SI)

Ensayo de neutralización

- % infección (Efecto virucida) IC_{50}
- SI

Análisis de mecanismos moleculares

Análisis expresión de proteínas tempranas y tardías (qPCR, Western Blot)

Ensayo *time-of-addition*

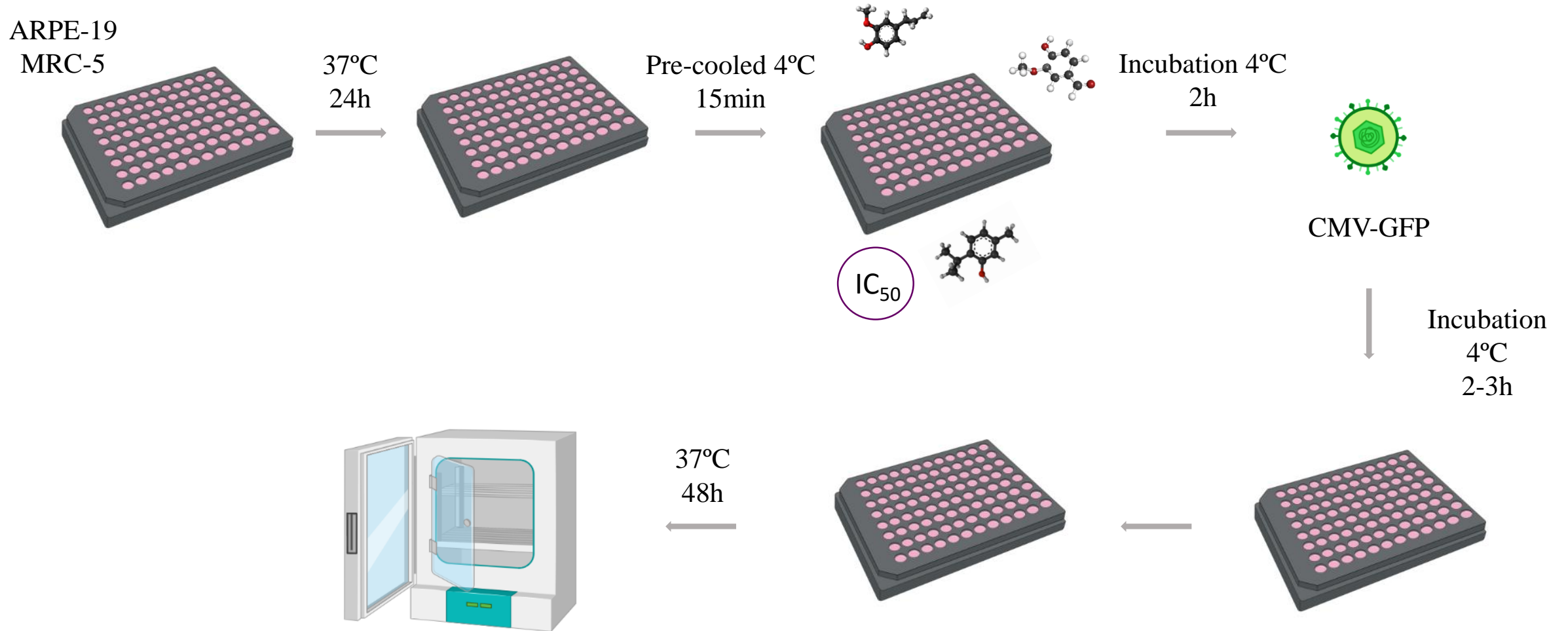
% infección durante 8 horas (pre y post infección)

Ensayo de *attachment & penetration*

% infección

4. Resultados

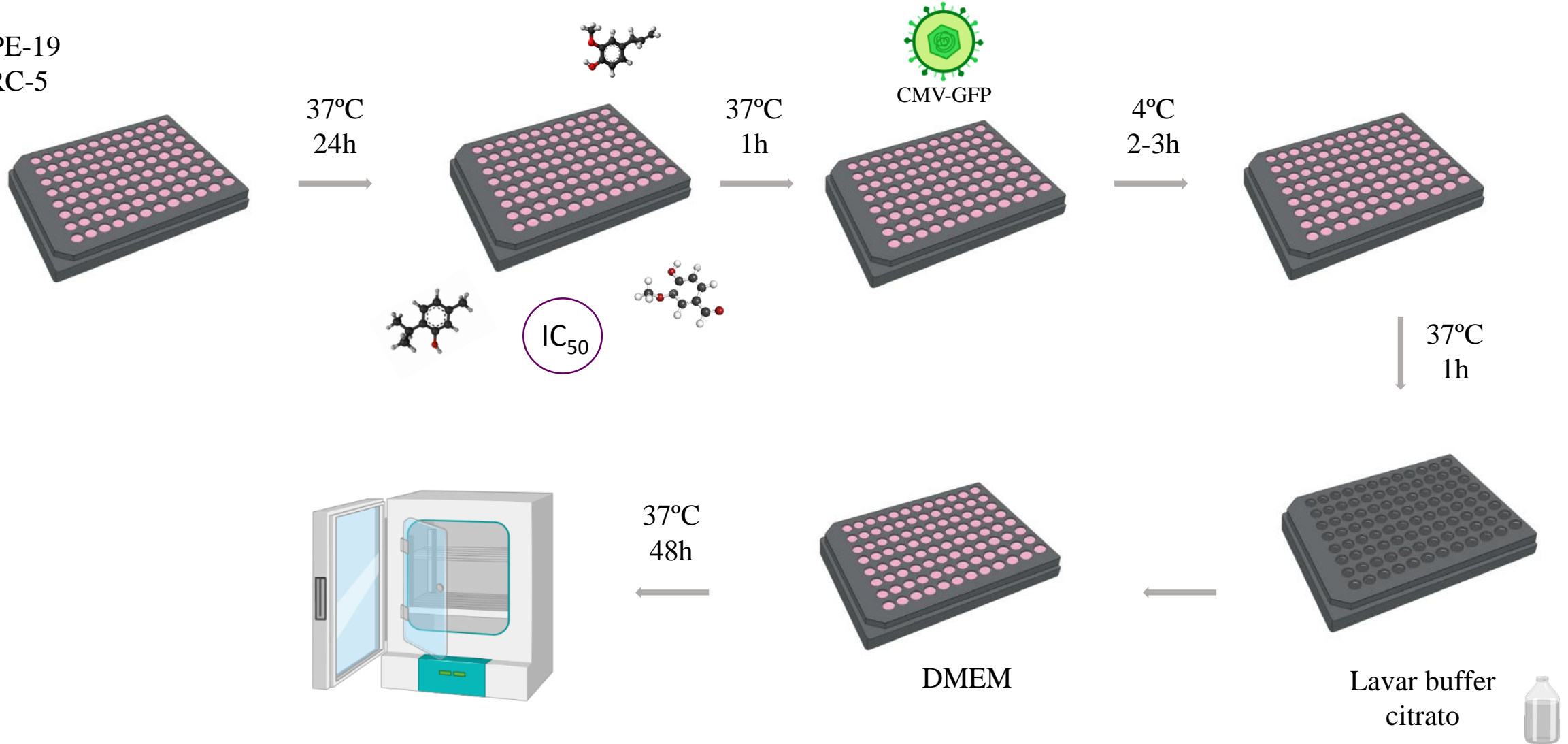
Ensayo *attachment*



4. Resultados

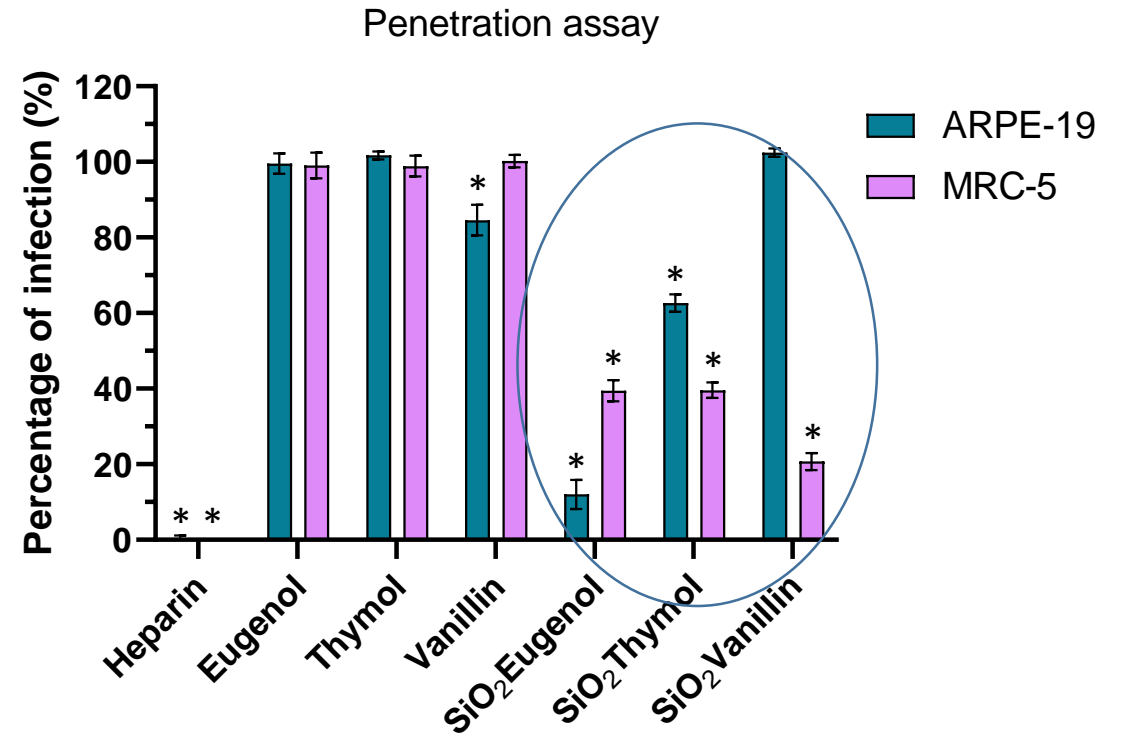
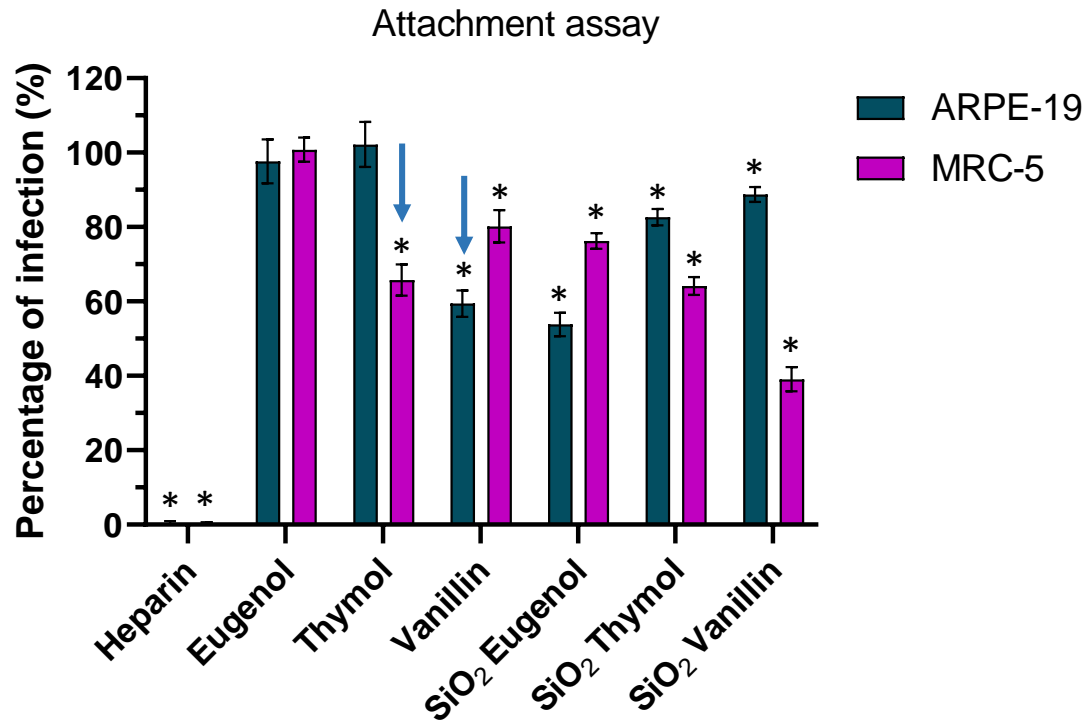
Ensayo *penetration*

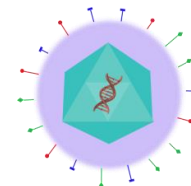
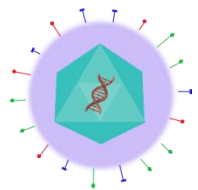
ARPE-19
MRC-5



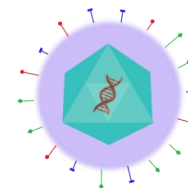
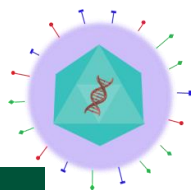
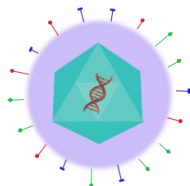
4. Resultados

Ensayo attachment & penetration





**MUCHAS GRACIAS POR VUESTRA
ATENCIÓN**



imiens
INSTITUTO MIXTO INVESTIGACIÓN UNED



MINISTERIO
DE CIENCIA
E INNOVACIÓN

isc
Instituto
de Salud
Carlos III