

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo
desta tese será
disponibilizado somente
a partir de 31/07/2020.

Mariana Nogueira Batista

**Avaliação de Peptídeos Sintéticos na Inibição Direcionada do
Vírus da Hepatite C**

São José do Rio Preto
2018

Mariana Nogueira Batista

**Avaliação de Peptídeos Sintéticos na Inibição Direcionada
do Vírus da Hepatite C**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc: 2016/02174-4; CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

Coorientadores: Prof. Dr. Bruno Moreira
Carneiro

Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli

São José do Rio Preto

2018

Batista, Mariana Nogueira.

Avaliação de peptídeos sintéticos na inibição direcionada do vírus da hepatite C / Mariana Nogueira Batista. -- São José do Rio Preto, 2018
137 f. : il., tabs.

Orientador: Paula Rahal

Coorientador: Bruno Moreira Carneiro

Coorientador: Eduardo Maffud Cilli

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia. 2. Virologia. 3. Agentes antivirais. 4. Hepatite C. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. II. Título.

CDU – 576.858

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Nogueira Batista

**Avaliação de Peptídeos Sintéticos na Inibição Direcionada
do Vírus da Hepatite C**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Virologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc: 2016/02174-4;
CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Marilia de Freitas Calmon Saiki
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof. Dr. Esteban Nicolás Lorenzón
UFG – Jataí

Prof^a. Dr^a. Carolina Colombelli Pacca
FACERES – São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Cíntia Bittar Oliva
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
31 de Julho de 2018

Epígrafe

“If a man begins with certainties, he shall end in doubts. But if he will be content to begin with doubts, he shall end in certaints”.

“Se um homem começar com certezas, ele terminará com dúvidas. Mas se ele se contentar em começar com dúvidas, ele terminará com certezas”.

Sir Francis Bacon

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Vidercílio Batista da Silva e Maria Rosa Nogueira Batista que insistiram, persistiram e provaram que o conhecimento é seu bem mais precioso. E dentre a infinidade de sábios mestres que me guiaram ao longo dessa jornada, obrigada por serem meus primeiros.

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por todos os caminhos que me foram abertos, pelas oportunidades e pela presença constante.

Aos meus pais, agradeço com carinho à bondade e às lições de todos os dias. Por meu caráter e valores.

Aos meus irmãos, agradeço a todos os cafés da tarde, pelo bate papo e pelo buraco.

Ao meu marido Cecílio, pela infinita compreensão, amor e apoio. Pelas noites mal dormidas, pela força nos momentos de fraqueza e por todos os dias não úteis trabalhados.

À minha orientadora por todas as oportunidades, pela confiança e estímulo constantes.

Ao meu co-orientador Bruno por todos esses anos de parceria e por estar sempre presente para alguma solução milagrosa de última hora.

Ao meu co-orientador Eduardo, pela oportunidade de aprender e abrir a mente.

Ao meu amigo e colaborador Paulo Sanches por sua amizade de anos, pelos momentos de descontração e pela dedicação a esse trabalho.

Ao meu amigo Guilherme Campos por segurar as pontas durante meu período de ausência e por ser uma pessoa com quem sempre posso contar.

À minha amiga Ana Braga, pelos anos de parceria e cumplicidade.

Aos amigos antigos de laboratório Bia, Rê, Má, Rô, Bru e André pelos anos dividindo a mesma sala com muita coisa boa pra compartilhar.

A todos os companheiros do LEGO pelas discussões e por fazerem esse laboratório ser tão produtivo e especial.

Aos amigos de longa data e aos novos por completarem minha vida, compreenderem minhas escolhas e me apoiarem. Em especial agradeço minhas queridas de sempre Carol e Té.

Aos alunos que passaram pela minha vida e me fizeram aprender diferentes versões de conhecimento.

A Charles Rice e Eva Billerbeck por todo conhecimento e inspiração transmitidos durante minha breve jornada em Nova York.

Aos docentes do IBILCE e do programa de Pós-graduação em Microbiologia pela formação e dedicação com seus discentes.

À CAPES e à FAPESP (Processo: 2016/02174-4) pelo auxílio financeiro sem o qual esse trabalho não seria possível

À Comissão Examinadora pelo tempo e dedicação em tornar esse trabalho melhor e mais completo.

RESUMO

A hepatite C é a inflamação do fígado decorrente da infecção pelo vírus da hepatite C (HCV), frequentemente evolui para quadros crônicos, sendo considerada mundialmente a maior causa de cirrose e carcinoma hepatocelular. Estima-se que cerca de 71 milhões de pessoas estejam cronicamente infectadas pelo vírus e que dois milhões de novos casos surjam anualmente. A principal via de transmissão do HCV é parenteral e os tratamentos atuais são baseados em antivirais de ação direta (DAAs) de segunda e terceira geração associados ou não ao interferon peguilado e ribavirina. Esses tratamentos apresentam diversos efeitos colaterais, alto custo e mutantes resistentes já foram reportados. Portanto, novos tratamentos efetivos, menos custosos, com maior espectro e com menor nível de efeitos colaterais vêm sendo buscados. Assim, o objetivo do presente trabalho foi desenvolver um pró-fármaco com ação direcionada para células infectadas pelo HCV e eficiente contra mais de uma etapa do ciclo replicativo do vírus. Para tanto, foi realizada uma triagem inicial de seis peptídeos sintéticos avaliados quanto à toxicidade e replicação viral nos replicons subgenômicos do HCV SGR-Feo JFH1 (genótipo 2a) e S52/SG (genótipo 3a) estavelmente expressos na linhagem celular de hepatoma humano Huh-7.5. O peptídeo mais eficiente, GA-Hecate foi avaliado nos replicons completos do HCV, J6/JFH-1 RLUC e JFH-1, para todas as etapas do ciclo infeccioso do vírus, e posteriormente modelado para produção de um pró-fármaco baseado no sítio de clivagem da protease NS3/4A do HCV VVCCDD. O peptídeo GA-Hecate apresentou em sua máxima concentração segura, eficiência de inibição de 85%, 95%, 50% e 99% para replicação, entrada, liberação e infectividade respectivamente. Seu mecanismo de ação foi associado a alterações na fluidez da membrana celular, redistribuição e redução de *droplets* de lipídeo, bem como intercalação em dsRNA. O desenvolvimento do Pró-fármaco preveniu a toxicidade em células não infectadas pelo HCV e induziu a inibição do vírus, mas não foi absolutamente inativo na presença de partículas virais livres e eritrócitos. O estudo proposto prova o conceito do uso de sítio de clivagem da protease NS3 do HCV como direcionador de fármacos. Entretanto mais estudos ainda são necessários para atingir um pró-fármaco completamente inerte em células não infectadas.

Palavras-chave: HCV; Hecate, GA-Hecate, *lipid droplets*, pró-fármaco, antivirais

ABSTRACT

Hepatitis C is the liver inflammation arising from Hepatitis C virus (HCV) infection, frequently it evolves to chronic conditions, and has been considered the major world cause of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. It is estimated that around 71 million people are chronically infected by this virus and 2 million of new cases arise by year. The main pathway of transmission is parenteral and current treatments are based on second and third generation of direct-acting antivirals (DAAs), associated or not to pegylated interferon and ribavirin. These treatments present many side-effects, high cost and resistant mutants have been reported. Therefore, new effective treatments with low costs, major spectrum and less side effects have been sought. Thus, the aim of this study was to develop a prodrug with direct action to HCV-infected cells and efficient for more than one step of virus replication cycle. For this, an initial screening was performed testing six synthetic peptides concerning its toxicity and its effect on HCV subgenomic replicons SGR-Feo JFH1 (genotype 2) and S52/SG (genotype 3) replication, stably expressed in the hepatoma cell line Huh-7.5. The most efficient peptide, GA-Hecate was assessed in the HCV complete replicons J6/JFH-1 RLUC and JFH-1 for all steps of viral infectious cycle and then modeled to produce a prodrug based on HCV protease NS3/4A cleavage site VVCCDD. Peptide GA-Hecate presented at its maximum safe concentration, inhibition of 85%, 95%, 50% and 99% for replication, entry, release and infectivity respectively. Its mechanism of action was associated with alteration in membrane fluidity, redistribution and reduction of lipid droplets quantity, as well as, dsRNA intercalation. The prodrug development prevented the toxicity in non-HCV-infected cells and induced the virus inhibition, but was not absolutely inactive in the presence of free virus particles and erythrocytes. The proposed study proves the concept that the use of NS3 protease cleavage site as a drug carrier. However, more studies are still needed for reaching a prodrug completely inert in non-infected cells.

Keywords: HCV; Hecate, GA-Hecate, *lipid droplets*, prodrug, antivirals

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo I	21
Figura 1. Morfologia e organização do Vírus da Hepatite C	24
Figura 2. Estrutura do genoma viral e do processamento da poliproteína	30
Figura 3. Representação de processamento por <i>frameshift</i> (F)	31
Figura 4. Ciclo Replicativo do HCV.....	34
Figura 5. Representação esquemática dos sistemas de replicação utilizados como modelos de estudo <i>in vitro</i> do HCV genótipo 2a no presente estudo	36
Figura 6. Prevalência mundial de infecção pelo HCV	40
Capítulo II -Artigo I	64
Figura 1. Representação esquemática das modificações na região N-terminal de Hecate	83
Figura 2. Efeitos de Hecate e seu derivados peptídicos sobre a replicação e hepatotoxicidade sobre o replicon subgenômico do HCV genótipo 2a	84
Figura 3. Efeitos de Hecate e seu derivados peptídicos sobre a replicação e hepatotoxicidade sobre o replicon subgenômico do HCV genótipo 3a	85
Figura 4. Efeito de GA-Hecate sobre a replicação de HCVcc	86
Figura 5. Efeito de GA-Hecate effect sobre a entrada, liberação e infectividade do HCV	87
Figure 6. Efeito de GA-Hecate sobre <i>lipid droplets</i>	88
Figure 7. Permeabilização de LUVs	89
Figure 8. Ensaio de intercalação de dsRNA	90
Capítulo II - Artigo I - Material Suplementar	91
Figura S1. Avaliação da Viabilidade e Replicação de GA-Hecate usando SGR-Feo JFH-1 em diferentes períodos de incubação	95

Figura S2. Mecanismos de morte celular desencadeados por GA-Hecate 48h após o tratamento em células Huh-7.5 infectadas com J6/JFH-1	96
Figura S3. Mecanismos de morte celular desencadeados por GA-Hecate 72h após o tratamento em células Huh-7.5 infectadas com J6/JFH-1	98
Figura S4. Mecanismo de ação proposto	100
Figura S5. Efeito de GA-Hecate sobre o genótipo 1b	101
Figura S6. Dicroísmo Circular de Hecate	102
Figura S7. Dicroísmo Circular de GA-Hecate	102
Capítulo II – Artigo II	103
Figura 1. Estruturas químicas de H_3N^+ -GA-Hecate, Pró-N-GA-Hecate e posição do sítio de clivagem de Pró-N-GA-Hecate	118
Figura 2. Avaliação da clivagem de Pró-N-K-GA-Hecate pela protease NS3	119
Figura 3. Toxicidade celular de H_2N -GA-Hecate e Pró-N-GA-Hecate sobre células Huh-7.5 infectadas e não infectadas por HCV	120
Figura 4. Inibição da replicação do genótipo 2a do HCV por H_2N -GA-Hecate e Pró-N-GA-Hecate.....	122
Figura 5. Inibição da entrada do genótipo 2a do HCV pelo Pró-N-GA-Hecate	122
Figura 6. Inibição da liberação do genótipo 2a do HCV pelo Pró-N-GA-Hecate	123
Figura 7. Efeito Hemolítico de Pró-N-GA-Hecate e Estabilidade em Soro	123

LISTA DE TABELAS

Capítulo I	21
Tabela 1. Resumo das propriedades e funções das proteínas do HCV	32
Capítulo II – Artigo I	62
Tabela 1. Características gerais e propriedades biológicas apresentadas por Hecate e dos peptídeos catiônicos derivados de sua região N-terminal.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BCA: Ácido bicinônico, do Inglês *Bicinchoninic acid*

BM 4-5 Feo: Replicon subgenômico do HCV genótipo 1b

C: Proteína do capsídeo do vírus da hepatite C, do Inglês *Core protein*

cDNA: DNA complementar, do inglês *complementary DNA*

CD81: Cluster de Diferenciação 81, do Inglês *Cluster of Differentiation 81*

CLDN1 - Claudina 1, do Inglês *Claudin 1*

CON1: Consenso de genoma 1, do Inglês *Consensus genome 1*. Referente ao replicon do genótipo 1b do HCV.

CsA: Ciclosporina A, do Inglês *Cyclosporine A*

DAAs: Agentes Antivirais de Ação direta, do Inglês *Direct-acting antiviral agents*

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DEPC: Dietilpirocarbonato

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DMEM: Meio Eagle Modificado por Dulbeco, do Inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

E1: Proteína do envelope 1 do vírus da hepatite C, do Inglês *Envelope protein 1*

E2: Proteína do envelope 2 do vírus da hepatite C, do Inglês *Envelope protein 2*

EGCG: Epigallocatequina-3-galato, do Inglês *Epigallocatechin-3-Gallate*

FBS: Soro Fetal Bovino, do Inglês *Fetal Bovine Serum*

FDA: *Food and Drug Administration*

FEO : Fusão de *Firefly* e Neomicina, do Inglês *Firefly and Neomicin*

FFU: Unidade Formadora de Foco, do Inglês *Focus Forming Units*

FL-J6/JFH-5'C19Rluc2AUbi: Quimera replicon do completo do HCV (J6/JFH1)

G418: Antibiótico genética

GAGs: Glicosaminoglicanos

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, do Inglês *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

HCC: Carcinoma hepatocelular, do inglês *Hepatocellular Carcinoma*

HCV : Virus da Hepatite C, do Inglês *Hepatitis C virus*

HCVcc: Virus da Hepatite C derivado de cultura de células, do Inglês *cell-culture-derived HCV*

HEPES: Tampão de Ácido 4-(2-Hidroxietil)-1-PiperazinaEtanolSulfônico, do Inglês *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

Huh: Hepatoma humano, do Inglês *Human hepatoma* (Referente à linhagem celular)

HVR1: Região hipervariável 1 , do Inglês *Hypervariable region 1*

HVR2: Região hipervariável 2 , do Inglês *Hypervariable region 2*

IC50: Concentração inibitória de 50 %, do Inglês *half-maximal inhibitory concentration* (sinônimo de EC50)

ICTV: Comitê Internacional em Taxonomia de Virus, do Inglês *International Committee on Taxonomy Viruses*

IFN: Interferon

IFN- α : Interferon alfa

IRES: Sítio interno de entrada ribossomal, do Inglês *Internal ribosome entry site*

ISG: Genes estimulados por Interferon, do Inglês *Interferon stimulated gene*

JFH-1: Hepatite Japonesa Fulminante 1, do Inglês *Japanese Fulminant Hepatitis 1*, referente ao Replicon completo do vírus da Hepatite C genótipo 2a

LDL: Lipoproteína de baixa densidade, do Inglês *Low-Density Lipoprotein*

LDL-R: Receptor de Lipoproteína de baixa densidade, do Inglês *Low-Density Lipoprotein Receptor*

LUV: Vesículas Unilamelares Grandes, do inglês *Large Unilamellar Vesicles*

LVP: Partícula Lipoviral, do inglês *Lipoviral particle*

M.O.I: Multiplicidade de Infecção, do Inglês *Multiplicity of Infection*

MTT: Dimetil tiazolio 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NANB: hepatite não-a-não-b

NS : Proteínas Não estruturais, do Inglês non-structural

NTP: Nucleotídeo Trifosfato, do Inglês *Nucleotide triphosphato*

NTPase: Nucleotídeo trifosfatase, do Inglês *Nucleotide triphosphatase*

NTRs: Regiões não traduzíveis, do Inglês *non-translated regions* (sinônimo de UTRs)

OCLN: Ocludina, do Inglês *Occludin*

ORF: Quadro aberto de leitura, do Inglês *Open Reading Frame*

P7: Proteína 7

PBS: Tampão fosfato salino, do Inglês *Phosphate buffered saline*

PEG: Polietilenoglicol

PEG-IFN: Interferon Peguilado

RBV: Ribavirina

RLuc: *Renilla* Luciferase

RNA: Ácido Ribonucleico, do Inglês *Ribonucleic Acid*

SGR-JFH-FEO ou SGR-Feo JFH-1: Replicon subgenômico do JFH-1 do Inglês *JFH1 Subgenomic Replicon*

SGR-Neo-Con1: Replicon Subgenômico do Con1

SR-BI - Receptor Scavenger Classe B tipo I, do Inglês *Scavenger Receptor Class B Type I*

S52/SG-Feo: Replicon Subgenômico do HCV genótipo 3a

WHO: Organização Mundial de Saúde, do Inglês *World Health Organization*

SUMÁRIO

Capítulo I - Considerações Gerais	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	22
2.1 Patologia da Hepatite C.....	22
2.1.1 Infecção Aguda.....	22
2.1.2 Infecção Crônica.....	23
2.2 Vírus da hepatite C.....	24
2.2.1 Morfologia e Classificação	24
2.2.2 Proteínas virais e regiões não traduzíveis do genoma.....	25
2.2.3 Ciclo replicativo.....	32
2.2.4 Modelos para o estudo do HCV	34
2.2.5 Heterogeneidade genética e distribuição	38
2.3 Vias de transmissão.....	41
2.4 Tratamentos disponíveis	42
2.5 Peptídeos sintéticos	44
3 OBJETIVOS	47
3.1 Objetivos Gerais.....	47
3.2 Objetivos Específicos.....	47
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
<i>Capítulo II - Artigo I: GA-Hecate antiviral properties on HCV whole cycle represent a new antiviral class and open the door for the development of broad spectrum antivirals.....</i>	<i>63</i>
Introduction	65
Results	66
Viability and antiviral effect of Hecate and its derivatives on HCV subgenomic replicons.....	66

GA-Hecate effect on HCVcc	67
GA-Hecate mechanism of action in hepatocytes and mimetic membranes.....	68
GA-Hecate intercalation property in dsRNA	68
Discussion	69
Material and methods	74
Peptide synthesis	74
Antibodies and reagents	74
Cells and virus	74
The cytotoxicity profile of Hecate and its derivatives in hepatocytes	74
HCV replication assessment under treatment with Hecate or its derivative	75
Western blotting	75
Release/Assembly evaluation	76
Infectivity assay for GA-Hecate.....	76
GA-Hecate effect on entry step	77
Intracellular distribution and quantity of neutral lipids.....	77
GA-Hecate interference in lipid droplet size.....	77
Hecate's and GA-Hecate's permeabilization effect on the mimetics of lipid droplets and viral envelope	78
Effect of peptides on dsRNA intercalation assay	78
Statistical analysis	79
Data availability.....	79
References	80
Supplementary material	91
<i>Capítulo II - Artigo II: Prodrug development based on HCV NS3 protease activity restricts toxic antiviral effects to infected cells.....</i>	<i>103</i>
Introduction	104
Methods	105

Cells and Replicons	105
N-terminus modification of GA-Hecate and peptide orthogonal synthesis	106
Assessment of prodrug cleavage in the presence of NS3 HCV protease	106
Cytotoxicity of H3N-GA-Hecate and Pre-H3N-GA-Hecate in hepatocytes.....	107
Antiviral effect of H3N-K-GA-Hecate and Pre-H3N-K-GA-Hecate in HCV replication (genotype 2a)	107
Antiviral effect of Pre-H3N-K-GA-Hecate in JFH1 entry	107
Antiviral effect of Pre-H3N-GA-Hecate in JFH1 and J6/JFH1 in viral budding.....	108
Hemolysis assay	108
PD stability in human serum	108
Results	109
Prodrug cleavage checking	109
Prodrug is less toxic than the free drug in Huh-7.5 harboring SGR-Feo JFH1 replicon.....	109
H3N-Prodrug is safe in Huh-7.5 not infected with HCV	109
Antiviral effect of free drug and prodrug on HCV replication.....	109
Prodrug structure still interacts with viral particles.....	110
Prodrug prevent HCV release/assembly	110
Prodrug Hemolysis Effects	110
Prodrug Stability in serum	110
Discussion and Conclusion	111
References	114
<i>Capítulo III - Conclusão.....</i>	<i>124</i>
6 CONCLUSÃO.....	125
<i>Capítulo IV – Artigos Publicados</i>	<i>126</i>

Capítulo I – Considerações Gerais

1 INTRODUÇÃO

A hepatite C é a inflamação do fígado decorrente da infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV). A existência deste patógeno foi completamente reconhecida em 1975 quando *Feinstone et al.* demonstraram que a maior parte dos casos de hepatite pós-transfusionais não eram associadas a infecções pelos vírus da Hepatite A (HAV) ou B (HBV) e assim definiu a doença denominada Hepatite não-A, não-B (NANB) (*Feinstone et al.*, 1975). Na sequência, estudos de transmissão em chimpanzés demonstraram que esta infecção era provavelmente causada por um pequeno agente envelopado e finalmente em 1989, Choo e colaboradores clonaram e sequenciaram o genoma do novo agente e em 1990 denominaram essa nova partícula infecciosa de vírus da Hepatite C (HCV) (*Choo et al.*, 1989). Desde então vários trabalhos subsequentes elucidaram a organização e a diversidade do vírus (*Choo et al.*, 1991; *Bartenschlager et al.*, 2013).

A infecção pelo HCV foi associada tanto a infecções agudas quanto crônicas, podendo variar de uma doença sutil e autolimitada durando semanas a uma infecção crônica progressiva com duração de décadas. A infecção aguda pelo HCV é frequentemente assintomática e muito raramente associada a casos graves. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), entre 15 e 45% dos pacientes infectados podem espontaneamente se curar da infecção após seis meses, sem auxílio de nenhum tratamento (WHO, 2016). A resposta imunológica a essa infecção ainda é controversa devido a ausência de um modelo animal adequado para o estudo da patologia associada ao vírus, mas é senso comum que o sistema imune falhe em gerar uma resposta adaptativa adequada e que a principal resposta adaptativa contra a infecção seja associada às células T CD4⁺ e CD8⁺ e que a exaustão destas últimas é a principal causa do estabelecimento da infecção crônica (Rehermann, 2013). Assim, a evolução para a cronicidade acontece entre 55 e 85% dos casos (Lavanchy, 2011; WHO, 2016) sendo estimados atualmente cerca de 71 milhões de pacientes cronicamente infectados pelo HCV, dos quais 70 % desenvolvem algum tipo de patologia no fígado que inclui 15 a 30 % de cirrose hepática em cerca de 20 anos (WHO, 2016). A morte por hepatite C é lenta e de 1 a 5 % dos pacientes chegarão a óbito como consequência de cirrose ou hepatocarcinoma (CDC, 2017). O tratamento da infecção crônica pelo vírus gera um gasto de bilhões de dólares anualmente. Além disso, a cada ano, mais de 399 mil óbitos são relacionados à cirrose, doenças hepáticas em estágio terminal e do carcinoma hepatocelular

References

1. Tsikarishvili TN, Kibardin SA. [Molecular Principles in Virology]. *Voprosy virusologii*. 1963 May-Jun;22:375. PubMed PMID: 14075864. Olekuliarnye osnovy virusologii.
 2. Kane M, Golovkina T. Common threads in persistent viral infections. *Journal of virology*. 2010 May;84(9):4116-23. PubMed PMID: 19955304. Pubmed Central PMCID: 2863747.
 3. Vcev A. [Management of side effects during antiviral therapy]. *Acta medica Croatica : casopis Hrvatske akademije medicinskih znanosti*. 2009 Dec;63(5):463-7. PubMed PMID: 20198909. Terapija nuspojava antivirusne terapije.
 4. Lee BY, Bailey RR, Wiringa AE, Assi TM, Beigi RH. Antiviral medications for pregnant women for pandemic and seasonal influenza: an economic computer model. *Obstetrics and gynecology*. 2009 Nov;114(5):971-80. PubMed PMID: 20168096. Pubmed Central PMCID: 3388110.
 5. Shirasaka T. [Adverse effects of antiretroviral agents, and their treatment]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2010 Mar;68(3):480-5. PubMed PMID: 20229794.
 6. Stockmann C, Byington CL, Pavia AT, Ampofo K, Wilkes J, Korgenski EK, et al. Limited and Variable Use of Antivirals for Children Hospitalized With Influenza. *JAMA pediatrics*. 2017 Mar 1;171(3):299-301. PubMed PMID: 28114638.
 7. Yang CHT, Yoo ER, Ahmed A. The Role of Direct-acting Antivirals in the Treatment of Children with Chronic Hepatitis C. *Journal of clinical and translational hepatology*. 2017 Mar 28;5(1):59-66. PubMed PMID: 28507928. Pubmed Central PMCID: 5411358.
 8. Subbaiah MAM, Meanwell NA, Kadow JF. Design strategies in the prodrugs of HIV-1 protease inhibitors to improve the pharmaceutical properties. *European journal of medicinal chemistry*. 2017 Oct 20;139:865-83. PubMed PMID: 28865281.
 9. Vadlapudi AD, Vadlapatla RK, Earla R, Sirimulla S, Bailey JB, Pal D, et al. Novel biotinylated lipid prodrugs of acyclovir for the treatment of herpetic keratitis (HK): transporter recognition, tissue stability and antiviral activity. *Pharmaceutical research*. 2013 Aug;30(8):2063-76. PubMed PMID: 23657675. Pubmed Central PMCID: 3746831.
 10. Zuwala K, Riber CF, Lovschall KB, Andersen AHF, Sorensen L, Gajda P, et al. Macromolecular prodrugs of ribavirin: Polymer backbone defines blood safety, drug release, and efficacy of anti-inflammatory effects. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2018 Apr 10;275:53-66. PubMed PMID: 29432822.
 11. Dousson CB. Current and future use of nucleo(s)tide prodrugs in the treatment of hepatitis C virus infection. *Antiviral chemistry & chemotherapy*. 2018 Jan-Dec;26:2040206618756430. PubMed PMID: 29463095. Pubmed Central PMCID: 5890546.
 12. Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug discovery today*. 2015 Jan;20(1):122-8. PubMed PMID: 25450771.
 13. Funke SA, Willbold D. Peptides for therapy and diagnosis of Alzheimer's disease. *Current pharmaceutical design*. 2012;18(6):755-67. PubMed PMID: 22236121. Pubmed Central PMCID: 3426787.
-

14. Castel G, Chteoui M, Heyd B, Tordo N. Phage display of combinatorial peptide libraries: application to antiviral research. *Molecules*. 2011 Apr 26;16(5):3499-518. PubMed PMID: 21522083.
 15. Liu X, Huang Y, Cheng M, Pan L, Si Y, Li G, et al. Screening and rational design of hepatitis C virus entry inhibitory peptides derived from GB virus A NS5A. *Journal of virology*. 2013 Feb;87(3):1649-57. PubMed PMID: 23175359. Pubmed Central PMCID: 3554153.
 16. Thakur N, Qureshi A, Kumar M. AVPpred: collection and prediction of highly effective antiviral peptides. *Nucleic acids research*. 2012 Jul;40(Web Server issue):W199-204. PubMed PMID: 22638580. Pubmed Central PMCID: 3394244.
 17. Ding X, Zhang X, Chong H, Zhu Y, Wei H, Wu X, et al. Enfuvirtide (T20)-Based Lipopeptide Is a Potent HIV-1 Cell Fusion Inhibitor: Implications for Viral Entry and Inhibition. *Journal of virology*. 2017 Sep 15;91(18). PubMed PMID: 28659478. Pubmed Central PMCID: 5571253.
 18. Gallinari P, Brennan D, Nardi C, Brunetti M, Tomei L, Steinkuhler C, et al. Multiple enzymatic activities associated with recombinant NS3 protein of hepatitis C virus. *Journal of virology*. 1998 Aug;72(8):6758-69. PubMed PMID: 9658124. Pubmed Central PMCID: 109884.
 19. Hong Z, Ferrari E, Wright-Minogue J, Chase R, Risano C, Seelig G, et al. Enzymatic characterization of hepatitis C virus NS3/4A complexes expressed in mammalian cells by using the herpes simplex virus amplicon system. *Journal of virology*. 1996 Jul;70(7):4261-8. PubMed PMID: 8676447. Pubmed Central PMCID: 190357.
 20. Shiryaev SA, Thomsen ER, Cieplak P, Chudin E, Cheltsov AV, Chee MS, et al. New details of HCV NS3/4A proteinase functionality revealed by a high-throughput cleavage assay. *PloS one*. 2012;7(4):e35759. PubMed PMID: 22558217. Pubmed Central PMCID: 3338790.
 21. Wyles DL, Kaihara KA, Korba BE, Schooley RT, Beadle JR, Hostetler KY. The octadecyloxyethyl ester of (S)-9-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication in genotype 1A, 1B, and 2A replicons. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009 Jun;53(6):2660-2. PubMed PMID: 19289518. Pubmed Central PMCID: 2687240.
 22. Tscherne DM, Jones CT, Evans MJ, Lindenbach BD, McKeating JA, Rice CM. Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *Journal of virology*. 2006 Feb;80(4):1734-41. PubMed PMID: 16439530. Pubmed Central PMCID: 1367161.
 23. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wolk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*. 2005 Jul 22;309(5734):623-6. PubMed PMID: 15947137.
 24. Sanches PR, Carneiro BM, Batista MN, Braga AC, Lorenzon EN, Rahal P, et al. A conjugate of the lytic peptide Hecate and gallic acid: structure, activity against cervical cancer, and toxicity. *Amino acids*. 2015 Jul;47(7):1433-43. PubMed PMID: 25868656.
 25. Batista MN, Carneiro BM, Braga AC, Rahal P. Caffeine inhibits hepatitis C virus replication in vitro. *Archives of virology*. 2015 Feb;160(2):399-407. PubMed PMID: 25491197.
-

26. Nahmias Y, Goldwasser J, Casali M, van Poll D, Wakita T, Chung RT, et al. Apolipoprotein B-dependent hepatitis C virus secretion is inhibited by the grapefruit flavonoid naringenin. *Hepatology*. 2008 May;47(5):1437-45. PubMed PMID: 18393287. Pubmed Central PMCID: 4500072.
 27. De Clercq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clinical microbiology reviews*. 2016 Jul;29(3):695-747. PubMed PMID: 27281742. Pubmed Central PMCID: 4978613.
 28. Littler E, Oberg B. Achievements and challenges in antiviral drug discovery. *Antiviral chemistry & chemotherapy*. 2005;16(3):155-68. PubMed PMID: 16004079.
 29. Bartenschlager R, Lohmann V, Penin F. The molecular and structural basis of advanced antiviral therapy for hepatitis C virus infection. *Nature reviews Microbiology*. 2013 Jul;11(7):482-96. PubMed PMID: 23748342.
 30. Salam KA, Akimitsu N. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: current and future perspectives. *BioMed research international*. 2013;2013:467869. PubMed PMID: 24282816. Pubmed Central PMCID: 3825274.
 31. Zhai PB, Qing J, Li B, Zhang LQ, Ma L, Chen L. GP205, a new hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitor, displays higher metabolic stability in vitro and drug exposure in vivo. *Acta pharmacologica Sinica*. 2018 Jun 21. PubMed PMID: 29930277.
 32. Hansel W, Enright F, Leuschner C. Destruction of breast cancers and their metastases by lytic peptide conjugates in vitro and in vivo. *Molecular and cellular endocrinology*. 2007 Jan 2;260-262:183-9. PubMed PMID: 17101210.
 33. Bottger R, Hoffmann R, Knappe D. Differential stability of therapeutic peptides with different proteolytic cleavage sites in blood, plasma and serum. *PloS one*. 2017;12(6):e0178943. PubMed PMID: 28575099. Pubmed Central PMCID: 5456363.
 34. Jenssen H, Aspö SI. Serum stability of peptides. *Methods in molecular biology*. 2008;494:177-86. PubMed PMID: 18726574.
 35. Knappe D, Cassone M, Nollmann FI, Otvos L, Hoffmann R. Hydroxyproline substitutions stabilize non-glycosylated drosocin against serum proteases without challenging its antibacterial activity. *Protein and peptide letters*. 2014 Apr;21(4):321-9. PubMed PMID: 24164265.
 36. Werle M, Bernkop-Schnurch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs. *Amino acids*. 2006 Jun;30(4):351-67. PubMed PMID: 16622600.
 37. Ngambenjawong C, Gustafson HH, Pineda JM, Kacherovsky NA, Cieslewicz M, Pun SH. Serum Stability and Affinity Optimization of an M2 Macrophage-Targeting Peptide (M2pep). *Theranostics*. 2016;6(9):1403-14. PubMed PMID: 27375788. Pubmed Central PMCID: 4924508.
 38. Rader AFB, Reichart F, Weinmüller M, Kessler H. Improving oral bioavailability of cyclic peptides by N-methylation. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2018 Jun 1;26(10):2766-73. PubMed PMID: 28886995.
 39. Wall DA, Hubbard AL. Galactose-specific recognition system of mammalian liver: receptor distribution on the hepatocyte cell surface. *The Journal of cell biology*. 1981 Sep;90(3):687-96. PubMed PMID: 6270158. Pubmed Central PMCID: 2111902.
-

40. Wall DA, Wilson G, Hubbard AL. The galactose-specific recognition system of mammalian liver: the route of ligand internalization in rat hepatocytes. *Cell*. 1980 Aug;21(1):79-93. PubMed PMID: 7407914.

6 CONCLUSÃO

O peptídeo Hecate e seus cinco derivados com modificação na região N-terminal apresentaram alta capacidade de inibição da replicação do HCV, sendo GA-Hecate o derivado com menor toxicidade frente à sua capacidade de inibição do vírus e inibindo todas as principais etapas do ciclo infeccioso do HCV.

GA-Hecate inibiu a entrada e liberação do HCV através da alteração da fluidez da membrana e do espalhando as gotículas lipídicas (*lipid droplets*), além de inibir a replicação através dessa propriedade e da intercalação em RNA de dupla fita.

A tentativa de desenvolver um pró-fármaco baseado na estrutura do GA-Hecate mostrou-se pouco produtiva sendo que a estrutura inicial apresentou baixo rendimento e a produção subsequente, baseada na adição de um aminoácido lisina com síntese ortogonal do peptídeo aumentou a toxicidade do produto liberado. Embora a clivagem pela NS3 do HCV do pró-fármaco gere fragmento de tamanho semelhante ao fármaco livre e não apresente toxicidade em células Huh-7.5 até um limite de especificidade, este apresentou atividade fora da célula, mantendo interação com partículas livres e sendo ainda altamente hemolítico em todas as concentrações testadas.

Assim, o presente trabalho conclui que a possibilidade do uso de um sítio de clivagem para direcionar antivirais é uma possibilidade viável, mas que métodos de estabilização e inativação da molécula precursora devem ser melhorados em abordagens futuras.
