

Dezvoltarea de sisteme particulare bazate pe proteine recombinante de interes vaccinal pentru infecțiile respiratorii virale

Cod PN 23 44 01 01

Descriere activitate și rezultate Faza I

În această etapă s-a avut în vedere identificarea tulpinilor virale circulante cele mai frecvent implicate în patologii respiratorii, dar și a celor emergente. Concomitent, s-a realizat un studiu de literatură cu scopul identificării celor mai potrivite ținte pentru dezvoltarea unor antigene de interes vaccinal. De asemenea, s-a studiat posibilitatea folosirii ansamblurilor macromoleculare nanostructurate pentru declanșarea răspunsului imun, cu accent pe variantele de inducere a formării ansamblurilor nanostructurate formate din proteine. Acest lucru se realizează prin introducerea de „tag”-uri sau mutații la nivelul secvenței nucleotidice a proteinelor de interes care, fie vor declanșa autoasamblare, fie vor permite atașarea pe suporturi particulare.

S-a realizat design-ul in silico al secvențelor ADN. S-au optimizat codonii, s-au folosit secvențe linker, s-au inserat situsuri pentru enzime de restricție și s-au realizat proteine de fuziune și cuplarea cu secvențe care să promoveze nanostructurare.

Au fost folosite tehnici clasice de inginerie genetică, cum ar fi PCR și, după caz, variațiuni de tipul Heterostagger-PCR, Overlap-Extension PCR pentru generarea genelor sintetice, izolarea genelor din probe biologice și generarea variantelor trunchiate.

S-au ales vectori plasmidiali ținând cont de sistemul de expresie, procariot sau eucariot și s-a ținut cont de modalitatea de expresie de proteină, tipul de promotori folosiți, genele de rezistență etc. Ulterior, genele de interes au fost inserate în vectorii plasmidiali aleși.

Activitatea acestei faze s-a concentrat pe trei patogeni virali responsabili de infecții respiratorii: virusul gripal, virusul SARS-Cov2 și virusul respirator sincițial (RSV).

Virusul respirator sincițial reprezintă una dintre principalele cauze de spitalizare la nivel mondial pentru copiii mai mici de 5 ani și pentru adulții mai mari de 65 de ani, totalizând aproximativ 22% din totalul infecțiilor acute ale tractului respirator inferior. Dintre aceste spitalizări, aproximativ 160000 se soldează cu decesul pacientului. Atât la nivelul Uniunii Europene cât și la nivelul Statelor Unite ale Americii, a fost observat un trend crescător al spitalizărilor (în ultimii 3-5 ani) la ambele categorii de vârstă.

Deși virusul a fost identificat pentru prima dată în 1957 (la om), primul vaccin viabil a fost aprobat abia în mai 2023, fiind folosită varianta de prefuziune a glicoproteinei de suprafață F exprimată în model eucariot. În cadrul acestui studiu, s-a ales expresia de proteină recombinantă F, în diferite variante, în sistem procariot.

RSV este categorizat în 2 subtipuri (A și B), fiecare subtip fiind divizat în mai multe genotipuri. S-au ales variantele dominante ale fiecărui subtip, respective RSV – A – ON1 și RSV – B – BA.

S-a recurs la sinteza de novo a genelor codificatoare pentru proteina F a ambelor subtipuri prin tehnica de Overlap Extension PCR (OE-PCR). Secvența de nucleotide a proteinei F corespunzătoare subtipului A aparține izolatului RSVs/Tehran.IRN/A/1.16/11 [ON1], iar pentru subtipul B secvența de ADN a proteinei F corespunde izolatului RSV/B/Argentina/BA-HNRG-001/2014. Designul in silico al celor două secvențe s-a realizat cu software-ul DNABWorks. Parametrii relevanți au fost setați astfel: temperatura de aliniere a primerilor în intervalul 64 – 72°C, dimensiunea primerilor în intervalul 64 – 79pb. După compilare s-a ales soluția cu scorul cel mai mic. Pentru RSV-A s-au generat 56 de primeri, iar pentru RSV-B s-au generat 64 de primeri.

Pentru fiecare subtip, toți primerii au fost puși la comun la o concentrație de 10nM, cu excepția primerilor din capete (forward și reverse), care au fost adăugați în reacție la concentrația de 500nM. Amestecul de reacție a fost amplificat prin reacție PCR cu aliniere în gradient de temperatură. Această reacție a fost folosită drept „template” pentru o altă reacție PCR în care s-au folosit doar primerii din

capete și temperatura de aliniere s-a setat la 72°C. Rezultatul a fost verificat prin electroforeză în gel de agaroză (Fig. 1).

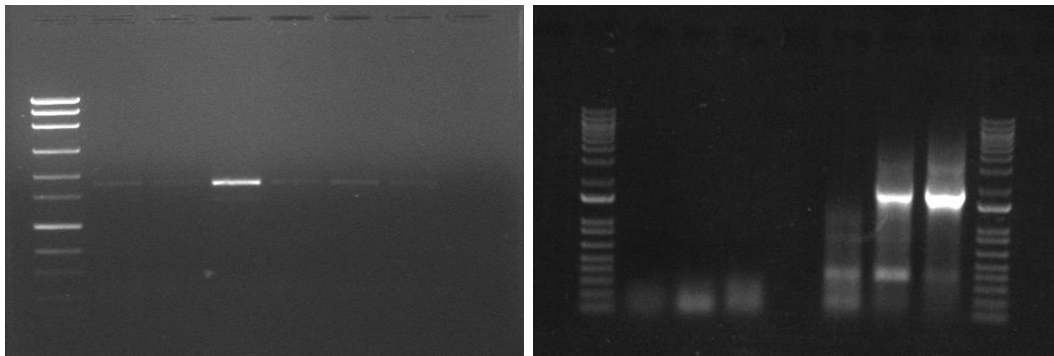


Fig. 1. Gel stânga RSV-A-ON1 / Gel dreapta RSV-B-BA

Ulterior, ampliconii au fost extrași și purificați din gel de agaroză. Ambele segmente ADN au dimensiunea de 1745pb. La design-ul in silico ambele segmente au căpătat un situs de restricție pentru *SacI* în capătul 5' și un situs de restricție pentru *HindIII* în capătul 3'.

Cele două gene sintetice au fost introduse în vectorii plasmidiali pET-24a(+) și pColdII. Vectorul pET-24a(+) permite transcripția inductibilă reglată de operonul lac sub promoter T7, atașarea unui HisTAG în C-terminal și permite selecția coloniilor pozitive conferind rezistență la kanamicină. Vectorul pColdII permite declanșarea transcripției la incubarea culturii bacteriene la temperatura de 15°C datorită promoterului, 5' UTR și 3' UTR a genei *cspA* derivate din *E.coli*; în plus, atașează genei un HisTAG și un element care îmbunătățește translația, ambele în N-terminal și conferă rezistență la ampicilină în vederea selecției.

Insertia genelor în cei doi vectori plasmidiali s-a realizat prin restricție enzimatică cu *SacI* și *HindIII* a genelor și plasmidelor, purificare din gel a materialul tăiat și, apoi, ligare. Mixul de ligare a fost folosit pentru transformare în bacterii DH5 α , care au fost însămânțate pe plăci LB agar cu antibiotic de selecție corespunzător. A doua zi, coloniile crescute pe plăci au fost verificate pentru prezența ansamblului plasmid+genă prin amplificare PCR cu primeri de secvențiere. Coloniile pozitive au fost crescute în mediu lichid, iar plasmidul a fost purificat prin miniprep. Plasmidele purificate au fost verificate suplimentar prin restricție enzimatică cu enzime de restricție care au situs de restricție în genă (Fig. 2).

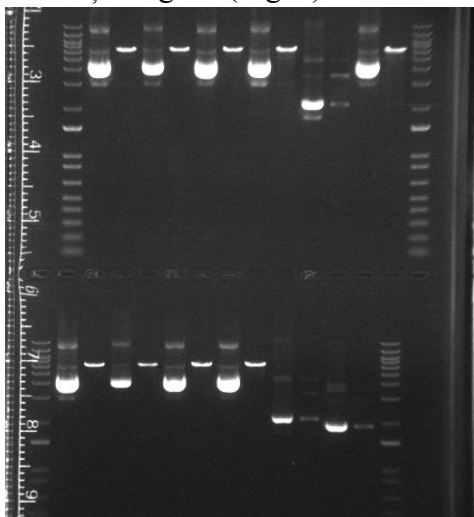


Fig. 2. Rezultatul tratamentului cu *SpeI* care prezintă situs de restricție doar în insert (gena F a RSV-B-BA în acest exemplu). Astfel, conform tăierii putem observa ca doar colonia 5 (din cele pozitive) nu prezintă insertul de interes. De asemenea, coloniile negative (pozițiile 9jos-12jos) prezintă un pattem asemănător cu colonia negativă din setul pozitiv.

Ulterior, pentru a favoriza solubilizarea mai facilă a viitoareii proteine, am recurs la îndepărtarea regiunilor transmembranare și semnal din fiecare genă în parte. Pentru a realiza acest lucru, am folosit tehnica Heterostagger PCR care presupune utilizarea a două seturi de primeri care

generează capete coezive cu lungime de 12pb/18pb pentru fiecare construct în parte. Moleculele obținute în urma amplificării sunt amestecate apoi pentru procesul de realiniere care constă în denaturarea celor două catene de ADN la 98°C pentru 30s, urmată de răcirea treptată a amestecului cu o rată de 1°C/minut până la 20°C.

Rezultatul realinierii a fost folosit pentru transformarea bacteriilor DH5 α și creșterea lor pe medii solide de selecție cu antibiotic. Coloniile pozitive au fost testate pentru prezenta genei, au fost purificate prin MiniPrep și apoi au fost verificate pentru succesul procesului de îndepărtare a regiunilor țintă. De menționat faptul că regiunile au fost îndepărtate secvențial, mai întâi a fost îndepărtată regiunea semnal, iar ulterior a fost îndepărtată regiunea transmembranară din constructele care au pierdut regiunea semnal (Fig. 3).

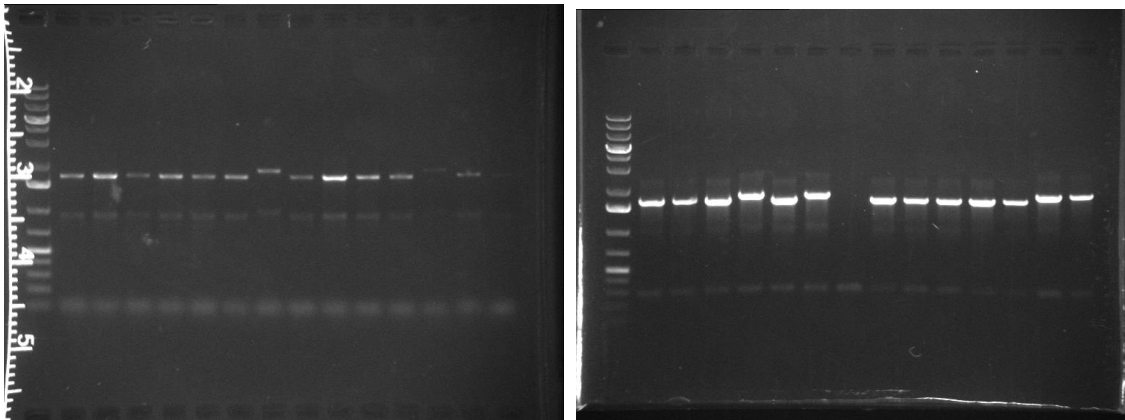


Fig. 3. Test colonii RSV-A-ON1_ECTO – Gel Stanga pET24a(+)/ Gel Dreapta pCold II

Activități similare au fost desfășurate pentru virusul SARS-CoV2. În acest caz s-a optat pentru sinteza genei care codifică pentru proteina S (Spike) a virusului, cunoscându-se faptul că anticorpilor care leagă această proteină pot avea efect neutralizant. Varianta EG.5 (Fig. 4) provine din XBB.1.9.2, care are același profil de aminoacizi ca XBB.1.5 și a fost desemnată varianta în monitorizare în iulie 2023 și, apoi, varianta de interes (împreună cu toate subvariantele) o lună mai târziu. În săptămâna 44 din 2023 a înregistrat o prevalență globală de 51.6%. Față de varianta mamă (XBB.1.9.2) are mutația F456L în proteina S. Subvarianta EG.5.1 are în plus mutația Q52H și, o perioadă, a fost cea mai răspândită subvariantă EG.5. În plus, anticorpilor neutralizanți pentru XBB.1.5 au un efect mult diminuat asupra variantelor EG.5. În cadrul proiectului activitățile s-au concentrat pe secvența S1 a SARS-CoV-2/human/USA/NY-CDC-LC1050754/2023 (EG.5.1).

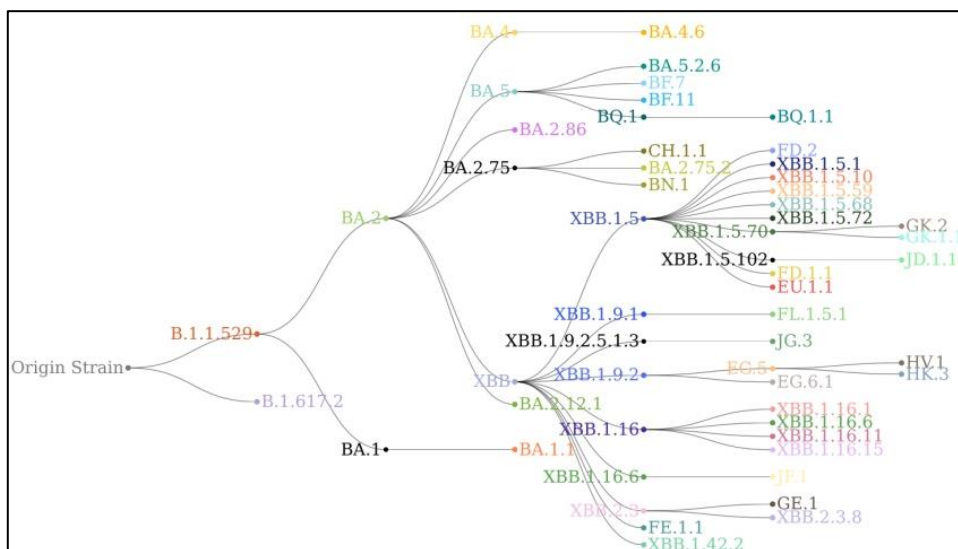


Fig. 4. Dendrogramă SARS-CoV2 (<https://covid.cdc.gov/covid-data-tracker/#variant-summary>)

Cu ajutorul DNAWorks s-au generat 66 de primeri care au permis sinteza prin OE-PCR a secvenței codificatoare pentru S1, flancată de situsuri de restricție SacI și XhoI. Datorită lungimii mari a secvenței (2030pb), s-au sintetizat, inițial, două segmente (jumătăți) care au fost apoi unite (Fig. 5).

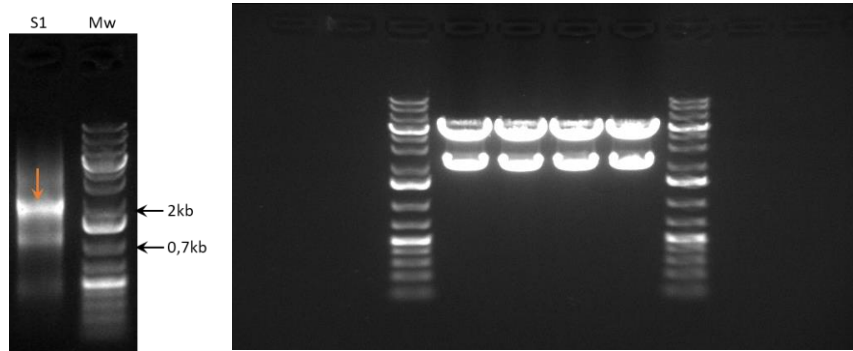


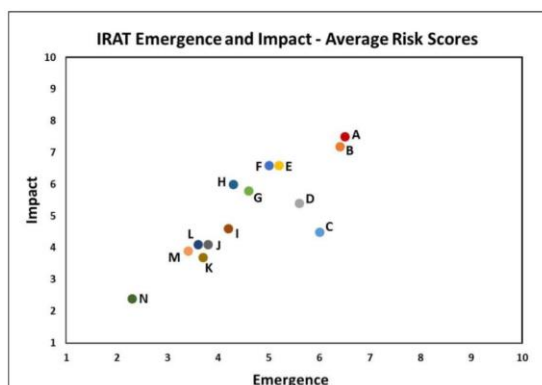
Fig. 5. Rezultat sinteză S1 (stânga); restricție cu SacI și XhoI a plasmidelor purificate din colonii DH5α transformate

După restricție cu SacI și XhoI a segmentului sintetizat și a plasmidelor, materialul a fost purificat și reunit pentru ligare. Mixul de ligare a fost folosit pentru transformare de bacterii DH5α. Din coloniile pozitive s-a purificat plasmid.

Infecțiile cu virus gripal reprezintă o problemă de sănătate publică în plină desfășurare, generând un număr mare de spitalizări și decese, cele mai susceptibile grupuri fiind copiii, bătrânii și indivizii imunocompromiși. În ciuda existenței tratamentelor specifice împotriva gripei, eficacitatea lor este limitată, prevenția prin vaccinare fiind unealta cea mai potrivită pentru limitarea infecției și reducerea morbidității și mortalității asociate.

În cadrul proiectului s-a urmărit clonarea proteinelor de suprafață a virusului gripal A și B, anume hemaglutinina (HA), neuraminidaza (NA) și proteina M2. Au fost alese tulpinile A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), pentru HA, NA și M2, A/California/07/2009 (H1N1), A/Texas/50/2012 (H3N2), B/Austria/1359417/2021, B/Phuket/3073/2013, pentru HA din vaccinul sezonier 2014-2015, A/Victoria/2570/2019 (H1N1), A/Darwin/9/2021 (H3N2) și B/Austria/1359417/2021, pentru HA din vaccinul sezonier 2023-2024. Segmentele codificatoare pentru aceste proteine au fost obținute prin extracție ARN din suspensie virală în lichid alantoic, revers transcriere și inserare în vectori plasmidiali prin HeterostaggerPCR (descriș mai sus).

De asemenea, au fost clonate și segmentele codificatoare pentru HA corespunzătoare unor tulpini zoonotice, A/swine/Shandong/1207/2016 (H1N1), A/Hong Kong/125/2017 (H7N9). Acestea au fost alese având la bază rezultatele IRAT (Fig. 6). Aceste segmente au fost sintetizate de novo prin OE-PCR și inserate în pET-24a(+) și pColdII.



	Virus	Emergence Score	Impact Score
● A	H7N9 [A/Hong Kong/125/2017]	6.5	7.5
● B	H7N9 [A/Shanghai/02/2013]	6.4	7.2
● C	H3N2 variant [A/Indiana/08/2011]	6.0	4.5
● D	H9N2 G1 lineage [A/Bangladesh/0994/2011]	5.6	5.4
● E	H5N1 Clade 1 [A/Vietnam/1203/2004]	5.2	6.6
● F	H5N6 [A/Yunnan/14584/2015] – like	5.0	6.6
● G	H7N7 [A/Netherlands/2019/2003]	4.6	5.8
● H	H10N8 [A/Jiangxi-Donghu/346/2013]	4.3	6.0
● I	H5N8 [A/gyrfalcon/Washington/41088/2014]	4.2	4.6
● J	H5N2 [A/Northern pintail/Washington/40964/2014]	3.8	4.1
● K	H3N2 [A/canine/Illinois/12191/2015]	3.7	3.7
● L	H5N1 [A/American green-winged teal/Washington/1957050/2014]	3.6	4.1
● M	H7N8 [A/Turkey/Indiana/1573-2/2016]	3.4	3.9
● N	H1N1 [A/duck/New York/1996]	2.3	2.4

Fig. 6. IRAT Emergence and Impact – Average Risk Scores

Descriere activitate și rezultate Faza Ib

S-a recurs la sinteza de novo a genelor codificatoare pentru proteina VP1 a virusului HBoV1 prin tehnica de Overlap Extension PCR (OE-PCR).

Designul in silico al celor două secvențe s-a realizat cu software-ul DNAMWorks. Parametrii relevanți au fost setați astfel: temperatura de aliniere a primerilor în intervalul 64 – 72°C, dimensiunea primerilor în intervalul 64 – 79pb. După compilare s-a ales soluția cu scorul cel mai mic. S-au generat 78 de primeri.

Primerii au fost puși la comun la o concentrație de 10nM, cu excepția primerilor din capete (forward și reverse), care au fost adăugați în reacție la concentrația de 500nM. Amestecul de reacție a fost amplificat prin reacție PCR cu aliniere în gradient de temperatură, de la 62°C la 72°C. Producții de reacție au fost folosiți drept „template” pentru o altă reacție PCR în care s-au folosit doar primerii din capete și temperatura de aliniere s-a setat la 72°C (Fig. 1). Rezultatul a fost verificat prin electroforeză în gel de agaroză (Fig. 2).

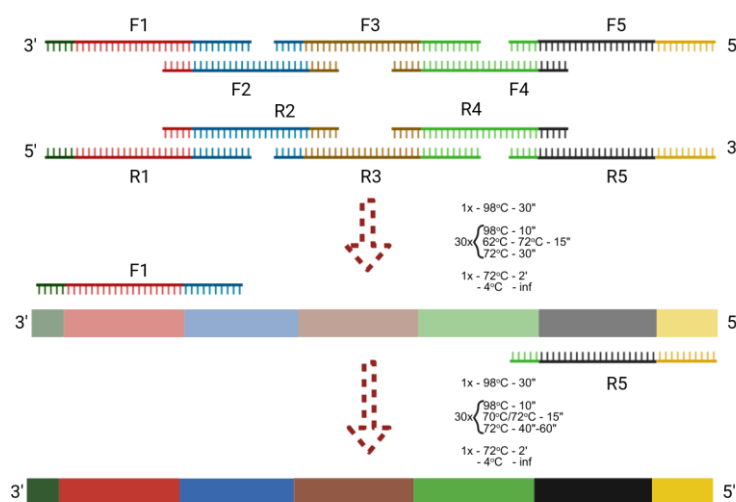


Fig. 1. Schemă reprezentând OE-PCR

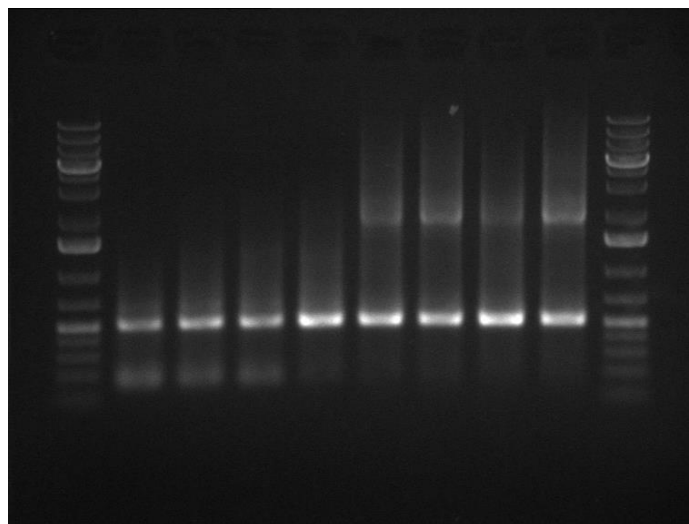


Fig. 2. Electroforeză în gel de agaroză reprezentând a doua amplificare PCR (annealing la 72°C) a produșilor de reacție rezultați în prima reacție PCR în gradient

Banda specifică segmentului VP1 apare la amplificarea produșilor de reacție rezultați la amplificarea PCR cu annealing a primerilor la temperaturi scăzute.

Ulterior segmentul pentru VP1 a fost purificat din gel și supus restricției enzimaticice cu SacI și XhoI. Restricția enzimatică a fost realizată și asupra vectorilor plasmidiali pET-24a(+) și pColdII. După purificarea din gel a fragmentelor tăiate, acestea au fost puse împreună și ligate. Amestecul de ligare a fost folosit pentru transformarea bacteriilor DH5 α . Bacteriile au fost însămânțate pe plăci LB agar cu antibiotic de selecție corespunzător.

Coloniile rezultate au fost testate pentru prezența plasmidului cu genă prin PCR direct colonii cu primeri de secvențiere. Coloniile pozitive au fost crescute în mediu lichid, iar plasmidul a fost izolat și purificat prin miniprep.

Rezultate publicate/diseminate

- 2 lucrări științifice publicate în jurnale cu factor de impact ISI ne-nul;
- 2 comunicări științifice naționale.