

**Rezultatele Proiectului Nucleu**  
**Dezvoltarea de sisteme particulare bazate pe proteine recombinante de interes**  
**vaccinal pentru infecțiile respiratorii virale**  
**Cod PN 22 44 01 01,**  
**pentru anul 2025**

**Obținerea de antigene proteice purificate și analiza fizică și funcțională a acestora**

**Descriere activitate și rezultate Faza 3a**

Pentru formularea și caracterizarea de sisteme autoasamblabile potrivite pentru livrare de antigen și prezentare a acestuia în contextul dezvoltării de vaccin, eforturile s-au îndreptat către sistemele bazate pe polipeptide inspirate de elastină (ELP). S-a realizat expresia de proteine SpyCatcher003 – ELP și proteine de interes marcate cu SpyTag003 (ST) în sistem procariot. Ulterior, s-a urmărit purificarea acestora și optimizarea reacției de cuplare via SpyCatcher003 – SpyTag003 (SC).

Pentru dezvoltare modele *in vitro* pentru măsurarea efectului formulărilor obținute s-a propus un model *in vitro* de mucoasă nazală pentru evaluarea biocompatibilității și permeabilității sistemelor proteice nanoparticulate.

Modelul este reprezentat de un sistem de co-cultură compus din linii celulare epiteliale umane, menținute în sistem ALI (air-liquid interface). Cultivarea în sistem ALI pe inserturi, a liniei celulare Calu-3 induce diferențierea acesteia în celule epiteliale secretoare de mucus. În plus, co-cultivarea liniei Calu-3 cu linia celulară Raji (limfocite B umane) poate induce diferențierea parțială a celulelor Calu-3 în celule asemănătoare celulelor de tip microfold (M-like), capabile să transporte antigene prin transcitoză, pentru a fi preluate de celule prezentatoare de antigen (APC) sau de limfocite B. Într-o primă etapă, s-a evaluat cultivarea celulelor Calu-3 pe inserturi cu porozități de 3 μm și 0,4 μm (1x 10<sup>5</sup> celule/insert) și integritatea monostratului format, utilizând streptavidină-HRP ca marker pentru transferul apical-bazal. Inserturile au fost pretratate cu Matrigel (100 μg/mL) pentru a facilita aderența și diferențierea celulelor, iar cultivarea a durat 10 zile, cu schimbarea mediului la 2–3 zile. Permeabilitatea a fost evaluată prin adăugarea streptavidină-HRP (diluție 1/2000) în compartimentul apical și măsurarea cantității transferate bazal după 1 și 2 ore. Cantitatea de streptavidină-HRP a fost selectată în urma unor teste preliminare de evaluare a citotoxicității. Detecția s-a realizat printr-un protocol ELISA adaptat, utilizând 36 μL substrat, 4 μL probă și 20 μL soluție de stopare (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N), iar absorbția a fost măsurată la 450 nm. Curba standard a fost realizată prin diluții seriale de la 100% (1/2000) până la 0,39%.

Pentru dezvoltarea metodologiei qPCR și/sau secvențiere de nouă generație pentru măsurarea efectului formulărilor obținute și evaluarea *in vitro* al potențialului imun al sistemelor proteice nanoparticulate s-a propus un studiu de stimulare a celulelor dendritice cu antigen particulat sau neparticulat, în prezența unor agoniști TLR în rol de adjuvanți care să stimuleze imunitatea înăscută. În acest sens, celule dendritice murine derivate din măduva osoasă la o densitate de 200000 celule/godeu cultivate în plăci de cultură „low-attachment” cu 96 de godeuri au fost incubate împreună cu antigen particulat (ectodomeniul hemaglutininei virusului gripal A H1N1 A/Puerto Rico/08/1934) sau antigen monomeric (hemaglutinina „full-length” a aceluiasi virus). Pentru explorarea răspunsului imun datorat contextului în care celule prezentatoare de antigen pot întâlni antigenul, stimuli suplimentari sub forma unor agoniști TLR au fost folosiți (LPS, PAM3CSK4, Poly(I:C) HMW și ODN2395). După incubare s-au colectat probe de supernatant de mediu de cultură pentru măsurarea nivelului de citokine secretat în urma stimulării. În paralel, celulele dendritice au fost supuse analizei transcriptomului pentru a evalua potențialul imun al sistemelor proteice nanoparticulate. ARN-ul total a fost extras, purificat și supus secvențierii de nouă generație folosind platforma Illumina. Rezultatele secvențierii au fost mai apoi procesate prin mijloace bioinformatic pentru a obține semnificația biologică.

### **Descriere activitate și rezultate Faza 3b**

Anterior s-a reușit sinteza de VP3 a virusului HBoV1. În urma mai multor încercări de expresie recombinantă în *E. coli*, datorită randamentului scăzut și a prezenței mai multor benzi de proteină pe gelurile de SDS-PAGE în zona de migrare a VP3, s-a decis atașarea unui HA-Tag în C-terminal al secvenței VP3 pentru a facilita identificarea proteinei exprimate via Western Blot.

Secvența VP3-HA-Tag a fost clonată într-un plasmid pCold-IV pentru a face uz de sistemul de expresie inductibil bazat pe promotorul *cspA*, care se declanșează la scăderea temperaturii la 15°C. Plasmidul a fost transformat în mai multe tulpini de expresie bazate pe BL21(DE3) pentru a maximiza randamentul de expresie (BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE și BL21(DE3) Codon-Plus RIL). Din cele observate prin tehnica western blot expresia proteinei de interes există, dar este la un nivel foarte mic. Pentru îmbunătățirea expresiei s-a realizat cotransformare în BL21(DE3) a pCold-IV – VP3-HA-Tag cu plasmide care codifică pentru diferite chaperone. Mai departe s-a ales varianta de plasmid pG-KJE8 (*DnaK*, *DnaJ*, *grpE*, *groES*, *groEL*) la 24h pentru optimizarea expresiei de VP3-HA-Tag. În acest scop, s-a reluat cultivarea de bacterii transformate cu cele două plasmide și s-a indus expresia la rece. Biomasa a fost procesată și s-a separat fracția solubilă. Aceasta a fost supusă purificării de proteină prin cromatografie de schimb ionic folosind o coloană HiTrap Q Sepharose.

### **Stadiul de atingere a obiectivelor**

Obiectivele fazei au fost îndeplinite în totalitate. S-a realizat expresia de proteine SpyCatcher003 – ELP și proteine de interes marcate cu SpyTag003 (ST) în sistem procariot. Ulterior, s-a urmărit purificarea acestora și optimizarea reacției de cuplare via SpyCatcher003 – SpyTag003 (SC). S-a propus un model in vitro de mucoasă nazală pentru evaluarea biocompatibilității și permeabilității sistemelor proteice nanoparticulate. De asemenea, pentru dezvoltarea metodologiei qPCR și/sau secvențiere de nouă generație pentru măsurarea efectului formulărilor obținute și evaluarea in vitro al potențialului imun al sistemelor proteice nanoparticulate s-a propus un studiu de stimulare a celulelor dendritice cu antigen particulat sau neparticulat, în prezența unor agoniști TLR în rol de adjuvanți care să stimuleze imunitatea înăscută.

S-a realizat optimizarea expresiei de VP3-HA-Tag și identificarea proteinei prin Western Blot. De asemenea, s-a realizat o primă încercare de purificare de proteină prin cromatografie de schimb ionic

### **Rezultate publicate/diseminate**

Faza 2a:

- 1 articol științific publicat ISI Q1;
- 3 prezentări la conferințe științifice.

Faza 2b:

- 1 prezentare la conferință științifică.

Responsabil Proiect  
CSIII Vlad TOFAN