

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-14-0547**

Vývoj nového peptidového systému pre transport liečiv do mozgu.

Zodpovedný riešiteľ **PharmDr. Andrej Kováč, PhD.**

Príjemca **Neuroimunologický ústav SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Neuroimunologický ústav SAV

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

0

Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

0

Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

PUBLIKÁCIE:

2016:

1. Banks WA, Kovac A, Majerova P, Bullock KM, Shi M, Zhang J. Tau Proteins Cross the Blood-Brain Barrier. J Alzheimers Dis. 2016 Nov 1;55(1):411-419.

2. Michalicova A, Banks WA, Legath J, Kovac A. Tauopathies – focus on changes at the neurovascular unit. Current Alzheimer research.

2017:

1. Majerova P, Barath P, Michalicova A, Katina S, Novak M, Kovac A. Changes of Cerebrospinal Fluid Peptides due to Tauopathy. J Alzheimers Dis. 2017;58(2):507-520. doi: 10.3233/JAD-170110. PubMed PMID: 28453489.

2. Karlíková R, Mičová K, Najdekr L, Gardlo A, Adam T, Majerová P, Friedecký D, Kováč A. Metabolic status of CSF distinguishes rats with tauopathy from controls. Alzheimers Res Ther. 2017 Sep 21;9(1):78. doi: 10.1186/s13195-017-0303-5. PubMed. PMID: 28934963; PubMed Central PMCID: PMC5609022.

3. Michalicova, A., Banks, W. A., Legath, J. and Kovac, A. Tauopathies – Focus on Changes at the Neurovascular Unit. In Current Alzheimer Research. ISSN 1567-2050, 2017, vol. 14, p. 1-12.

4. Michalicova, A., Galba, J., Novak, M. and Kovac, A. Determination of Evans blue as a blood-brain barrier integrity tracer in plasma and brain tissue by UHPLC/UV method. In Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. ISSN 1082-6076, 2017, vol. 41, p. 1-7.

5. Michalicova, A., Bhide, K., Bhide, M. and Kovac, A. How viruses infiltrate the central

nervous system. In Acta Virologica 2017;61(4):393-400 ISSN 1336-2305

2018:

1. Majerova P, Garruto RM, Kovac A. Cerebrovascular inflammation is associated with tau pathology in Guam parkinsonism dementia. J Neural Transm (Vienna). 2018 Jul;125(7):1013-1025. doi: 10.1007/s00702-018-1883-3.

2. Forgacsova A, Galba J, Garruto RM, Majerova P, Katina S, Kovac A. A novel liquid chromatography/mass spectrometry method for determination of neurotransmitters in brain tissue: Application to human tauopathies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2018 Jan 15;1073:154-162. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.12.015.

PREDNÁŠKY:

2015:

1. KOVAC, Andrej – KOVACECH, Branislav – KRISTIN, Bullock – BANKS, William -, NOVAK, Michal. Tau Protein and Its Role In Neurodegeneration. In 12th International Symposium on Vip, Pacap And Related Peptides Programme and Abstracts Book. Cappadocia, Turkey September 21-26, 2015, s. 16

2. KOVAC, Andrej – MICHALICOVA, Alena – MAJEROVA, Petra – BANKS, William. Neurovascular changes in tauopathies. In IRB 2015 Blood-Brain Barrier meeting Programme and Abstracts Book. Barcelona, Spain November 2-4, 2015, s. 21

3. MICHALICOVA, Alena – MAJEROVA, Petra – CENTE, Martin – AGNES Kittel - KOVAC, Andrej – NOVAK, Michal. The blood-brain barrier in health and disease – damage of the blood-brain barrier of transgenic rat model for tauopathies. In The Immune And Nervous Systems teamwork, ageing and diseases. Programme and Abstracts Book. Smolenice, Slovakia October 20-21, 2015, s. 33

2017:

1. KOVÁČ. Andrej. Metabolomické mapovanie pomocou LC-MS (HPLC-MS, Bratislava, 10.10.2017) ISBN 978-80-223-4426-5

2. MAJEROVA, Petra- SINSKY, Jakub- MICHALICOVA, Alena- KOVAC, Andrej. Použitie LC-MALDI-MS v modernej proteomickej analýze. HPLC-MS seminar, Bratislava, Slovakia, 10.11.2017, ISBN: 978-80-223-4426-5, str. 42

2018:

1. MIHALJEVIC, Sandra- MAJEROVA, Petra- KOVAC, Andrej. Analysis of the changes on the choroid plexus barrier in tauopathies. Advances In slovak Experimental Neuroimmunology 2018, Slovakia, Smolenice, May 9-11, 2018. ISBN 978-80-971357-6-8, s. 29

POSTERY:

2015:

1. MICHALICOVA, Alena – MAJEROVA, Petra – CENTE, Martin – AGNES Kittel - NOVAK, Michal - KOVAC, Andrej. Damage of the blood-brain barrier of transgenic rat model for tauopathies caused by neurofibrillary degeneration. In 11th International Conference on Cerebral Vascular Biology. Programme and Abstracts Book. Paris, France July 6-9, 2015

2. MAJEROVA, Petra – CENTE, Martin – SANTOSH, Jadhav – HANES, Jozef – NOVAK, Michal - KOVAC, Andrej. Tau induces monocyte migration across in vitro blood-brain barrier model. In IRB Barcelona 2015, Blood-brain barrier meeting: Programme and Abstracts Book. Barcelona, Spain November 2-4, 2015, s.62

3. MAJEROVA, Petra – CENTE, Martin – SANTOSH, Jadhav – HANES, Jozef – NOVAK, Michal - KOVAC, Andrej. Tau induces monocyte migration across in vitro blood-brain barrier model. In 11th International Conference on Cerebral Vascular Biology: Programme and Abstracts Book. Paris, France July 6-9, 2015.

2016:

1. MICHALICOVA, Alena- MAJEROVA, Petra- CENTE, Martin- KITTEL, Agnes- NOVAK, Michal- KOVAC, Andrej. Damage of the blood-brain barrier of transgenic rat model for tauopathies caused by neurofibrillary degeneration. 19th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers, 2016, Copenhagen, Denmark.

2. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- BARATH, Peter- MICHALICOVA, Alena- KATINA, Stanislav- NOVAK, Michal. A peptidomic profile of transgenic rat model for tauopathy: LC-MALDI/MS analysis of cerebrospinal fluid. 15th Human Proteome Organization World Congress, HUPO, 2016, Taipei, Taiwan.

3. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- M. GARRUTO, Ralp- NOVAK, Michal. Vascular

inflammation in Guam Parkinsonism-Dementia Alzheimer's Disease as a Neurovascular Inflammatory Disorder, The New York Academy of Sciences, 2016, New York, USA

4. MAJEROVA, Petra- M. GARRUTO, Ralph- NOVAK, Michal- KOVAC, Andrej.

Neurovascular Changes in Guam Parkinsonism-Dementia, Gordon Research Conferences, CNS Barriers, Colby-Sawyer College, New London, NH, USA

2017:

1. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- MICHALICOVA, Alena- BANKS, William A. Blood-brain barrier changes in tauopathies. 12th International Conference on Cerebral Vascular Biology (CVB2017), 28.11 – 1.12 2017, Melbourne)

2. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- BHIDE, Mangesh. Interaction of Trypanosoma brucei with glial cells. 11th Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC 2017), Kosice, Slovakia, 27-29 September 2017, ISBN 978-80-972017-5-3)

3. MAJEROVA, Petra- BARATH, Peter- MICHALICOVA, Alena- KATINA, Stanislav- NOVAK, Michal- KOVAC, Andrej. Changes of cerebrospinal fluid peptides due to tauopathy. 11th Central and Eastern European Proteomic Conference (CEEPC 2017), Kosice, Slovakia, 27-29 September 2017, str. 76

4. MAJEROVA, Petra- GARRUTO, Ralph- KOVAC, Andrej. Vascular inflammation in Guam Parkinsonism dementia. 20th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-brain barrier. (13-15.9.2017, Krakow, Poland); Fluids and Barriers of the CNS, 2017, 14(Supp 2) :A36

5. MAJEROVA, Petra- GARRUTO, Ralph- KOVAC, Andrej. Vascular inflammation in Guam Parkinsonism dementia. Current status of experimental neuroimmunology in Slovakia, Smolenica, Slovakia, 24-26.5. 2017

6. MICHALICOVA, Alena- GALBA, Jaroslav- MIHALJEVIC, Sandra- NOVAK, Michal- KOVAC, Andrej. A Determination of the blood-brain barrier integrity in transgenic rat model for tauopathies SHR-24 using Evans blue and sodium fluorescein. 20th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers. 13.-15. september 2017, Krakow, Poľsko; Fluids and Barriers of the CNS, 2017, 14(Supp 2) :A39.

7. MICHALICOVA, Alena- GALBA, Jaroslav- MIHALJEVIC, Sandra- NOVAK, Michal- KOVAC, Andrej. Determination of the blood-brain barrier integrity in transgenic rat model for tauopathies SHR-24 using Evans blue and sodium fluorescein. The 11th Central and Eastern European Proteomic Conference. 27.-29. september 2017, Košice, Slovensko

8. MIHALJEVIC, Sandra. Analysis of the changes on the choroid plexus barrier in tauopathies. 20th International Symposium on Signal Transduction at the Blood-Brain Barriers . 13.-15. september 2017, Krakow, Poľsko; Fluids and Barriers of the CNS, 2017, 14(Supp 2) :A40.

2018:

1. MAJEROVA, Petra- KOVAC, Andrej. Proteomic analysis of rat brain capillaries reveals differential protein expression in response to neurofibrillary pathology. 7th Annual Conference Of The Czech Society For Mass Spectrometry, Czech Republic, Prague, April 11-13, 2018. ISBN 978-80-905045-8-5, s. 73

2. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- GALBA, Jaroslav- OLESOVA, Dominika, HANES, Jozef. A liquid chromatography/mass spectrometry method for determination of blood-brain barrier shuttle peptides. 7th Annual Conference Of The Czech Society For Mass Spectrometry, Czech Republic, Prague, April 11-13, 2018. ISBN 978-80-905045-8-5, s. 64

3. KOVAC, Andrej- MAJEROVA, Petra- OLESOVA, Dominika, HANES, Jozef. The Development Of Novel Approaches For Diagnostics And Pre-Clinical Therapy For Tauopathies Using Transport Peptides For Drugs And Antibodies Into The Brain. 25th Annual PNIRS Scientific Meeting: Miami Beach, Florida, June 6-9, 2018

4. OLESOVA, Dominika- GALBA, Jaroslav- OSTATNIKOVA, Daniela- REPISKA, Gabriela- BABINSKA, Katarina- KOVAC, Andrej. UHPLC-MS/MS method for determination of metabolomic markers of Autism Spectrum Disorder in human urine. 7th Annual Conference Of The Czech Society For Mass Spectrometry, Czech Republic, Prague, April 11-13, 2018. ISBN 978-80-905045-8-5, s. 67

Uplatnenie výsledkov projektu

Predložený projekt z oblasti výskumu mozgu bol venovaný jednej z najdôležitejších problematik- štúdiu hematoencefalickej bariéry ako hlavnej prekážky pre transport neurofarmaceutík do centrálnej nervovej sústavy . Pri riešení projektu sme sa zamerali na

vývoj nových farmakologicky aktívnych peptidových transportných systémov s cieľom nájsť vektory vhodné pre transport neuroprotektívnych malých molekúl a bioliečiv cez HEB. Zvolený prístup by mohol v budúcnosti predstavovať nový terapeutický spôsob v liečbe neurodegeneratívnych ochorení akými sú napríklad tauopátie. Peptidy ako transportné vektory sú ľahko modifikovateľné s cieľom dosiahnuť, čo najlepšie farmakologické a farmaceutické vlastnosti. Peptidy ako transportné vektory protilátok a nanoprotilátok by mohli zároveň slúžiť na in vivo molekulárne zobrazovanie patologických zmien mozgu pomocou PET a tak umožniť nový druh tzv. "presnej farmakológie" dôležitej pri liečbe a preklinickej diagnostike neurodegeneratívnych ochorení.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)

Hematoencefalická bariéra (HEB) je fyziologická bariéra izolujúca tkanivo nervovej sústavy od krvného obehu. Je tvorená predovšetkým endotelovými bunkami, ktoré sú rozmiestnené pozdĺž celej cievy a obklopujú jej lumen. V oblasti vývoja nových terapeutík centrálnej nervovej sústavy predstavuje HEB veľkú prekážku a je jedným z limitujúcich faktorov. Vysokomolekulové liečivá ako peptidy, rekombinantné proteíny, monoklonové protilátky, liečivá na báze RNAi nie sú schopné prechádzať cez HEB. S cieľom transportovať liečivá cez HEB sa niekoľko štúdií zameralo na výskum peptidových transportných vektorov. Metóda „phage display“ predstavuje jeden z možných spôsobov ako vyhľadávať uvedené transportné peptidy. Prístup hľadania peptidov založený na metóde „phage display“ sme použili pri identifikácii peptidov pomocou 12-mérnej fágovej knižnice. Podarilo sa nám identifikovať 2 peptidy schopné transportu cez HEB, ktoré sú v súčasnosti v štádiu patentovania. Počas riešenia projektu sme zostavili a štandardizovali UHPLC MS/MS kvantitatívnu analytickú metódu, ktorá slúžila na detekciu koncentrácie jednotlivých peptidov v meraných vzorkách. Analyzovali sme stabilitu a farmakokinetické vlastnosti peptidov. V ďalších krokoch riešenia projektu sme sa snažili identifikovať receptor resp. mechanizmus zodpovedný za transport daných peptidov. Pomocou metódy „cross-linking“ a MALDI-TOF/TOF hmotnostnej spektrometrie, ako i konfokálnej mikroskopie sme poukázali, na to, že peptidy sú pravdepodobne internalizované a transportované procesom -adsorpciou sprostredkovanou transcytózou. V poslednej fáze riešenia projektu sme identifikovali fágy nesúce peptidy špecificky sa viažuce na povrch endotelových buniek a transportované cez HEB pomocou metódy in vivo „phage display“. Fágy boli injektované priamo do chvostovej žily potkana. Pomocou in vivo „phage display“ metódy sa nám podarilo v mozgu potkana identifikovať 5 rôznych peptidov.

Výsledky získané počas riešenia projektu boli prezentované na niekoľkých medzinárodných konferenciách.

Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)

The blood-brain barrier (BBB) forms a physical barrier between the tissue of the central nervous system and the blood circulation. The BBB consists primarily of endothelial cells that line the lumen of brain microvessels. In the field of development of new central nervous system therapeutics, the BBB represent a major obstacle and is one of the most limiting factors. High-molecular drugs such as peptides, recombinant proteins, monoclonal antibodies or RNA-based drugs are not able to pass through the BBB. In order to transport drugs through the BBB, several studies have focused on the research of peptide transport vectors. The phage display method is one of the possible ways to search for such transport peptides. We applied phage display based method to identify peptides with the use of 12-mer phage library. We succeeded in identification of 2 peptides able to cross the BBB, which are currently in the patenting process. We have established and standardized the UHPLC MS / MS quantitative analytical method, which was used to detect the concentration of individual peptides in the measured samples. We analysed the stability and pharmacokinetic properties of the peptides and subsequently, we tried to identify the receptor or the mechanism responsible for the peptides transport.

Using "cross-linking" method, MALDI-TOF / TOF mass spectrometry and confocal microscopy, we have pointed out that the peptides are probably internalized and transported by the adsorptive-mediated transcytosis. At the end, with the use of an in vivo phage display, we identified phages carrying peptides specifically binding to the surface of

endothelial cells and transported through the BBB. The phages were injected directly into the rat tail vein. Using in vivo phage display method, we managed to identify 5 different peptides in the rat brain. The results obtained during this project were presented at several international conferences.

Svojím podpisom potvrdzujem, že údaje uvedené v záverečnej karte sú pravdivé a úplné a súhlasím s ich zverejnením.

Zodpovedný riešiteľ

PharmDr. Andrej Kováč, PhD.

Štatutárny zástupca príjemcu

Dr.h.c. prof., MVDr. Michal Novák, DrSc.

V dňa

V dňa

.....
Podpis zodpovedného riešiteľa

.....
Podpis štatutárneho zástupcu príjemcu