

Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-15-0720****Stanovenie aktivity transfer faktora, imunostimulačného preparátu z extraktu leukocytov a štandardizácia jeho prípravy**Zodpovedný riešiteľ **MVDr. Juraj Kopáček, DrSc.**Príjemca **Biomedicínske centrum SAV - Virologický ústav**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Biomedicínske centrum SAV - Virologický ústav

Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

V projekte sme nemali zahraničnú spoluprácu.

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

Zatiaľ nie sú výstupy duševného vlastníctva. V prípade záujmu od výrobcu TF máme v pláne pripraviť štandardný operačný postup pre validovanú inovovanú metodiku stanovenia biologickej aktivity TF.

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

- Kempová V., Zaťovičová M., Kajanová I., Jelenská L., Klimko L., Kopáček J., Zelník V. (2020) Obstacles and limitations of transfer factor biological activity assay design. Acta Virol. 64(3):271-275. doi: 10.4149/av_2020_303
- Zuniga-Navarrete F., Zavala-Meneses SG, Zelnik V, Kopacek J., Skultety L (2001) Initial proteomic characterization of IMMODYN, commercially available dialysable leukocytes extract. Chem. Pap. doi: 10.1007/s11696-020-01467-w

Uplatnenie výsledkov projektu

Jedným z cieľov projektu bol vývoj inovovanej metodiky sledovania biologickej aktivity transfer faktora (TF). Nami vyvinutá metodika je založená na teste proliferácie buniek Jurkat vnímavých na účinok TF. Metodika umožňuje meranie fluorescenčného signálu v reálnom čase, čo môže byť využité nielen pre koncové stanovenie aktivity TF ale aj pre štúdie kinetiky pôsobenia TF na cieľové bunky. Túto novú metódu stanovenia biologickej aktivity TF a jeho komponentov sme úspešne používali vo viacerých experimentoch uskutočnených v rámci realizácie výskumných aktivít projektu. Úspešné zavedenie tejto inovovanej metódy do praxe je závislé od záujmu finálneho odberateľa – farmaceutickej spoločnosti produkujúcej komerčné preparáty TF a jeho ochote nahradiť metódu vo svojej registračnej dokumentácii prípravku. V takom prípade bude potrebné metódu plne validovať a riešiteľ projektu je pripravený vypracovať relevantný štandardný operačný protokol a ostatné dokumenty.

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

Hlavnými cieľmi projektu boli detailnejšia charakterizácia viac-zložkového imunostimulačného liečivého prípravku transfer faktora (TF), vplyv jeho pôsobenia na molekulárnej úrovni a vypracovanie inovovanej metódy stanovenia jeho biologickej aktivity. Štúdiom diferenciálne exprimovaných génov metódami micro-array sa nám podarilo identifikovať bunkové signálne dráhy vrodenej imunity, ktoré ovplyvňuje pôsobenie TF. Z užšie selektovaných diferenciálne exprimovaných génov sme sa sústredili na gén IFI44 kódujúci proteín indukovaný interferónom 44, ktorý je málo prebádaný proteín zahrnutý v dráhach vrodenej imunity. Novo vyvinutou metódou kvantitatívnej RT-PCR sa nám podarilo potvrdiť rozdielnu expresiu génu IFI44 v rôznych bunkových systémoch (lymfoidné bunky Jurkat, THP-1, HL60) vrátane ex-in vivo kultivovaných periférálnych krvných mononukleárných bunkách od zdravých donorov, ktoré boli vystavené pôsobeniu TF. Zloženie komerčne dostupného preparátu TF bolo detailne analyzované proteomickými metódami. Napriek komplexnému zloženiu týchto preparátov TF bolo možné identifikovať fragmenty proteínov, ktoré boli spoločné pre viaceré preparáty TF. Proteomické analýzy preparátov TF, ktoré identifikovali proteíny zahrnuté v dráhach vrodenej imunitnej odpovede, sú v súlade s výsledkami micro-array analýz diferenciálnej expície génov a identifikovanými dráhami súvisiacimi s odpoveďou na pôsobenie TF. Výsledky projektu boli zatiaľ publikované vo dvoch vedeckých prácach v domácich karentových časopisoch registrovaných v databázach Web of Science a PubMed.

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

The main objectives of the project were a more detailed characterization of the multi-component immunostimulatory drug transfer factor (TF), the impact of its action at the molecular level and the development of an innovative method for determining its biological activity. By studying differentially expressed genes by micro-array methods, we were able to identify cellular innate immune signalling pathways that are affected by the action of TF. From the down-selected differentially expressed genes, we focused on the IFI44 gene encoding the interferon 44-induced protein, which is a less characterized protein involved in innate immune pathways. The newly developed quantitative RT-PCR method confirmed the differential expression of the IFI44 gene in different cell models (Jurkat lymphoid cells, THP-1, HL60), including ex-in vivo cultured peripheral blood mononuclear cells from healthy donors exposed to TF. The composition of a commercially available TF preparation was analysed in detail by proteomic methods. Despite the complex composition of these TF preparations, it was possible to identify protein fragments that were common to several TF preparations. Proteomic assays of TF preparations identified proteins involved in innate immune response pathways and the results are consistent with the results of micro-array analyses of differentially expressed genes and with identified pathways associated with the TF response.

The results of the project have been so far published in two scientific papers in domestic CC journals registered in the Web of Science and PubMed databases.