

Záverečná karta projektu

Názov projektu

Evidenčné číslo projektu **PP-COVID-20-0044****Vývoj terapeutických biomolekúl blokujúcich SARS-CoV-2 infekciu**Zodpovedný riešiteľ **prof. RNDr. Eva Kontseková, DrSc.**Príjemca **Neuroimunologický ústav SAV**

Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Neuroimunologický ústav SAV

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Zoznam spolupracujúcich organizácií zo zahraničia, ktoré sa zapojili do riešenia projektu (uved'te názov, sídlo, štát a identifikačné číslo ak je dostupné)

Genomics Core Facility CEITEC Brno, Masarykova univerzita, Kamenice 5, 625 00 Brno, Česká republika

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

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

1. Hudakova, Nikola, Simona Hricikova, Amod Kulkarni, Mangesh Bhide, Eva Kontseková, and Dasa Cizkova. 'Fundamental and advanced therapies, vaccine development against SARS-CoV-2', Pathogens 10, no. 6: 636. (2021).

<https://doi.org/10.3390/pathogens10060636>

Uplatnenie výsledkov projektu

Vyvinuté nanoprotiľátky majú vysoký potenciál uplatniť sa ako terapeutiká pri liečbe COVID 19 a znižovaní nepriaznivého vplyvu tejto infekcie. Postup produkcie nanoprotiľátok môže byť použitý na aj tvorbu nanoprotiľátok proti ďalším patogénom, a tým prispieť k vývoju účinných látok pri liečbe rôznych infekcií. V rámci projektu bol odhalený aj obraz bunkovej odpovede (transkriptom) voči SARS-CoV-2, čo dáva pevný základ pre lepšie pochopenie infekcie a interakcie medzi vírusom a hositeľom.

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

Prvým cieľom bolo pochopiť udalosti bunkovej signalizácie vyvolané v bunkách inkubovaných s proteínom S. Zistili sme, že expresia celkovo 657 génov bola významne zmenená (456 génov bolo upregulovaných a 201 génov bolo downregulovaných). Napríklad, bolo indukovaných niekoľko signálnych kaskád: apoptóza, interakcie cytokín-cytokín, signalizácia TNF, antivírusové mechanizmy génov stimulovaných IFN, signalizácia TLR, nezávislá signalizačná kaskáda MyD88, signalizácia interfrónov (vyvolali sa všetky tri

kaskády alfa, beta a gama). Tieto výsledky budú čoskoro publikované v časopise s vysokým impaktovým faktorom.

Druhým cieľom bolo identifikovať špecifické úseky proteínu S viažuce sa na receptor bunky. Uskutočnili sme limitovanú trypsínovú digesciu komplexu S proteínu s bunkovým receptorom. Peptidy proteínu S viažuce sa na receptory buniek boli identifikované pomocou hmotnostnej spektrometrie. Peptidy s aminokyselinovými pozíciami 331-339 (pep1), 409-438 (pep2 a 3), 415-493 (pep4) a 543-511 (pep5) boli identifikované ako najpravdepodobnejšie väzbové miesta na proteíne S. Naše výsledky boli zhodné s nedávnou publikáciou (Lan et al., Nature 2020, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>), v ktorej bol hlavný väzbový motív receptora identifikovaný medzi aminokyselinovými zvyškami 438 až 506. Pevne teda veríme, že pep4 a pep5 sú hlavné receptorové väzobné miesta.

Doména proteínu S, viažuca sa na receptor buniek, sa použila na imunizáciu B-buniek lamy a na syntézu VHH (nanoprotílátky) a fágovej knižnice. Špecifické VHH boli izolované a produkované v rekombinantnej forme. Následne bola zisťovaná schopnosť neutralizovať vírus vo vírus neutralizačnom teste. Štyri nanoprotílátky (VHHD12, VHHE12, VHHE8, VHHE10) vykazovali vynikajúcu neutralizačnú schopnosť voči vírusu a biologickú bezpečnosť voči bunkám v teste toxicity. Tieto nanoprotílátky môžu byť v budúcnosti sľubnými terapeutickými látkami.

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

First aim was to understand the cell signaling events induced in the cells incubated with protein S. We found that expression of total 657 genes was altered significantly (456 genes were upregulated and 201 genes were downregulated). Several signaling cascades were induced for examples: Apoptosis, cytokine-cytokine interactions, TNF signaling, antiviral mechanisms of the genes stimulated by IFN, TLR signaling, MyD88 independent signaling cascade, Interferon signaling (all three IFN cascades, alpha, beta and gamma were evoked). These results will be submitted soon for publication in journal with high-impact factor.

The second objective was to identify receptor binding pockets on Spike protein. We performed limited-trypsin digestion of the Protein S-cell receptor complex and the receptor binding peptides were identified on mass-spectrometry. Peptides with amino acid positions 331-339 (pep1), 409-438 (pep2 and 3), 415-493 (pep4) and 543-511 (pep5) were identified as the most probable binding sites on protein S. Our results were in correlation with the data published recently (Lan et al., Nature 2020, <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>) in which the main receptor binding motif was identified between amino acid residues 438 to 506. Thus, we strongly believe that pep4 is the main receptor binding sites.

The receptor binding domain was used to immunize B-cells of llama and synthesize the VHH-phage library. RBD specific VHH (nanobodies) were isolated from library, produced in recombinant form and tested for virus neutralization ability. Four nanobodies (VHHD12, VHHE12, VHHE8, VHHE10) showed excellent virus neutralization and were pharmacologically safe. These nanobodies can be promising therapeutic agents.