

Date de identificare proiect

Titlul: Dezvoltarea de noi tehnologii, medicamente și vaccinuri pentru prevenirea SARS-CoV-2

Contract: 11Sol/2020

Durata proiectului: 18 luni

Coordonator: Spitalul Clinic Județean de Urgență „Pius Brânzeu” Timișoara, Centrul de Terapii Genice și Celulare în Cancer – OncoGen

Partener: Institutul Național de Cercetare-Dezvoltare Medico-Militară „Cantacuzino”
București

Finanțare: 3.500.000 RON

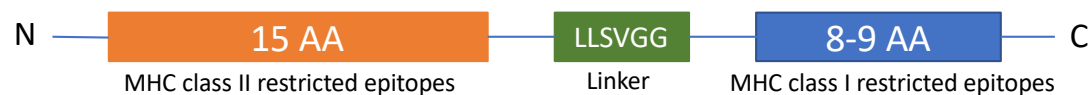
Durată: 18 luni

Obiectivele proiectului

1. Identificarea peptidelor imunogene din structura virusului SARS-CoV-2 specifice pentru imunofenotipul populației din România
2. Sinteza, purificarea și validarea secvențelor peptidice vaccinale
3. Testarea diferitelor combinații de peptide *in vitro* pe culturi celulare și *in vivo* pe model animal pentru identificarea combinațiilor optime de inducere a răspunsului imun adaptativ
4. Validarea unui vaccin peptidic preventiv pentru SARS-CoV-2 pentru studii clinice

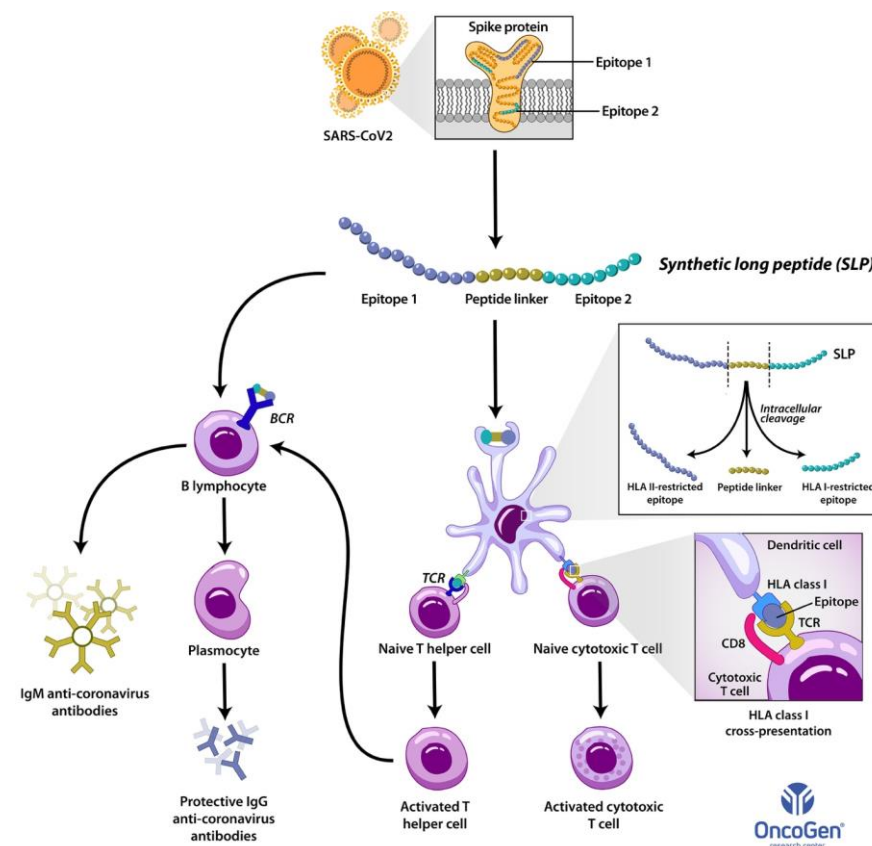
Rezultate

Predicția epitopilor și design-ul peptidelor lungi sintetice (SLPs)



Structura SLPs

Platforma de vaccinare propusă în cadrul acestui proiect se bazează pe peptide lungi sintetice (synthetic long peptides = SLPs), care combină epitopi din structura proteinei S a virusului SARS-CoV-2, restricționați la molecule MHC clasa I (8-9 AA) și clasa II (15 AA), legați printr-un linker de 6 AA. Epitopul specific pentru legarea de molecule MHC clasa II se află întotdeauna la capătul N terminal al peptidului.

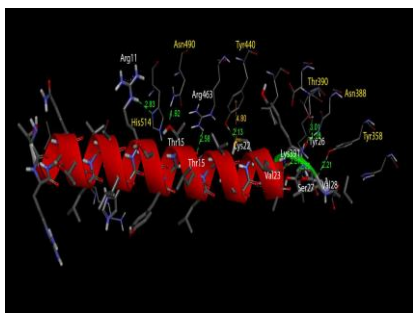
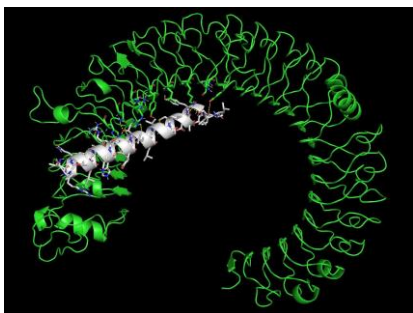
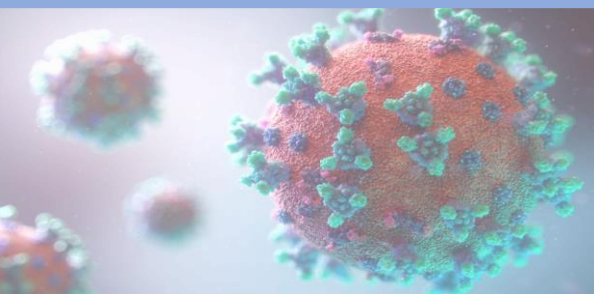


Interacțiunea dintre TLR4 și peptidele vaccinale

Modalitatea de activare a sistemului imun indusă de vaccinul pe bază de SLPs dezvoltat în cadrul proiectului DECODE

DECODE

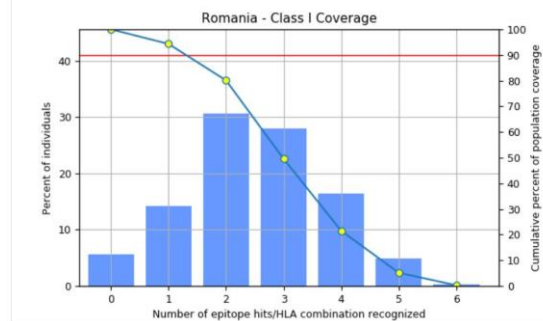
Structura 3D a peptidelor lungi sintetice (SLPs)



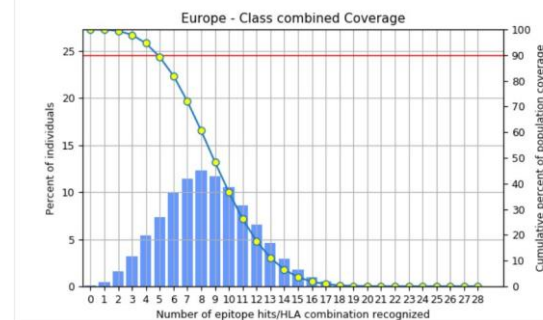
Docking-ul dintre TLR3 și SLPs selectat (scor HADDOCK -90.0 +/- 6.0). Vizualizare Discovery Studio

Population: Romania

MHC class	Coverage	Average hit	PC90
I	94.33%	2.51	1.3

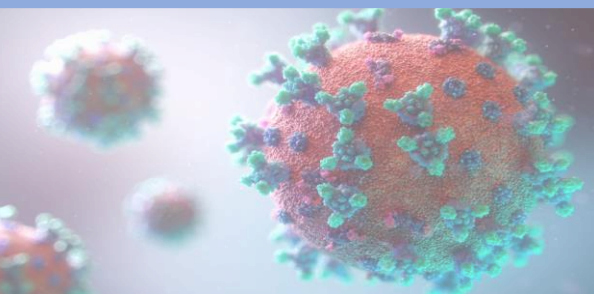


MHC class	Coverage	Average hit	PC90
combined	99.89%	8.49	4.87



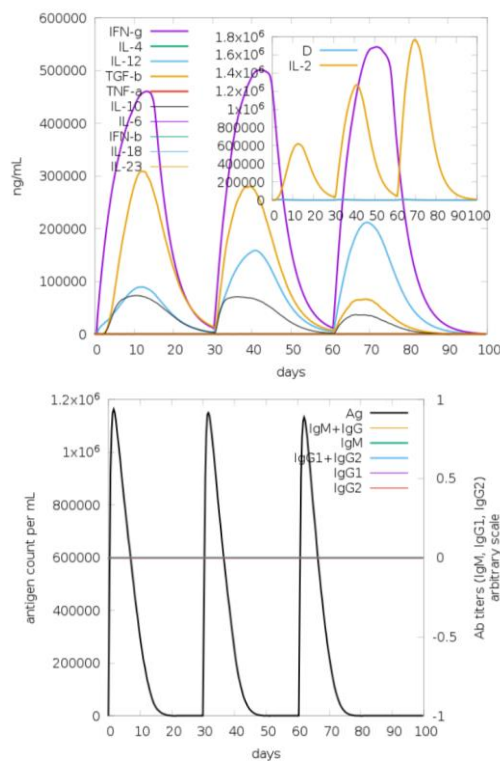
Coverage analysis pentru peptidele restricționate la MHC clasa I și pentru SLP selectate

Denumire peptid	Grafic Ramachandran	Structura 3D a SLP
Pep 1	 Phi vs Psi plot with regions for Beta sheet and Alpha-helix, right handed.	 TRFQTLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY
Pep 2	 Phi vs Psi plot with region for Alpha-helix, right handed.	 TRFQTLALHRSYLTLLSVGGNNYLYRLF
Pep 3	 Phi vs Psi plot with region for Alpha-helix, right handed.	 TRFQTLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK
Pep 4	 Phi vs Psi plot with region for Alpha-helix, right handed.	 TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVLDILSRL
Pep 5	 Phi vs Psi plot with regions for Beta sheet and Alpha-helix, right handed.	 TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRFNPITNL



Rezultate

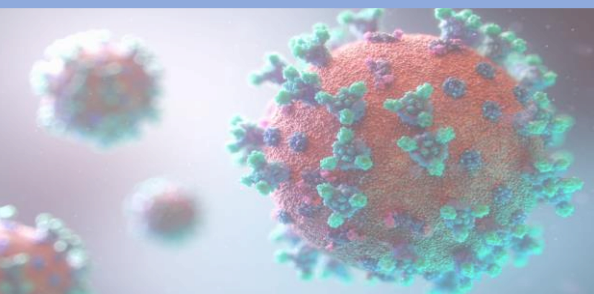
Teste de simulare a răspunsului imun *in silico* – C-ImmSim



Reprezentarea grafică a răspunsului imun umoral și celular. A. Evoluția concentrației Ag, imunoglobulinelor și a complexelor immune; B. Concentrația citokinelor și interleukinelor (D = semnalul de pericol, Simpson index). Se observă secreția crescută de IFN-gamma și IL-12 (probabil de la nivelul limfocitelor Th1), TGF-beta și IL-10 (de la nivelul limfocitelor Tregs), dar și a IL-2, factor mitogenic al limfocitelor T. Aceste citokine mențin un echilibru imun, stimulând populații celulare care să nu poată induce furtuna citokinică.

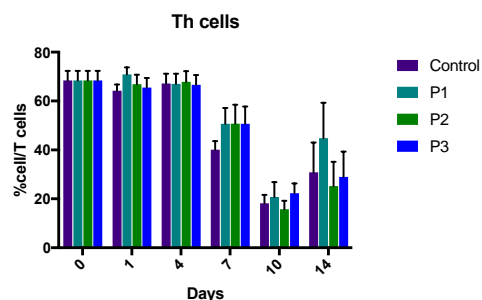
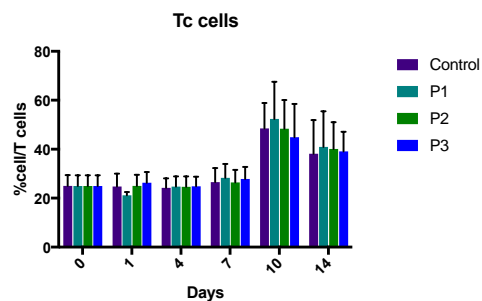
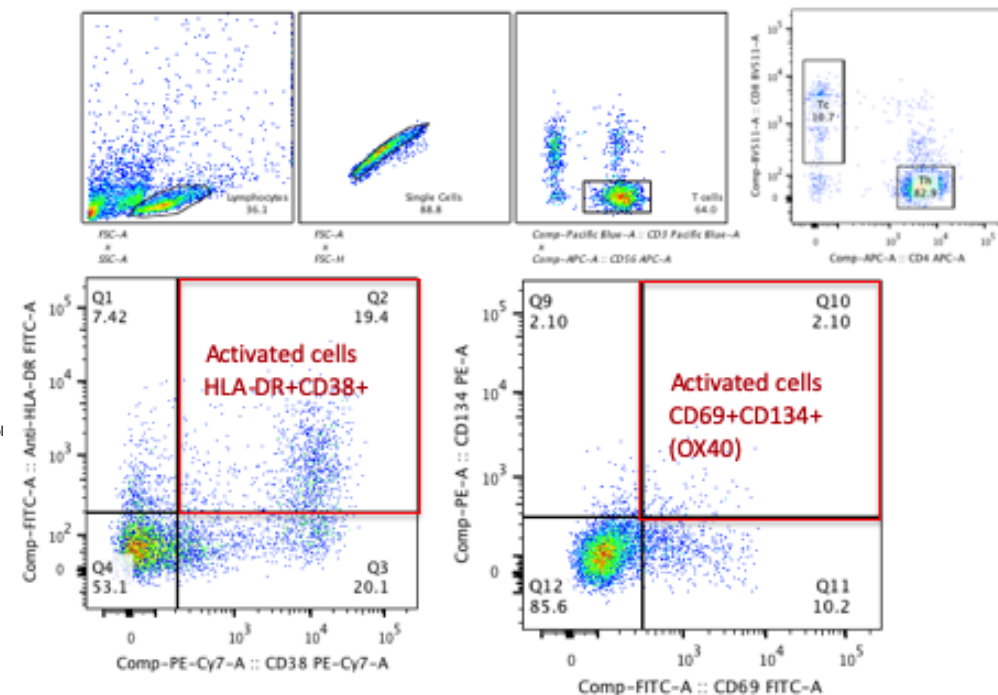
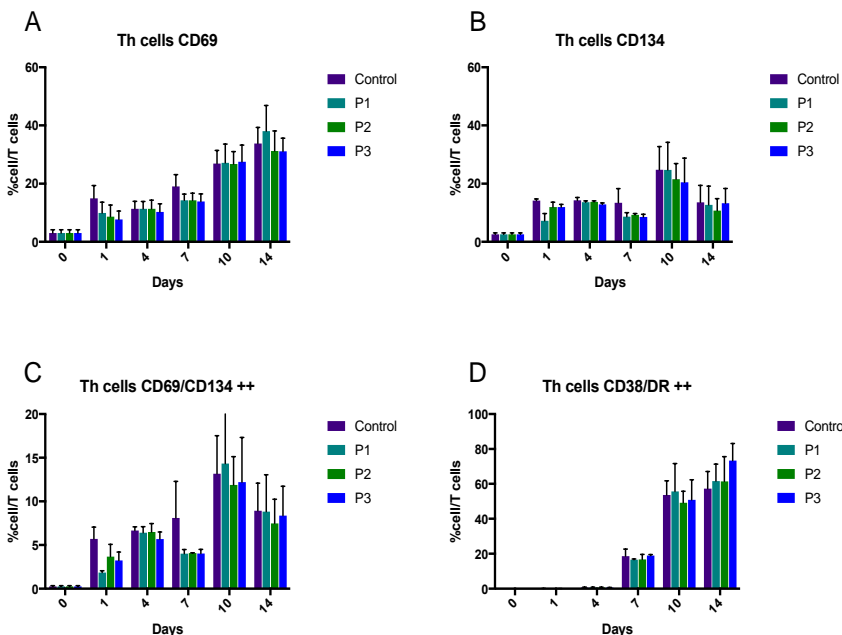
C-ImmSim include următoarele ipoteze de lucru sau teorii:

1. Diversitatea elementelor specifice
2. Procesarea și prezentarea antigenică
3. Restricționarea MHC
4. Cooperarea intercelulară
5. Maturarea răspunsului imun și memoria imună
6. Selecția clonală indusă de afinitatea antigenului
7. Educarea limfocitelor T la nivel timic (teoria deleției clonale)
8. Hipermutațiile care apar la moleculele imunoglobulinice
9. Limita Hayflick (senescența replicativă a limfocitelor T)
10. Toleranța indusă de doza de antigen la nivelul limfocitelor B (anergie)
11. Anergia limfocitelor T
12. Semnalele de pericol Matzinger
13. Teoria rețelei idiotip-anti-idiotip



Rezultate

Teste de stimulare a celulelor sistemului imun – teste *in vitro*

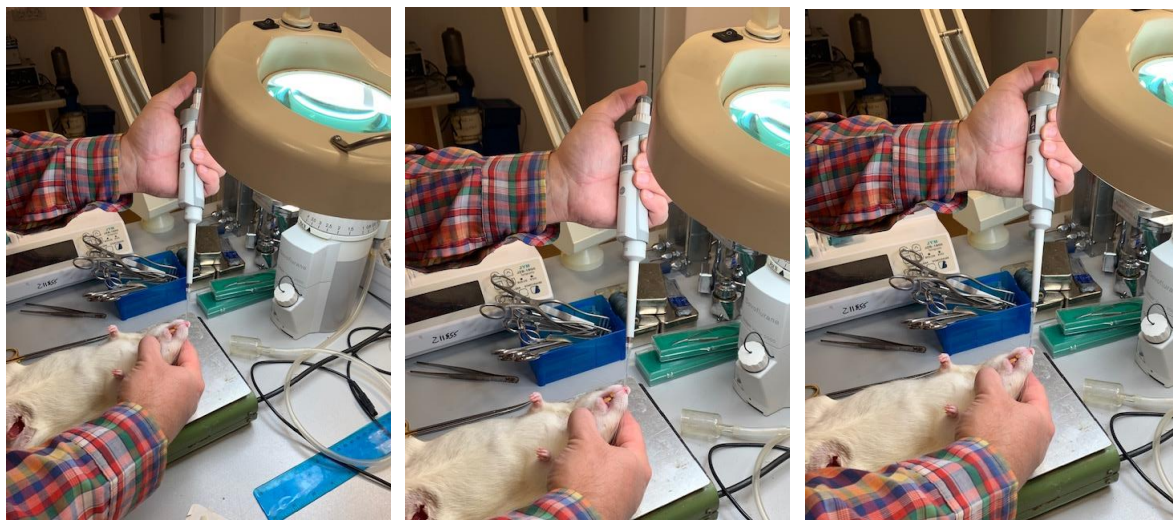


Strategia de gating pentru identificarea răspunsului celulelor T helper și T citotoxice la stimularea cu peptidele din componența vaccinului. Din populația de limfocite au fost excluse dubletele, apoi limfocitele T a fost identificate pe baza expresiei CD3 și absența CD56, fiind excluse din analiză celulele NKT. Celulele T helper și T citotoxice au fost identificate din populația de limfocite T prin expresia coreceptorilor CD4, respectiv CD8. Activarea celulelor în prezența de peptide stimulative a fost măsurată ca procent de celule dublu pozitive CD69+CD134+ sau HLA-DR+CD38+.

DECODE

Rezultate

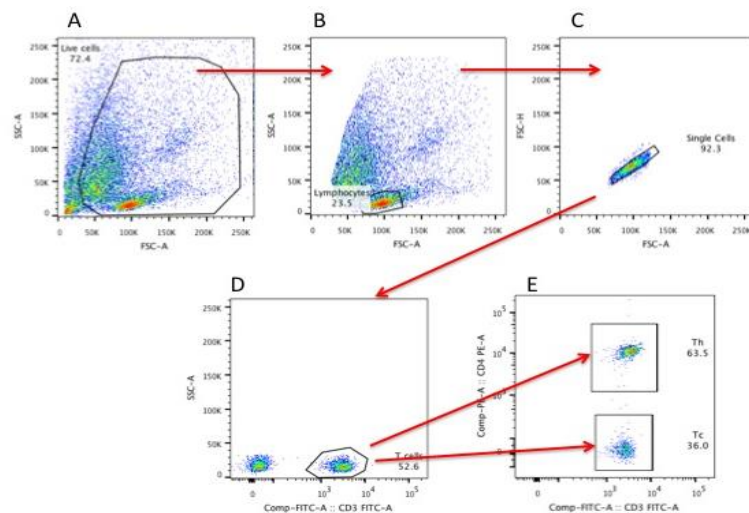
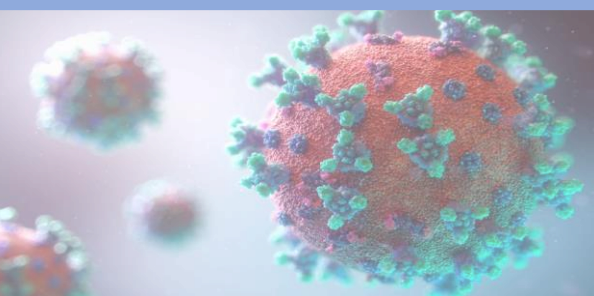
Teste de toxicitate pe model animal – teste *in vivo*



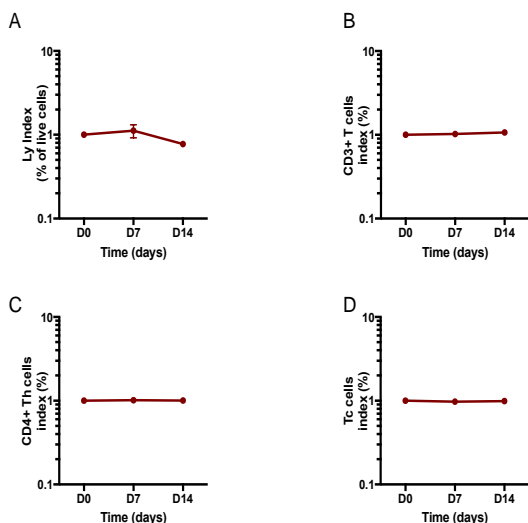
Aspecte din timpul anesteziei și administrării intranazale a produsului specific loturilor de control și experimentale de șobolani Wistar



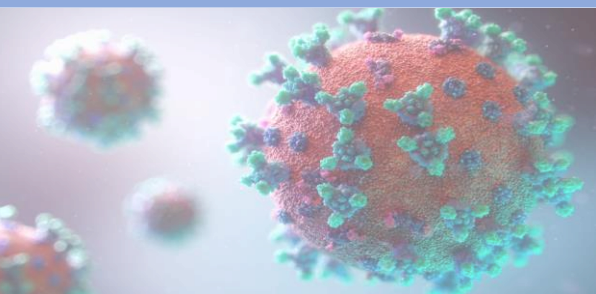
Aspectul splinei excizate chirurgical de la cele 2 loturi de șobolani.



Analiza statusului imun la șobolani, înainte și la 7, respectiv 14 zile de la administrarea amestecului de SLP. Au fost urmărite modificări la nivelul populației de limfocite în ansamblu (A), dar și în cadrul limfocitelor T (B) și subpopulațiilor de limfocite T helper (C) și T citotoxice (D). Aceste modificări au fost apreciate pe baza unui index calculat ca raport între procentul de celule înainte de stimulare (ziua 0) și procentul de celule după stimulare, pentru fiecare animal în parte.



DECODE



Rezultate

1. Secvențe *in silico* de aminoacizi pentru 10-12 peptide specifice pentru activarea limfocitelor T și B
2. Obținerea peptidelor vaccinale purificate și liofilizate
3. Protocoale izolare și stocare celule din sângele periferic
4. Rapoarte calitative și cantitative PBMC
5. Raport calitativ și cantitativ markeri flowcitometrici
6. Raport viabilitate celulară
7. Raport proliferare celule imune
8. Raport evaluare parametri biologici model animal
9. Documentație preliminară studiu clinic faza I

Publicații/Brevete

1. Păunescu V. Nouă platformă de vaccinare pentru COVID-19. Al XIII-lea Congres Național al Societății Române de Fiziologie, 22-24 Octombrie 2020, prezentare orală, www.fiziologie2020.ro
2. Bojin F, Tîrziu A, Gavriiliuc O, Păunescu V. paradigm shift in vaccine strategy – synthetic long peptides (SLPs). A 4-a Conferință a Asociației Române de Imuno-Dermatologie, A 49-a Conferință a Societății de Imunologie din România, 30 Septembrie-03 Octombrie 2020, eveniment onsite și online, prezentare orală.
3. Bojin F, Gavriiliuc O, Margineanu M, Paunescu V. Design of an Epitope-Based Synthetic Long Peptide Vaccine to Counteract the Novel China Coronavirus (2019 nCoV). *Preprints* 2020, 2020020102
4. Ordodi LV, Dumitrel GA, Pană AM, Todea A, Mățiu-Iovan L, Ionel RC, Săndesc D, Bedreag OH, Păpurică M, Rogobete AF, Simion I, Motica A, Groapă DS, Păunescu V, Bojin MF, Gavriiliuc OI. „Dispozitiv pentru reducerea încărcăturii microbiologice a aerului expirat de pacienții ventilați mecanic”, nr. A/00280/2020, data de depozit 22/05/2020, Oficiul de Stat pentru Invenții și Mărci (OSIM), Direcția de brevete de invenție și informații tehnologice.