



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2020 00296

(22) Data de depozit: 28/05/2020

(41) Data publicării cererii:
30/12/2021 BOPI nr. 12/2021

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA (UMF-IH),
STR. VICTOR BABEȘ NR. 8,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• CHIRA SERGIU, STR.PRIMĂVERII, NR.4,
AP.363, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• NEAGOE IOANA CORNELIA STANCA,
STR.NICOLAE TITULESCU, NR.2, AP.57,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CISMARU COSMIN-ANDREI,
STR. RODNEI, NR.44, BL.A, AP.67,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) SISTEM DE NANOPARTICULE BAZATE PE ADN
PLASMIDIAL RECOMBINAT PENTRU PROFILAXIA
INFECȚIEI CU CORONAVIRUSUL SARS-COV-2

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un sistem de nanoparticule bazate pe ADN plasmidial (ADNp) recombinat pentru imunizare la infecția cu coronavirusul SARS-COV-2. Sistemul, conform invenției, este compus din nanoparticule de ADNp recombinat cu o secvență de consens pentru antigenul viral spike, și gene raportor pentru evaluare preclinică pe culturi celulare și modele *in vivo*. Moleculele de ADNp sunt complexate cu adjuvanți

cationici biocompatibili de tip Vaxfectin, Chitosan și Protamina Manozilată pentru administrarea la nivelul mucoasei nazale și epitelului pulmonar pe animale experimentale.

Revendicări: 4
Figuri: 3



AGENȚIA DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2020 0296
Data depozit 2.8.05.2020	

Sistem de nanoparticule bazate pe ADN plasmidial recombinat pentru proxilaxia infecției cu coronavirusul SARS-CoV-2

1. Domeniul de aplicare al invenției

Prezenta invenție descrie un nou **concept biotehnologic** de profilaxie pentru prevenirea infecției cu noul coronavirus SARS-CoV-2 prin dezvoltarea unui vaccin ADN plasmidial recombinat cu un antigen viral pentru imunizare. Prin administrarea acestuia la nivelul tractului respirator se va obține stimularea unui răspuns imun pentru producerea de anticorpi anti-SARS-CoV-2, care va oferi o protecție ulterioară împotriva infecției cu acest tip de coronavirus.

2. Stadiul actual al cunoașterii/al tehnicii mondiale

Noul coronavirus SARS-CoV-2, identificat ca având originea în orașul Wuhan - Provincia Hubei a Republicii Populare Chineze, a provocat o pandemie la nivel mondial în numai patru luni de la declanșare, afectând peste 212 de țări. Numărul de cazuri identificate până în momentul depunerii brevetului de față, se ridică la aproximativ 3.600.000 de pacienți la nivel mondial, cu un număr de peste 250.000 de decese raportate (<https://www.worldometers.info/coronavirus/#countries>). Aceste cifre alarmante au generat o serie de măsuri la nivel mondial care să oprească răspândirea noului coronavirus în populațiile umane. Timpul scurt de reacție a sistemului de sănătate nu a permis stabilirea unui protocol standardizat de tratament, fiind bazat pe diverși compuși terapeutici pentru alte afecțiuni virale sau non-virale, prin care se țintesc diferite mecanisme ale ciclului de viață ale SARS-CoV-2 [1].

Cu toate că măsurile foarte restrictive de ordin social aplicate de mai multe guverne ale lumii pot limita diseminarea virusului SARS-CoV-2 în populația umană, pe termen lung aceste măsuri vor avea un puternic negativ asupra economiei globale. Astfel că, pe termen lung, o soluție de ordin medical este necesară pentru a gestiona pandemia produsă de SARS-CoV-2 și limita numărul de noi cazuri. Până în prezent, vaccinurile ofera cea mai eficientă cale de prevenție prin imunizarea populației umane la diferiți agenți patogeni [2].

3. Limitările soluțiilor actuale la problema identificată

Modalitatea de vaccinare larg utilizată în uz clinic este administrarea de virus inactivat sau atenuat, grupându-se în vaccinuri de primă generație [3]. Obținerea unor astfel de vaccinuri

necesită multiplicarea agentului patogen, pentru a genera cantități suficiente de vaccinuri pentru imunizare. Această metodă poate întâmpina anumite limitări, ca și fabricarea rapidă și distribuția la nivel global, pentru a limita consecințele provocate de o pandemie cu rata de diseminare rapidă ca și COVID-19. Din punct de vedere tehnic, manipularea unui agent cu risc biologic ridicat necesită o infrastructură avansată pentru manipularea în siguranță a agentului patogen și producerea lui la scară industrială [4]. Din punct de vedere economic, această metodă presupune un cost ridicat al produsului final, la care țările defavorizate, subdezvoltate sau în curs de dezvoltare nu vor avea putea avea acces imediat.

4. Potențiale strategii pentru profilaxia infecției cu noul coronavirus SARS-CoV-2

O clasă emergentă de vaccinuri o reprezintă cele bazate acizi nucleici, care codifică informația genetică pentru un antigen viral, care ulterior sunt transferați în celule țintă unde vor exprima antigenul viral. Acest proces va conduce la stimularea unui răspuns imun și producerea de anticorpi împotriva particulelor infecțioase ce conțin respectivul antigen. În funcție de structura acizilor nucleici folosiți pentru vaccinare, aceștia pot fi de tipul ARN mesager (ARNm) și ADN plasmidial. Acest tip din urmă de acizi nucleici sunt molecule dublu-catenare de ADN circular plasmidial (ADNp) derivat din bacterii, fiind larg utilizate în diverse aplicații biotehnologice și biomedicale. În contrast, ARNm este obținut ca și o moleculă sintetică monocatenară in vitro, utilizând o matriță liniară de ADN care codifică informația genetică care va fi transcrisă, precursori nucleotidici și o ARN transcriptază [5]. Din punct de vedere tehnic, un avantaj major al vaccinurilor bazate pe ADNp este posibilitatea de a fi introdus în modelul bacterian *Escherichia coli*, unde poate fi amplificat la scară industrială, fără costuri ridicate, necesitând un mediu de creștere simplu și un bioreactor de producție [6]. În plus, stabilitatea ADNp este superioară celor axate pe ARNm [5], iar riscul de reinfectare este eliminat comparativ cu vaccinurile convenționale care folosesc virusuri inactivate, a căror producție este și costisitoare [7] [8].

5. Scopul invenției și soluția oferită la problema stadiului actual al profilaxiei infecției cu SARS-CoV-2

În contextul pandemiei mondiale COVID-19 provocată de noul coronavirus SARS-CoV-2, dezvoltarea unui vaccin eficient cu stabilitate crescută și costuri de producție reduse este

necesară pentru oprirea apariției de noi cazuri de COVID-19 și, implicit, al deceselor cauzate de această maladie infecțioasă, care au solicitat serviciile medicale de terapie intensivă la limita capacității existente.

În invenția de față propunem un model de vaccin bazat pe ADNp recombinant cu antigenul proteinei virale “spike” responsabilă de legarea de receptorul ACE2 al celulelor epiteliale din tractului respirator. Modelul experimental de imunizare descris implica folosirea unor compusi biocompatibili adjuvanti pentru complexarea ADNp în nanoparticule cu potential de imunizare superioara fata de ADNp administrat ca atare. De asemenea, designul tehnic permite extrapolarea și scurtarea timpului de producție fără costuri asociate crescute, un factor cheie în gestionarea rapidă a pandemiei de COVID-19.

6. Descrierea detaliată a invenției

Construcția vaccinului ADNp pentru profilaxia infecției cu SARS-CoV-2 cuprinde atât elemente genetice pentru selecția și amplificarea în *Escherichia coli*, cât și elemente genetice pentru exprimarea antigenului viral al proteinei “spike” în celule epiteliale ale tractului respirator (Figura 1). Elementele necesare propagării în *Escherichia coli* includ, și nu sunt limitate, la originea replicării pUC-ORI și o genă de rezistență la Kanamicina (KmR) pentru selecția bacteriilor care conțin acest plasmid (Figura 1). Unitatea transcripțională pentru antigenul viral “spike protein” este compusă, și nu este limitată la acesta, de un promotor de origine virală derivat de la virusul citomegalic (CMV-P) care prezintă o activitate elevată în celulele eucariote. Includerea unui intron, spre exemplu intronul 2 al genei umane pentru β -globina și nu este limitată la acesta, la capatul 5' al secvenței antigenului viral conduce la eficientizarea transcrierii secvenței codificatoare. Proteina antigenica virala “spike” este co-exprimată cu o proteina raportor fluorescentă, spre exemplu eGFP (enhanced green fluorescent protein) și nu este limitată la aceasta, prin intermediul unei secvențe peptidice scurte cu proprietăți autocatalitice (P2A). Acest design permite evaluarea eficienței transfectiei celulelor țintă prin microscopie confocală și citometrie în flux (FACS) pentru proteina raportor fluorescentă. În plus, prezența semnalului proteinei fluorescente evidențiază indirect și exprimarea proteinei virale “spike”, fiind co-exprimată cu proteina fluorescentă pe același polipeptid, care ulterior este clivat la nivelul secvenței P2A. Semnalul de poliadenilare BGH pA (bovine growth hormone) și nu este limitat la acesta, aduce un plus pentru obținerea unui nivel elevat de exprimare a antigenului

viral. Vectorul plasmidial mai cuprinde în construcția sa și o genă raportoare pentru bioluminiscenta, ca și fLuc (firefly luciferase) și nu este limitat la aceasta, pentru evaluări prin imagistica *in vivo* pe modele animale.

ADNp recombinant cu antigenul viral proteina “spike” este complexat și condensat în nanoparticule prin utilizarea a trei agenți cationici și nu este limitat la aceștia, un lipid cationic Vaxfectin, un polimer cationic Chitosan și un peptid cationic Protamina manozilata (Figura 2). Aceste sisteme de nanoparticule sunt utilizate pentru validarea *in vitro* pe culturi de celulele epiteliale umane derivate din tractul respirator, a eficienței internalizării nanoparticulelor în celule prin microscopie confocala cu fluorescență și analiza de citometrie în flux (FACS). Pentru determinarea cantitativă a exprimării antigenului viral “spike protein” în funcție de sistemul de nanoparticule testat, se folosește metoda ELISA.

Pentru validarea sistemelor de nanoparticule pe modele animale, suspensiile de nanoparticule sunt administrate pe cale intra-nazală sau pulmonară prin aerosolizare, la animale experimentale imunocompetente, cum ar fi de exemplu iepuri, sobolani sau soareci (Figura 3). Biodistribuția prin internalizarea complexelor de nanoparticule la nivelul celulelor epiteliale ale tractului respirator se evidențiază prin imagistica *in vivo* pe sistem IVIS, prin măsurarea intensității semnalului de bioluminiscenta a genei raportoare. Pentru determinarea cantitativă de anticorpi anti-spike protein se recoltează sânge de la animalele testate, și se efectuează testul ELISA pe plasmă.

7. Avantajele modelului experimental prezentat în invenție

Prezenta invenție aduce un aport științific și practic în dezvoltarea de vaccinuri inovative pentru profilaxia infecției cu noul coronavirus SARS-CoV-2 și implicit a mortalității asociate acestei pandemii COVID-19. Modelul experimental descris prezintă versabilitate prin posibilitatea de extrapolare a producției la scară industrială într-un interval relativ scurt și cu costuri reduse, astfel încât și impactul la nivel social și economic să fie maximizat. Metodele tradiționale pentru obținerea de vaccinuri axate pe virusuri inactivate presupun costuri ridicate și o infrastructură avansată pentru multiplicarea virusului în condiții de securitate rigide. Un alt avantaj al modelului descris în prezenta invenție este stabilitatea datorată naturii fizice a produsului final, având în vedere că ADNp este capabil să-și pastreze proprietățile biologice pentru o perioadă îndelungată de timp la temperatura ambiantă.

8. Modul de realizare a invenției

În prima etapă este generată o secvență de consens pentru regiunea din genomul coronavirusului SARS-CoV-2 care codifică proteina “spike” responsabilă pentru atașarea de receptorul ACE2 de pe membrana celulelor epiteliale ale tractului respirator. Acest pas este realizat prin extragerea din bazele de date existente a secvenței proteinei “spike” a tulpinilor virale circulante. Secvențele sunt importate în programul de analiză bioinformatică vector NTI (Invitrogen) și secvența de consens este generată prin utilizarea modului de aliniere a secvențelor importate. În acest fel, se va obține un antigen viral pentru imunizare care va acoperi ca și aplicabilitate și specificitate un număr mai ridicat de tulpini virale circulante, comparativ cu utilizarea secvenței derivate de la o singură tulpină de virus. Fragmentul de ADN care va codifica secvența de consens a proteinei “spike” este sintetizat sub forma unui “DNA block” de către o companie specializată care ofera astfel de servicii custom-made.

Construcția vectorului ADN plasmidial destinat pentru clonarea secvenței de consens a proteinei “spike” este făcută inițial in silico cu ajutorul programului Vector NTI (Invitrogen), iar secvența obținută este adnotată pentru elementele genetice constitutive (Figura 1). Vectorul plasmidial în sine este comandat ca și ADNp dublu-catenar la o companie specializată care ofera servicii custom-made de construcție de vectori pe baza secvenței furnizate de către solicitant. Clonarea secvenței de consens pentru proteina spike a SARS-CoV-2 este realizată “in-house” prin metoda de clonare Gibson, care asigură inserarea corectă și eficientă a fragmentului de ADN clonat în vectorul plasmidial destinat. ADNp recombinant cu antigenul viral este introdus prin metode de transformare chimică de celule competente de *Escherichia coli*, de unde prin cultivare la un volum ridicat de mediu minimal LB se poate obține o cantitate de ordinul miligramelor de vector folosind kituri de extracție de tipul maxiprep și urmând standardele de puritate recomandate de FDA în cazul vaccinurilor ADN pentru profilaxia bolilor infecțioase (<https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/considerations-plasmid-dna-vaccines-infectious-disease-indications>).

Obținerea de nanoparticule compuse din vectorul plasmidial și Vaxfectin, Chitosan și Protamina manozilată se va face urmând recomandările producătorilor pentru cei trei agenți adjuvanți și studierea literaturii de specialitate. Caracterizarea nanoparticulelor din punct de vedere fizic, se face cu aparatul de analiză NanoSight NS300 (Malvern Panalytical) pentru determinarea diametrului nanoparticulelor și concentrației acestora. Caracterizarea funcțională

din punct de vedere biologic se realizează pe culturi celulare umane imortalizate, și se urmărește eficiența internalizării nanoparticulelor în celule prin microscopie de fluorescență și citometrie de flux (FACS) pentru gena raportor, ca și eGFP. Identificarea și determinarea nivelului de expresie a antigenului viral de care celulele transfectate este efectuată prin testul ELISA (Figura 2).

Evaluarea potențialului imunogenic al nanoparticulelor de ADNp este efectuată pe animale experimentale de dimensiuni mai mari, spre exemplu iepuri imunocompetenți, pentru ca administrarea suspensiei de nanoparticule pe cale intranasală și pulmonară prin nebulizare să fie facilă din punct de vedere tehnic. La 48-72 de ore de la administrarea nanoparticulelor se va recolta sange și se vor face determinări cantitative prin testul ELISA pentru anticorpi anti-spike, care vor indica eficiența imunizării cu sistemele de nanoparticule testate. În plus, designul nanoparticulelor de ADNp permite și evidențierea distribuției nanoparticulelor în tractul respirator prin bioluminescența pe sistem IVIS (Figura 3).

9. Aplicabilitatea invenției prezentate

Invenția de față, prin caracteristicile sale poate constitui o bază preclinică pentru dezvoltarea de strategii profilactice pentru pandemia generată de noul coronavirus SARS-CoV-2 prin imunizare cu vaccinuri disponibile la costuri reduse și cu profil de siguranță superior celor convenționale, capabile de a oferi imunitate pentru un număr ridicat de tulpini virale circulante în populația umană. Datorită stabilității fizice și biologice a preparatelor de vaccinare bazate pe astfel de sisteme de nanoparticule, disponibilitatea lor în zone cu acces limitat la infrastructura de depozitare și conservare a produselor farmaceutice perisabile este astfel îmbunătățită.

Referințe:

1. Li, G. and E. De Clercq, *Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV)*. Nat Rev Drug Discov, 2020. **19**(3): p. 149-150.
2. Hobernik, D. and M. Bros, *DNA Vaccines-How Far From Clinical Use?* Int J Mol Sci, 2018. **19**(11).
3. Soltani, S., et al., *DNA vaccine: Methods and mechanisms*. Advances in Human Biology, 2018. **8**: p. 132.
4. Artika, I.M. and C.N. Ma'roef, *Laboratory biosafety for handling emerging viruses*. Asian Pac J Trop Biomed, 2017. **7**(5): p. 483-491.
5. Liu, M.A., *A Comparison of Plasmid DNA and mRNA as Vaccine Technologies*. Vaccines (Basel), 2019. **7**(2).
6. Chartrain, M., *The Production of Plasmid DNA Vaccine in Escherichia coli: A Novel Bacterial-Based Vaccine Production Platform*. Vaccine Development and Manufacturing, 2014: p. 25-49.
7. Delrue, I., et al., *Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: merits, risks and challenges*. Expert Rev Vaccines, 2012. **11**(6): p. 695-719.
8. Oyston, P. and K. Robinson, *The current challenges for vaccine development*. J Med Microbiol, 2012. **61**(Pt 7): p. 889-894.
9. Raiz, J., et al., *The non-autonomous retrotransposon SVA is trans-mobilized by the human LINE-1 protein machinery*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(4): p. 1666-83.
10. Chira, S., et al., *Restoring the p53 'Guardian' Phenotype in p53-Deficient Tumor Cells with CRISPR/Cas9*. Trends Biotechnol, 2018. **36**(7): p. 653-660.
11. Chira, S., et al., *Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 30675-703.
12. Chira, S., et al., *CRISPR/Cas9: Transcending the Reality of Genome Editing*. Mol Ther Nucleic Acids, 2017. **7**: p. 211-222.
13. Yew, N.S., et al., *Optimization of plasmid vectors for high-level expression in lung epithelial cells*. Hum Gene Ther, 1997. **8**(5): p. 575-84.

REVENDICĂRI

1. Un model experimental de vaccin ADN plasmidial recombiat pentru imunizare la infecția cu coronavirusul SARS-CoV-2 prin exprimarea unui antigen viral constituit din secvența de consens a proteinei spike generată din analiza genomurilor circulante de SARS-CoV-2.
2. Un plasmid care conține elemente genetice pentru multiplicarea în *Escherichia coli* și o unitate transcripțională pentru antigenul viral de la revendicarea 1.
3. Un plasmid care prezintă gene raportor de fluorescență și bioluminescență în construcția plasmidului de la revendicarea 2.
4. Sistem de nanoparticule compuse din ADN plasmidial de la revendicarea 3 și trei agenți cationici adjuvanți, care includ și nu se limitează la Vaxfectin, Chitosan și Protamina manozilată.

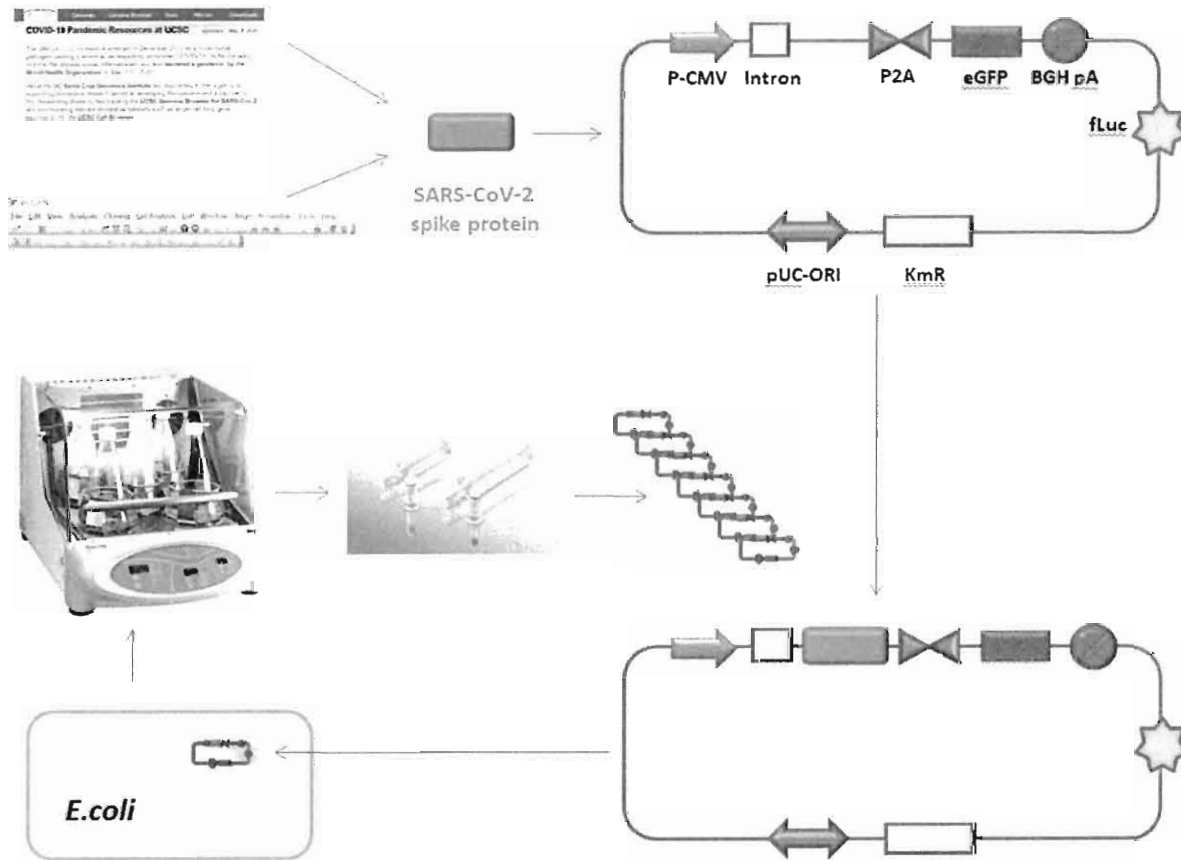


Figura 1. Reprezentare schematica a constructiei si multiplicarii vectorului plasmidial ADN pentru dezvoltarea unui model experimental de imunizare prin vaccinare in profilaxia COVID-19. Prin extragerea secventelor nucleotidice a tulpinilor de coronavirus SARS-CoV-2 din bazele de date genomice si analiza bioinformatica cu un soft dedicat se genereaza secventa de consens pentru proteina „spike” a anvelopei virale. Acesta secventa este folosita pentru sinteza unui fragment de ADN ce codifica astfel antigenul viral pentru imunizare. Acest fragement de ADN este clonat intr-un vector destinat pentru exprimarea antigenului viral. Vectorul plasmidial este constituit din elemente genetice pentru selectia si amplificarea in *Escherichia coli*, mai specific o origine a replicarii pUC-ORI si o gena de rezistenta la Kanamicina (KmR) pentru selectia bacteriilor care contin acest plasmid. Unitatea transcriptionala pentru antigenul viral este compusa dintr-un promotor de origine virala derivat de la virusul citomegalic (CMV-P) care prezinta o activitate elevata in celulele eucariote. Includerea unui intron mareste eficienta exprimarii antigenului viral, transcrierea si “splicing-ul” fiind doua procese cuplate. Proteina antigenica

virala “spike” este co-exprimata cu proteina raportor eGFP (enhanced green fluorescent protein) prin intermediul unei secvente peptidice scurte cu proprietati autocatalitice (P2A). Acest design permite evaluarea eficientei transfectiei celulelor tinta prin detectia de eGFP. In plus, prezenta semnalului fluorescent eGFP in celule evidentiaza indirect si exprimarea proteinei virale “spike”. Semnalul de poliadenilare derivat de la hormonul de crestere bovin (BGH pA) aduce un plus pentru obtinerea unui nivel elevat de exprimare a antigenului viral. Vectorul plasmidial recombinant cu antigenul viral este introdus in Escherichia coli, unde este amplificat prin cultivarea pe mediu minimal de selectie la Km. Plasmidul este extras din aceste culturi prin metode cromatografice (colonitele albastre) pentru obtinerea de ADN plasmidial cu grad de puritate ridicat.

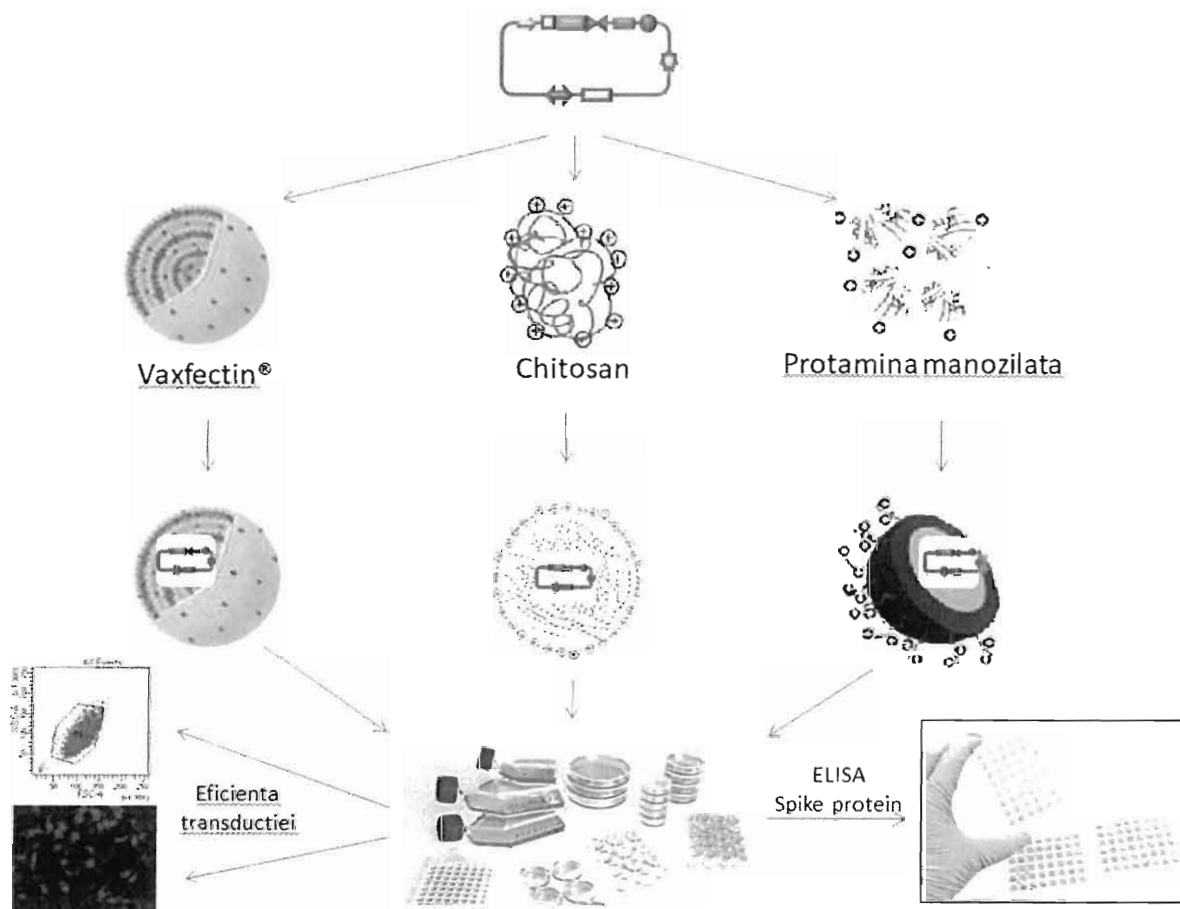


Figura 2. Obținerea de sisteme de nanoparticule de ADNp recombinat cu antigenul viral. Prin complexarea cu agenții adjuvanți cationici Vaxfectin, Chitosan și Protamina Manozilata se obțin nanoparticule care sunt caracterizate pe culturi celulare prin microscopie confocală și citometrie de flux (FACS) pentru eGFP în vederea determinării eficienței internalizării nanoparticulelor în celule. Pentru evaluarea cantitativă a nivelului de exprimare a antigenului viral spike protein se folosește testul ELISA.

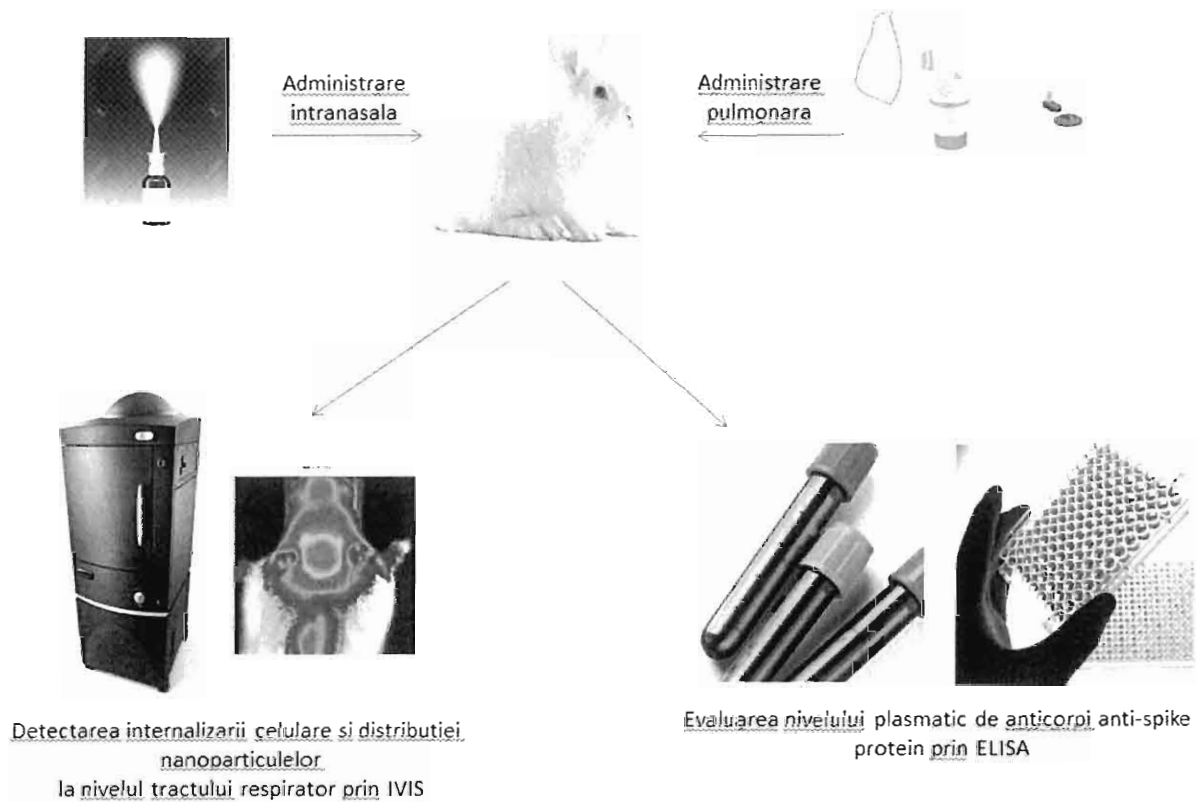


Figura 3. Evaluarea potentialului imunogenic al nanoparticulelor de ADNp recombinat cu antigenul viral pe animale experimentale. Nivelul ridicat de vascularizatie de la nivelul mucoasei nazale si alveolelor pulmonare permite administrarea locala a nanoparticulelor pentru generarea unui raspuns imun. Ulterior administrarii se poate evidientia distributia nanoparticulelor la nivelul tractului respirator prin bioluminiscenta cu sistem IVIS (in vivo imaging system). Detectia cantitativa a nivelului plasmatic de anticorpi anti-spike protein se face cu testul ELISA pe sangele recoltat de la animalele tratate.