



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00005**

(22) Data de depozit: **20/01/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/05/2022 BOPI nr. **5/2022**

(71) Solicitant:
• **SPITALUL CLINIC JUDEȚEAN DE
URGENTĂ "PIUS BRÎNZEU" TIMIȘOARA,**
BD. LIVIU REBREANU NR.156, TIMIȘOARA,
TM, RO

(72) Inventatori:
• **BOJIN MARIA FLORINA,**
BD.16 DECEMBRIE 1989, NR.61, AP.11,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• **GAVRILIUC OANA- ISABELLA,**
STR.MARTIR IOAN MERIUȚAC, BL.B27,
SC.A, AP.3, TIMIȘOARA, TM, RO;
• **ORDODI LAURENȚIU VALENTIN,**
STR.BUREBISTA, NR.10, ET.7, AP.25,
TIMIȘOARA, TM, RO;

• **SĂLĂGEAN ANDREAS OVIDIU,**
STR.VICENȚIU CERNEȚ, NR.15A,
MOȘNIȚA VECHIE, TM, RO;
• **TÎRZIU ALEXANDRU,** STR.DREPTATEA,
NR.16, AP.11, TIMIȘOARA, TM, RO;
• **PANAITESCU CARMEN,**
BD.TAKE IONESCU, NR.41, AP.1,
TIMIȘOARA, TM, RO;
• **PĂUNESCU VIRGIL,**
STR.TREBONIU LAURIAN, NR.7, AP.2,
TIMIȘOARA, TM, RO

(74) Mandatar:
**CABINET DE PROPRIETATE
INDUSTRIALĂ TUDOR ICLĂNZAN,**
PIAȚA VICTORIEI NR.5, SC.D, AP.2,
TIMIȘOARA, TM

(54) **PRODUS ȘI METODĂ PE BAZĂ DE PEPTIDE LUNGI
SINTETICE PENTRU PREVENȚIA INFECȚIEI CU SARS-CoV-2**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o metodă de obținere a unui amestec de peptide lungi sintetice (SLPs) pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2. Metoda, conform invenției constă în etapele: identificarea epitopilor imunogenici din structura SARS-CoV-2 pe baza prezentării specifice de către moleculele MHC, generarea peptidelor lungi sintetice formate din 2 epitopi, unul specific pentru MHC clasa I (9AA), și unul specific pentru MHC clasa II (15AA) legați printr-un linker de 6AA, testarea *in silico*,

in vitro și *in vivo* a toxicității amestecului SLPs, respectiv, testarea eficacității SLPs de a genera răspuns imun celular (limfocite Th și Tc) *in vitro* (pe culturi celulare) și *in vivo* (pe model animal), prin aplicare intranasală, sub formă solubilizată în vitamina A uleioasă.

Revendicări: 2
Figuri: 24

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI
Cererea de brevet de invenție
Nr. a 2022 00005
Data depozit 20-01-2022

1

PRODUS SI METODA PE BAZA DE PEPTIDE LUNGI SINTETICE PENTRU PREVENȚIA INFECȚIEI CU SARS-CoV-2

Invenția se încadrează în domeniul medicinei în general și a mijloacelor de prevenție împotriva infecției cu SARS-CoV-2 în special.

Pandemia COVID-19 continuă să se răspândească rapid în rândul populației susceptibile, totalizând peste 300 milioane de cazuri confirmate de infecție și mai mult de 5,5 milioane decese, rezultând într-o destructurare economică globală din care ne putem reveni doar prin asigurarea imunității populației cu ajutorul unor vaccinuri sigure și eficiente.

Cadrul pandemiei actuale de COVID-19 a dus la dezvoltarea rapidă a platformelor non-convenționale de vaccinare, pe bază de RNA, DNA, vectori virali, vaccinuri proteice, dar și a celor clasice, care utilizează virusul SARS-CoV-2 în forma atenuată sau inactivată. Majoritatea companiilor farmaceutice care se află în studii clinice avansate cu produsele vaccinale dezvoltate utilizează ca antigen specific pentru stimularea sistemului imun proteina S din structura SARS-CoV-2 [1].

Design-ul unui vaccin implică selecția unei structuri antigenice virale capabile să declanșeze un răspuns imun, alegerea unei platforme prin care se face imunizarea, a unei căi și a unui regim de administrare. În contextul necesității actuale, a fost propusă o nouă paradigmă de dezvoltare a unui vaccin în care timpul de testare este comprimat de la 10-15 ani la 1-2 ani, cu fazele preclinică, clinică și de producție desfășurându-se în paralel. În prezent sunt aprobate pentru uz clinic în cel puțin una dintre țări 33 de vaccinuri, 137 propuneri de vaccin sunt în dezvoltare clinică și 194 sunt în stadiul de dezvoltare pre-clinică, conform WHO la data de 13.01.2022 [1].

Dintre propunerile de vaccin anti-SARS-CoV-2 aflate în fază clinică, 47 se bazează pe subunități proteice (35% din totalul vaccinurilor candidate din fază clinică). Între propunerile de vaccin aflate în fază pre-clinică, pe lista WHO se află și vaccinul peptidic propus de echipa prezentei invenții -Synthetic long peptide vaccine candidate for S and M proteins [1,2].

Proteina S (spike) este una dintre cele patru proteine structurale ale SARS-CoV-2 și este responsabilă de pătrunderea virusului în celulele umane prin interacțiunea cu receptorul celular hACE2 la nivelul regiunii RBD (receptor binding domain), urmată de clivarea proteinei S și fuziunea virusului cu membrana celulară. Datorită acestui rol important în patogeniza virală, am ales proteina S drept țintă pentru vaccinare.

Vaccinurile existente la acest moment în uz clinic în întreaga lume au dovedit eficacitatea diferitelor tehnologii utilizate prin existența și persistența răspunsului imun umoral (IgG) și, indirect, a răspunsului imun celular, evaluând mai degrabă nespecific imunitatea celulară indusă de limfocitele T citotoxice (CD8+).

Este cunoscut Studiu clinic de fază I asupra vaccinului mRNA-1273, Moderna; New England Journal of Medicine, Nov. 2020 [4]. La 43 zile de la vaccinare, PBMC stimulate cu peptide Spike, prezintă intracelular citokine de tip Th1 (TNF α >IL-2>IFN γ), dar nu de tip Th2 (IL-4 și IL-13); < 0.2% din totalul limfocitelor T helper; titrul de anticorpi neutralizanți IgG se menține ridicat după 57 zile de la vaccinare; <<< 0,2% răspuns imun prin limfocite T citotoxice.

Este cunoscut Studiu clinic de fază I/II asupra vaccinului BNT162b1, Pfizer Biontech; Nature, Oct. 2020 [5]. În acest studio, la 7 zile de la rapel, PBMC stimulate cu peptide RBD, prezintă intracelular citokine de tip Th1; răspunsul imun celular prin CD8+ este <0,1%, iar răspunsul imun este robust prin anticorpi după vaccinare.

La pacienți COVID-19 convalescenți, titrul anticorpilor specifici scade în timp de la ziua 30 (V1) la ziua 100 (V2) conform Rodda et al., 2020 [6]. Nelde A, et al. [7] arată că limfocitele T specifice anti-SARS-CoV-2 sunt aproximativ 0,3% (CD4+) și respectiv 0,28% (CD8+) și că 10/18 pacienții seronegativi prezintă limfocite T specifice.

Swandling L, et al., Nature 2021 [8] (<https://doi.org/10.1038/s41586-021-04186-8>) descrie o subpopulație de limfocite T polimerază-specifice pre-existente care este responsabilă de vindecarea infecțiilor sub-clinice la pacienții seronegativi infectați cu SARS-CoV-2 și propune ca aceste limfocite să fie utilizate în abordări ulterioare legate de vaccinarea anti-COVID-19 sau împotriva altor infecții emergente cu Coronaviridae.

Schulien I, et al. [9] elaborează un studiu referitor la limfocitele T CD8+, care sunt reprezentate la 70% dintre indivizii convalescenți după infecția cu SARS-CoV-2, ținând diferite proteine virale. Cu toate că aceste limfocite sunt într-o proporție crescută, nu se cunoaște încă abundența clonelor limfocitelor T citotoxice, fenotipul, capacitatea funcțională sau soarta acestor limfocite (pre-existente sau induse) în cursul infecției naturale cu SARS-CoV-2.

Se cunoaște invenția AU2021223701A1 care se referă la o metodă pentru diagnosticarea unei infecții cu SARS-CoV-2 care cuprinde etapa de detectare a prezenței sau absenței unui anticorp la SECV ID NR: 1, de preferință anticorp de clasă IgA, într-o probă de la un subiect, o metodă pentru diagnosticul diferențial al unei infecții cu coronavirus, o utilizare a unui anticorp la SECV ID NR: 1, de preferință anticorpi de clasă IgA pentru diagnosticarea unei infecții cu SARS-CoV-2 sau pentru diagnosticul diferențial al unei infecții cu coronavirus, de preferință pentru a distinge între un SARS- Infecția cu CoV-2, MERS și NL63, 229E, OC43 și HKU1 și o trusă care cuprinde o polipeptidă care cuprinde SECV ID NR: 1 sau o variantă a acesteia, de preferință acoperită cu un purtător util pentru diagnostic și unul sau mai mulți, de preferință toți reactivii din grup

cuprinzând un anticorp la SECV ID NR: 1, un tampon de spălare, un mijloc pentru detectarea prezenței unui anticorp, de preferință anticorp de clasă IgA, de preferință un anticorp secundar care se leagă în mod specific la anticorpi de clasă IgA, de preferință cuprinzând un detec. eticheta de masă și un tampon de diluție

Se cunoaste de asemenea inventia WO2021252864A1 in care sunt furnizate metode de realizare a unui clasificator de infecții cu SARS-CoV-2 (COVID-19) pentru o platformă și, opțional, un clasificator de infecții virale non-COVID-19, un clasificator de infecții bacteriene, un clasificator de boli neinfecțioase și/sau un clasificator subiecți sănătoși pentru platformă. Metode și sisteme pentru determinarea prezenței infecției cu SARS-CoV-2 (COVID-19) la un subiect sau pentru determinarea stadiului viral de infecție a unei boli cu SARS-CoV-2 (COVID-19) la un subiect care suferă de aceasta. furnizate

Se cunoaste inventia WO2021242850A1 care se referă la compoziții farmaceutice capabile să prevină, să trateze și/sau să amelioreze simptomele legate de afecțiunile cauzate de virusul SARS-CoV-2 (de exemplu, COVID-19). Invenția se mai referă la metode de prevenire, tratare și/sau ameliorare a simptomelor legate de afecțiunile cauzate de virusul SARS-CoV-2 (de exemplu, COVID-19), cuprinzând administrarea unui subiect (de exemplu, un pacient uman) a unei compoziții farmaceutice. cuprinzând lactoferină, S1RA, entecavir, lomitapide, metoclopramidă, bosutinib, tioguanină, fedratinib, Z-FA-FMK, amiodarona, verapamil, gilteritinib, clofazimină, niclozamidă și remdesivir (singuri sau cu agenți suplimentari).

Problema tehnică a invenției constă în obținerea unui produs și a unei metode pentru identificarea epitopilor imunogenici din structura proteinei S a virusului SARS-CoV-2 pe bază de amestec de peptide lungi sintetice (SLPs) care să stimuleze răspunsul imun celular, atât prin limfocite T helper (Th), cât și prin

limfocite T citotoxice (Tc) și care să nu aibă potențial toxic și să aibă eficiență crescută la administrare intranasală a 2 doze și realizarea constructelor specifice care vor permite preluarea acestor SLP, clivarea, prezentarea antigenică și activarea limfocitelor T helper și citotoxice, generând un răspuns imun cu rol protector împotriva infecției cu SARS-CoV-2.

Metoda de realizare a amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 conform invenției înlătură dezavantajele cunoscute prin aceea că se realizează prin parcurgerea următoarelor etape:

- Identificarea epitopilor imunogenici din structura SARS-CoV-2 pe baza prezentării specifice a acestor epitopi de către moleculele MHC caracteristice populației din România, prin metode in silico de predicție
- Generarea peptidelor lungi sintetice formate din 2 epitopi, unul specific pentru MHC clasa I (9 AA) și unul specific pentru MHC clasa II (15 AA), legați printr-un linker de 6 AA
- Testarea in silico a toxicității, alergenității, stabilității structurii 3D, a capacității de legare de TLR, a dinamicii moleculare și a generării răspunsului imun
- Testarea in vitro (pe culturi celulare) și in vivo (pe model animal) a toxicității amestecului de peptide lungi sintetice (SLPs)
- Testarea eficacității amestecului de SLP de a genera răspuns imun celular (limfocite Th și Tc) in vitro (pe culturi celulare) și in vivo (pe model animal)

Produsul amestec de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 conform invenției realizată prin parcurgere etapelor de mai sus menționate se definește și prin următoarele:

- Niste epitopi imunogenici selectați ca fiind specifici pentru moleculele MHC clasa I ale populației din România sunt: TRFQTLLALHRSYLT, PINLVRDLPQGFSAL

- Niste epitopi imunogenici selectați ca fiind specifici pentru moleculele MHC clasa II ale populației din România sunt: CVADYSVLY, NYNYLYRLF, RLFKSNLK, VLNDILSRL, YEQYIKWPW, YLQPRTFLL, VRFPNITNL, TRFQTLLAL, LTDEMIAQY
- Niste peptide lungi sintetice (SLPs) din amestec în număr de 9, având următoarea secvență de aminoacizi, rezultată din combinarea epitopilor specifici MHC clasa I și clasa II și legați prin linker-ul LLSVGG de 6 AA:

TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGNYNYLYRLF,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGRLFKSNLK,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGVLNDILSRL,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGYEQYIKWPW,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGYLQPRTFLL,
 TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGVRFPNITNL,
 PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLLAL,
 PINLVRDLPQGFSAALLSVGGLTDEMIAQY.

- Un amestec de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 mai conține 2 peptide din structura proteinei S, care se leagă de multiple alele MHC: GINITRFQTLLALHRSYLTPG, VGGNYNYLYRLFKSNLKPFER
- Un amestec de peptide lungi sintetice are o acoperire de 99,89% pentru populația din România și poate fi solubilizat în vitamina A uleioasă pentru administrare intranasală, în 2 doze

Inventia prezinta urmatoarele avantaje :

- Produsul inventiei este de eficacitate ridicata
- Produsul se poate manipula si administra usor

- Produsul nu este toxic față de celulele umane;
- Metoda invenției este mai simplă, mai exactă și mai ușor de aplicat
- Permite să definească caracteristicile răspunsului imun celular (limfocite CD4+ și CD8+) și umoral (IgG) la stimularea cu peptidele vaccinale (SLPs) propuse, atât în sisteme de cultură in vitro, cât și in vivo, pe model animal murin umanizat (șoareci huPBMC NOG).
- Conține cei mai importanți epitopi imunogenici, secvențe scurte de aminoacizi recunoscute de molecule MHC clasa I și II, din structura mai largă a proteinei S a virusului SARS-CoV-2, care au fost utilizați pentru construcția peptidelor lungi sintetice (synthetic long peptides = SLP);
- Amestecul de 9 peptide lungi sintetice (SLPs) 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, această structură permițând obținerea unui răspuns imun mai rapid;
- După administrarea și preluarea peptidului de către celula prezentatoare de antigen (antigen presenting cell - APC), constructul (SLP) va fi clivat în două peptide distincte la nivelul linker-ului, care vor putea fi astfel prezentate simultan celor două subpopulații de limfocite T, helper (Th) și citotoxice (Tc), cu potențial de declanșare a unui răspuns imun celular eficient împotriva infecției cu SARS-CoV-2;
- Rata de acoperire (coverage) prin utilizarea acestui amestec de peptide lungi sintetice este de 99,89% din populației României;
- Platforma invenției poate fi ușor adaptată unor potențiale modificări structurale ale patogenului sau chiar pentru alți patogeni emergenți. Spre deosebire de platformele bazate pe acizi nucleici (ADN/ARN),

vaccinurile bazate pe subunități proteice prezintă o platformă aprobată pentru uz uman.

- Pentru distribuția vaccinului conform invenției pe scară largă nu este necesară asigurarea unui lanț de refrigerare.

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției și modalitatea de acțiune a peptidelor lungi sintetice din cadrul amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 în legătură cu figurile, care reprezintă:

Fig.1 – Exemplu de activare a sistemului imun indusă de amestecul de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2.

Fig.2 – Harta epitopilor din structura SLPs vaccinale comparativ cu structura liniară a proteinei S a virusului SARS-CoV-2. S1 = AA 13-685; S2 = AA 686-1273; S2' = AA 816 -1273; RBD = receptor binding domain, AA 319-541; RBM = receptor binding motif AA 508-541; Secvențele de aminoacizi ale celor 11 peptide conținute în prezenta invenție.

Fig. 3 – Structura generală a SLP

Fig.4 – Coverage analysis pentru peptidele restricționate la MHC clasa I și pentru SLP selectate

Fig.5 – Modalitatea de recunoaștere și preluare a antigenelor la nivelul celulelor prezentatoare de antigen (APC) cu ajutorul TLR (toll-like receptors – TLR2/TLR3/TLR4)

Fig.6 – Exemplu de rezultate obținute prin docking-ul dintre TLR3 și SLPs selectat (scor HADDOCK -90.0 +/- 6.0). Vizualizare Discovery Studio.

Fig.7 – Exemplu de legare între TLR2 și TLR4 cu peptidele vaccinale (SLP)

Fig.8 – Analiza răspunsului imun cu soft-ul C-ImmSim

Fig.9 – Număr de celule din fiecare populație.

Fig.10 – Reprezentarea grafică a răspunsului imun umoral și celular. A.

Evoluția concentrației Ag, imunoglobulinelor și a complexelor immune; B

Fig.11 – Generarea de celule dendritice din celule mononucleare în 2 zile, din fracția de celule aderentă la plastic (A-D) sau din totalul celulelor mononucleare (E,F).

Fig.12 – Evidențierea capacității DC generate din monocite de a prelua SLP din mediul de cultură. A Microscopie optică, celule DC fusiforme. B-C Microscopie optică de fluorescență

Fig.13 – Analiza statusului imun la șobolani, înainte și la 7, respectiv 14 zile de la administrarea amestecului de SLP

Fig.14– Strategia de gating pentru identificarea subpopulațiilor celulare de memorie din cadrul limfocitelor T helper.

Fig.15 – Analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T helper în ziua 0, la punerea în cultură: naive (N) CD45RA+CCR7+, central memory (CM) CD45RA-CCR7+, effector memory (EM) CD45RA-CCR7- și diferențiate final (EMRA) CD45RA+CCR7-.

Fig.16 – Analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, la punerea în cultură: naive (N) CD45RA+CCR7+, central memory (CM) CD45RA-CCR7+, effector memory (EM) CD45RA-CCR7- și diferențiate final (EMRA) CD45RA+CCR7-.

Fig.17– Frecvența relativă a subseturilor de memorie în cadrul populației de limfocite T citotoxice (sus) sau de limfocite T helper (jos), în ziua 0, înainte de stimularea in vitro cu peptide.

Fig.18 –Frecvența relativă a subseturilor de memorie în cadrul populației de limfocite T citotoxice, pentru pacienți COVID-19 (sus) sau indivizi neexpuși (jos), în ziua 7, după stimulare cu amestecul de peptide P11 (stg), Peptivator (mijloc) sau nestimulate (dreapta).

Fig.19 –Frecvența relativă a subseturilor de memorie în cadrul populației de limfocite T helper, pentru pacienți COVID-19 (sus) sau indivizi neexpuși (jos), în ziua 7, după stimulare cu amestecul de peptide P11 (stg), Peptivator (mijloc) sau nestimulate (dreapta).

Fig.20 – Analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, la animale nevaccinate.

Fig.21 – Analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 7 de la stimulare *in vitro* cu peptidele SLP, la animale nevaccinate.

Fig.22 – Analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, înainte de restimulare *in vitro*, la o săptămână de la administrarea vaccinului.

Fig.23 – analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 7 de la stimulare *in vitro* cu peptidele SLP (dreapta) vs. celule nestimulate (stânga), la animale vaccinate.

Fig.24 – Epitopii specifici identificați la cele 4 loturi de șoareci de tip huPBMC-NOG pe baza specificității TCR

Se dă în continuare un exemplu de realizare a invenției și a testelor de validare. Prezenta invenție se încadrează în domeniul identificării posibilităților de prevenție a infecției cu SARS-CoV-2 și se referă la obținerea unui amestec de peptide lungi sintetice (SLPs) care să stimuleze răspunsul imun celular, atât prin limfocite T helper (Th), cât și prin limfocite T citotoxice (Tc), care să nu aibă potențial toxic și să aibă eficiență crescută la administrare intranasală a 2 doze . Amestecul conține 9 SLPs formate din epitopi imunogenici selectați din structura proteinei S a SARS-CoV-2, restricționați la prezentarea cu molecule MHC clasa I (9 AA), respectiv clasa II (15AA), legați printr-un linker de 6 AA, la nivelul căruia SLPs vor fi clivate de catepsinele intracelulare, facilitând prezentarea către CTL, respectiv Th. Amestecul de SLPs din prezenta invenție a fost testat pentru potențiale efecte toxice *in silico*, *in vitro* (pe culturi celulare) și *in vivo* (model animal de șobolan Wistar, administrare intranasală); ulterior a fost dovedită eficacitatea prin teste *in vitro* și *in vivo* (model animal șoarece

huPBMC-NOG, administrare intranazală), evaluată prin activarea limfocitelor Th și Tc.

Alegerea noastră este susținută de faptul că toate vaccinurile propuse spre dezvoltare includ cel puțin o parte din această proteină, precum și de studii publicate ulterior care au demonstrat existența unui răspuns imun robust direcționat către proteina S, atât prin anticorpi neutralizanți, cât și prin limfocite T specifice.

Platforma de vaccinare de tip subunitate proteică recombinată, în care se încadrează și propunerea noastră de vaccin, are cel mai mare potențial de adaptare la manufacturare pe scară largă datorită faptului că formula vaccinală se poate obține în totalitate prin procese sintetice, acelulare. De asemenea, această platformă poate fi ușor adaptată unor potențiale modificări structurale ale patogenului sau chiar pentru alți patogeni emergenți. Spre deosebire de platformele bazate pe acizi nucleici (ADN/ARN), vaccinurile bazate pe subunități proteice prezintă o platformă aprobată pentru uz uman. În plus, pentru distribuția acestui vaccin pe scară largă, nu este necesară asigurarea unui lanț de refrigerare.

Produsul vaccinal propus este unic prin formularea sa, adaptată după o terapie utilizată cu succes în cancer [3] pentru inducerea unui răspuns imun celular prin limfocite T specifice. Astfel, am ales cei mai importanți epitopi imunogenici, secvența scurte de aminoacizi recunoscute de molecule MHC clasa I și II, din structura mai largă a proteinei S, pentru a construi SLP (synthetic long peptides = peptide sintetice lungi).

Avantajul acestui tip de construct constă în faptul că după administrarea și preluarea peptidului de către celula prezentatoare de antigen (antigen presenting cell - APC), constructul va fi clivat în două peptide distincte la nivelul linker-ului, care vor putea fi astfel prezentate simultan celor două subpopulații de limfocite T, helper și citotoxice.

- Amestecul de peptide a fost testat in vitro și in vivo în ceea ce privește toxicitatea față de celulele eucariote și nu au fost identificate efecte toxice la concentrații 1x și 10x față de doza propusă pentru administrare la om
 - Amestecul de peptide a fost testat în ceea ce privește eficacitatea pe culturi celulare umane de PBMC și s-a evidențiat reactivitatea limfocitelor Th și Tc față de SLPs componente
 - Amestecul de peptide a fost testat în ceea ce privește eficacitatea pe modele animale in vivo de șoarece huPBMC-NOG, identificându-se epitopi specific recunoscuți de limfocitele T prin tehnici de secvențiere genică de nouă generație (NGS) la administrarea a 2 doze intranazal
- Amestecul de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 conform invenției prezintă următoarele caracteristici:
- Conține cei mai importanți epitopi imunogenici, secvențe scurte de aminoacizi recunoscute de molecule MHC clasa I și II, din structura mai largă a proteinei S a virusului SARS-CoV-2, care au fost utilizați pentru construcția peptidelor lungi sintetice (synthetic long peptides = SLP);
 - Amestecul de 9 peptide lungi sintetice (SLPs) 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, această structură permițând obținerea unui răspuns imun mai rapid;
 - După administrarea și preluarea peptidului de către celula prezentatoare de antigen (antigen presenting cell - APC), constructul (SLP) va fi clivat în două peptide distincte la nivelul linker-ului, care vor putea fi astfel prezentate simultan celor două subpopulații de limfocite T, helper (Th) și citotoxice (Tc), cu potențial de declanșare a unui răspuns imun celular eficient împotriva infecției cu SARS-CoV-2;

- Rata de acoperire (coverage) prin utilizarea acestui amestec de peptide lungi sintetice este de 99,89% din populației României;
- Toxicitatea amestecului de peptide lungi sintetice a fost testată prin studii *in silico*, *in vitro* și *in vivo*, care au dovedit că produsul nu este toxic față de celulele umane;
- Eficacitatea amestecului de peptide lungi sintetice a fost evaluată prin studii *in vitro*, pe celule umane din sângele periferic (PBMC), dovedind potențialul de a induce o activare a răspunsului imun celular, prin activarea specifică a limfocitelor T helper și a limfocitelor T citotoxice;
- Eficacitatea amestecului de peptide lungi sintetice a fost evaluată prin studii *in vivo* pe model animal de șoarece huPBMC-NOG, dovedind capacitatea de a induce activarea limfocitelor T cu receptori (T cell receptor = TCR) specifici pentru peptidele utilizate în prezenta invenției;
- Pentru studiile *in vivo*, calea de administrare a amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 a fost calea intranazală, iar agentul de transport a fost vitamina A uleioasă; această cale de administrare a vaccinului nu induce efecte secundare sistemice și este mai ușor acceptată;
- Platforma de vaccinare de tip subunitate proteică recombinată are cel mai mare potențial de adaptare la manufacturare pe scară largă datorită faptului că formula vaccinală se poate obține în totalitate prin procese sintetice, acelulare;

Această platformă poate fi ușor adaptată unor potențiale modificări structurale ale patogenului sau chiar pentru alți patogeni emergenți. Spre deosebire de platformele bazate pe acizi nucleici (ADN/ARN), vaccinurile bazate pe subunități proteice prezintă o platformă aprobată pentru uz uman. În plus, pentru distribuția acestui vaccin pe scară largă, nu este necesară asigurarea unui lanț de refrigerare.

Este redat în continuare în detaliu modul de generare și validare prin teste a cu descriere în 3 capitole I,II și III și cu referire la figurile invenției.

I. Generarea și validarea *in silico* a amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2

I.1. Generarea amestecului de peptide lungi sintetice (SLPs)

Amestecul de peptide (Fig.1 și 2) 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 (Fig.3).

Această platformă de vaccinare, bazată pe stimularea imunității celulare, a fost adaptată după o terapie utilizată cu succes în cancer [3], și poate fi aplicată, profilactic, în nenumărate boli infecțioase, în special de tip viral. Platforma de vaccinare de tip subunitate proteică recombinată are cel mai mare potențial adaptare la manufacturare pe scară largă datorită faptului că formula vaccinală se poate obține în totalitate prin procese sintetice, acelulare. De asemenea, această platformă poate fi ușor și rapid adaptată unor potențiale modificări structurale ale patogenului sau chiar pentru alți patogeni emergenți.

Am făcut designul peptidelor lungi sintetice (SLPs) astfel încât să aibă o dimensiune de 29-30 AA, cu un epitop specific MHC clasa II la capătul N terminal (15 AA), un linker de 6 AA sensibil la catepsinele intracelulare (LLSVGG) și un epitop specific pentru MHC clasa I (8-9 AA) la capătul C terminal. Epitopul restricționat la moleculele MHC clasa II poate fi prezentat limfocitelor T helper (CD4+), în timp ce epitopul restricționat la moleculele MHC clasa I poate fi prezentat limfocitelor T citotoxice (CD8+). Linker-ul LLSVGG a fost selectat conform articolului lui Rabu *et al.*, 2019 [10], catepsinele fiind enzime prezente în majoritatea celulelor organismului uman.

Acest design al SLPs facilitează clivarea peptidelor preluate de celulele prezentatoare de antigen (APC) la nivelul linker-ului și prezentarea peptidelor specifice limfocitelor T naive, pentru activare.

Pentru alegerea corectă a epitopilor specifici fiecărei clase de molecule MHC am utilizat următoarele metode (*in silico*):

1. Secvența genomică a coronavirusului „Wuhan-Hu-1 isolate” (MN908947.3/ Ref Seq NC_045512: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NC_045512.2) [11], pentru a identifica regiuni genice înalt conservate, cu potențial redus de mutații, care ar putea reprezenta sursă antigenică; astfel am identificat proteina S (spike), importantă pentru adeziunea și fuziunea virusului cu celulele țintă;
2. Secvența completă a aminoacizilor glicoproteinei spike (S) a SARS-CoV-2 a fost identificată în NCBI - NCBI Accession id 1/4 “QHD43416.1;
3. Predicția epitopilor specifici MHC clasa II:
 - IEDB server
 - IFNepitope server ([http:// crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/](http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/)) [12] pentru predicția activării răspunsului imun de tip Th1 și producția de IFN
 - ToxinPred server (<http://crdd.osdd.net/raghava/tox-inpred/>) [13] pentru evaluarea toxicității componentelor vaccinale
4. Predicția epitopilor liniari specifici pentru MHC clasa I:
 - Algoritm bazat pe artificial neural network, online server NetCTL 1.2, care efectuează predicții pentru legarea de molecule MHC clasa I, urmată de trimiterea rezultatelor generate la serverele VaxiJen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>) [14], ToxinPred ([http:// crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/](http://crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/)) [15], pentru a identifica peptidele antigenice non-toxice (Larsen et al., 2007) [16].

- După efectuarea screening-ului epitopilor cu ajutorul serverelor VaxiJen v2.0 și ToxinPred, epitopii rezultanți au fost testați pentru imunogenicitate cu IEDB server (<https://www.iedb.org/>) [17].
5. Selecția alelelor specifice imunofenotipului populației din România:
- Pentru populația României am ales epitopii restricționați la moleculele MHC cu frecvență crescută în această populație, pe baza informațiilor din AFND, dar și a datelor publicate în România de Constantinescu *et al.*, 2016 [18].
 - Folosind metodele de mai sus, am identificat următoarele alele specifice: MHC clasa I - A*24:02, A*03:01, A*11:01, A*02:01, A*01:01, B*08:01, B*35:01, B*18:01, C*07:01; MHC clasa II - DRB1*11:04, DRB1*11:01, DRB1*13:01, DRB1*16:01, DRB*03:01.

În Tabelul I sunt prezentate peptidele care intră în structura amestecului de peptide pentru prevenția SARS-CoV-2, care fac subiectul prezentei invenții, acestea fiind în număr de 9 SLPs și 2 peptide care sunt recunoscute de multiple alele MHC.

Tabel I. Peptidele incluse în invenția “Produs și metoda pe baza de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-COV-2”

Nr	Secvența aminoacizi	Poziți a	MHC clasa I	MHC clasa II
1.	GINITRFQTLALHRSYLTPG	232- 252	B*08:0 1; C*07:0 1;	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01

182-

2.	VGGNYNYLYRLFRKSNLKPFER	445- 466	A*24:0 2; B*08:0 1; C*07:0 1; A*03:0 1; A*11:0 1	DRB1*11: 04; 11:01; 16:01
3.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGCVAD YSVLY	(236- 250); (361- 369)	B*35:0 1; A*01:0 1; A*11:0 1;	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
4.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGNYNY LYRLF	(236- 250); (448- 456)	A*24:0 2	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
5.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGRLFR KSNLK	(236- 250); (454- 462)	A*03:0 1; A*11:0 1	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
6.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVLNDI LSRL	(236- 250); (976- 984)	A*02:0 1;	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01

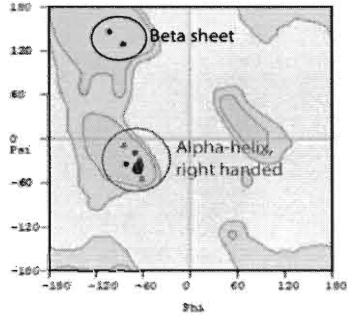
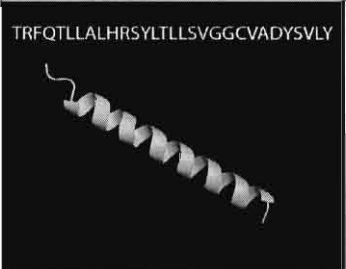
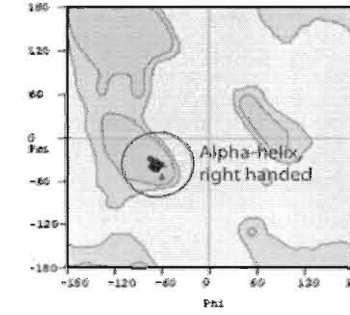
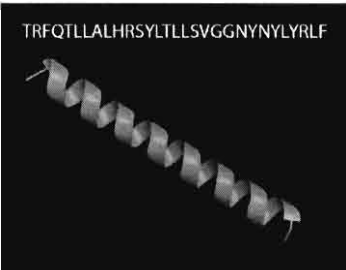
7.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYEQYI KWPW	(236- 250); (1206 - 1214)	B*18:0 1;	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
8.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYLQP RTFLL	(236- 250); (269- 277)	A*02:0 1; B*08:0 1	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
9.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRF NITNL	(236- 250); (327- 335)	C*07:0 1	DRB1*11: 04; 11:01; 13:01; 16:01
10	PINLVRDLPQGFSALLSVGGTRFQT LLAL	(209- 223); (236- 244)	C*07:0 1	DRB*03:0 1
11	PINLVRDLPQGFSALLSVGGTDE MIAQY	(209- 223); (976- 984)	A*01:0 1; B*35:0 1	DRB*03:0 1

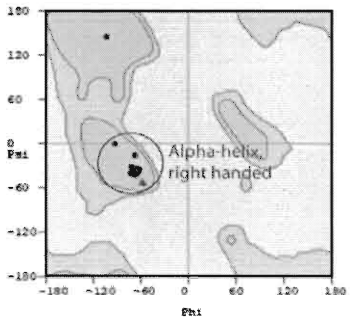

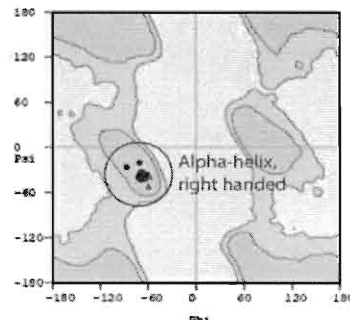
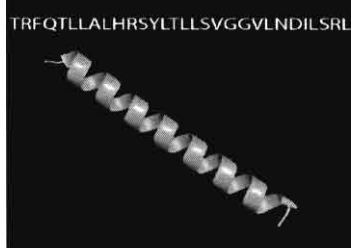
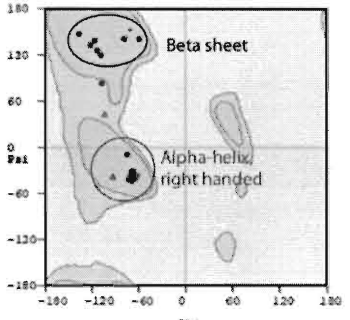
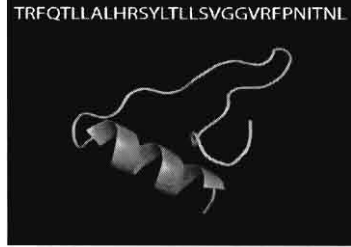
Pentru toate aceste peptide au fost efectuate analize conform metodologiei descrise. Analiza ratei de acoperire („coverage anlysis”) (Fig. 4) a relevat faptul că din pool-ul de 11 peptide ar fi necesare 4.87 (se rotunjește la 5) peptide pentru a avea o acoperire de 99,89% în populația din România.

Pentru identificarea profilului de alergenicitate a peptidelor selectate, am utilizat soft-ul AllerCatPro, care a relevat faptul că nici unul dintre peptidele selectate nu este alergic.

Pentru predicția toxicității peptidelor din componența vaccinului anti-SARS-CoV-2 dezvoltat în cadrul proiectului am utilizat soft-ul ToxinPred, care a relevat faptul că nici unul dintre peptidele vaccinale nu este toxic.

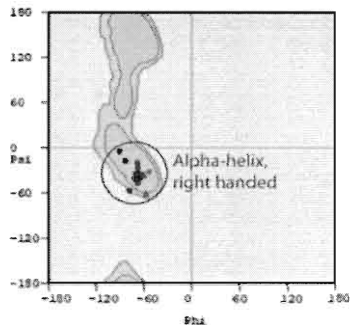
Tabel II. Structura 3D și graficul Ramachandran pentru peptidele vaccinale (SLP) constituyente

Denumire peptid	Grafic Ramachandran	Structura 3D a SLP
<p>Pep 1</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLSSVGGCVADYSVLY</p>  <p>Selection: // * Apply Outliers Only</p> <p>In Preferred Regions: 28 (100.00%) In Allowed Regions: 0 (0.00%) Outliers: 0 (0.00%)</p>	
<p>Pep 2</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLSSVGGNINYLYRLF</p>  <p>Selection: // * Apply Outliers Only</p> <p>In Preferred Regions: 28 (100.00%) In Allowed Regions: 0 (0.00%) Outliers: 0 (0.00%)</p>	

<p>Pep 3</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK</p>  <p>Alpha-helix, right handed</p> <p>Selection: /r* Apply Outliers Only</p> <p>In Preferred Regions: 28 (100.00%) In Allowed Regions: 0 (0.00%) Outliers: 0 (0.00%)</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK</p> 
<p>Pep 4</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVLDILSRL</p>  <p>Alpha-helix, right handed</p> <p>Selection: /r* Apply Outliers Only</p> <p>In Preferred Regions: 28 (100.00%) In Allowed Regions: 0 (0.00%) Outliers: 0 (0.00%)</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVLDILSRL</p> 
<p>Pep 5</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYEQYIKWPW</p>  <p>Beta sheet</p> <p>Alpha-helix, right handed</p> <p>Selection: /r* Apply Outliers Only</p> <p>In Preferred Regions: 25 (89.29%) In Allowed Regions: 3 (10.71%) Outliers: 0 (0.00%)</p>	<p>TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRFNPITNL</p> 

Pep 6

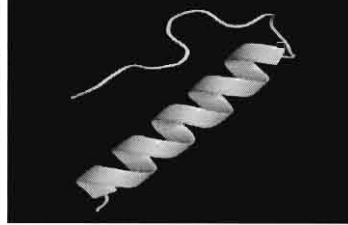
TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYLPRTFLL



Selection // * Apply Outliers Only

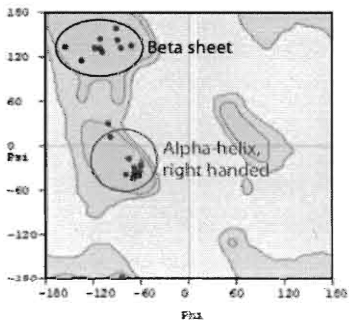
In Preferred Regions: 28 (100.00%)
 In Allowed Regions: 0 (0.00%)
 Outliers: 0 (0.00%)

PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLAL



Pep 7

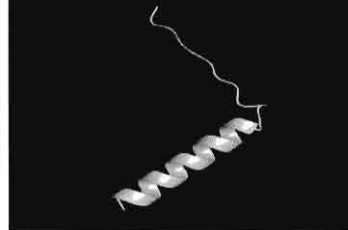
TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRFNPITNL



Selection // * Apply Outliers Only

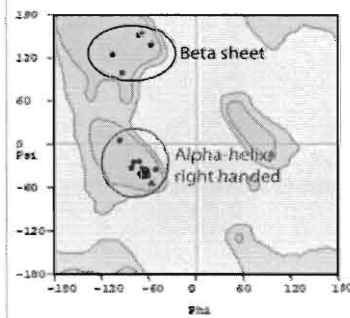
In Preferred Regions: 27 (96.43%)
 In Allowed Regions: 1 (3.57%)
 Outliers: 0 (0.00%)

TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYEYIKWPW



Pep 8

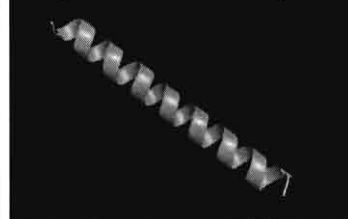
PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLAL

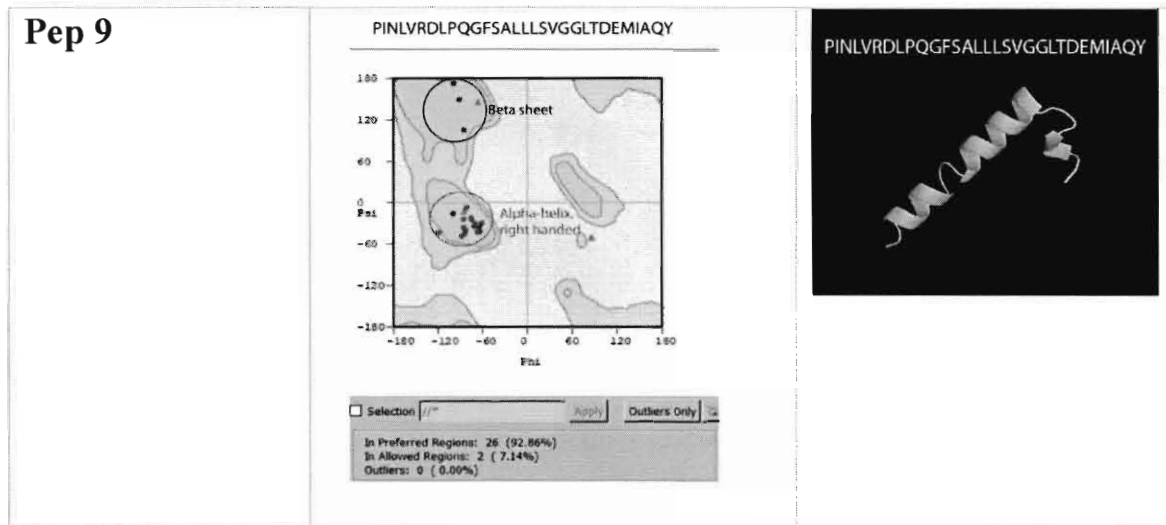


Selection // * Apply Outliers Only

In Preferred Regions: 28 (100.00%)
 In Allowed Regions: 0 (0.00%)
 Outliers: 0 (0.00%)

TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYLPRTFLL





I. 2. Validarea peptidelor lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2

Analiza de docking a adus validarea modelelor de interacțiune, sub forma afinității de legare dintre cele 2 molecule (TLR și SLP) (K. Abraham Peele et al., 2020) [19]. În Fig. 6 este prezentat rezultatul docking-ului dintre TLR3 și peptidul TRFQTLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY. Prin docarea peptidelor cu TLR3, folosind programul HADDOCK am obținut mai multe structuri favorabile (cu valori negative ale energiilor și scoruri HADDOCK negative). Pentru interacțiunea TLR3-SLP ales, programul HADDOCK a clusterizat 70 de structuri în 12 clustere, care reprezintă 35% dintre modelele generate de HADDOCK în sistemul water-refined. Clusterul cu cel mai bun rank este recomandat ca fiind de elecție de HADDOCK. Scorul z (Z-score) indică numărul de deviații standard de la medie (cu cât este mai negativ, cu atât mai bine). Am selectat structura care a prezentat rank-ul cel mai bun și am vizualizat folosind soft-ul PyMol. Graficul Ramachandran a fost folosit pentru a valida stabilitatea termodinamică a structurii SLP-TLR3.

Tabel III. Rezultatele docking-ului peptidelor vaccinale cu TLR2

Identifier	Sequence	Clus-ter no.	HA OC K scor- e	Clus-ter size	RMS D	Variance Waa ls en er g y	Electro stati c ener gy	Desolv ation ene rgy	Restraints vio lati on ene rgy	Bur-ies d Su rf ac e Ar ea	Z-score
0	tlr2_pe p1_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GCVADYSVLY	- 156 .6	20	0.5	- 8 3.2	- 211 .7	- 31. 1 +/- 1.7	0	22 88 .8	0
1	tlr2_pe p2_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GNYNYLYRLF	- 121 .4	20	0.5	- 6 6.3	- 231 .5	- 8.8 +/- 1.5	0	20 91 .9	0
2	tlr2_pe p3_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GRLFRKSNLK	- 132 .1	20	0.5	- 7 3.7	- 258 .5	- 6.6 +/- 3.2	0	22 66 .9	0

7	tlr2_pe p8_ro_ refined	PINLVRDLPQ GFSALLLSVG GTRFQTLAL		-	20	0.	-	-	4.1	0	18	0
			Cl	124		5	5	366	+/-		54	
			us	.4			5.	.4	1.6		.1	
			te				2					
			r									
			1									
8	tlr2_pe p9_ro_ refined	PINLVRDLPQ GFSALLLSVG GLTDEMIAQY		-	20	0.	-	-	-	0	20	0
			Cl	123		5	7	129	27.		96	
			us	.6			0.	.2	2		.5	
			te				6		+/-			
			r						1.7			
			1									

Tabel IV. Rezultatele docking-ului peptidelor vaccinale cu TLR4

Identifi	Sequence	Cl	HA	Cl	R	V	Ele	Des	Re	B	Z
er		us	DD	us	M	an	ctro	olv	str	ur	-
		te	OC	te	S	de	stati	atio	ain	ie	s
		r	K	r	D	r	c	n	ts	d	c
		no	scor	si		W	ener	ene	vio	Su	o
		.	e	ze		aa	gy	rgy	lati	rf	r
						ls			on	ac	e
						en			ene	e	
						er			rgy	Ar	
						g				ea	
						y					

0	tlr4_pe p1_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GCVADYSVLY		-	20	0.	-	-	-	0	15	0
			Cl	121		5	5	161	37.		65	
			us	.2			1.	.8	4		.8	
			te				5		+/-			
			r						1.3			
			1									
1	tlr4_pe p2_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GNYNYLYRLF		-	20	0.	-	-	-	0	15	0
			Cl	107		6	5	76.	32.		71	
			us	.7			9.	3	7		.9	
			te				7		+/-			
			r						0.5			
			1									
2	tlr4_pe p3_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GRLFRKSNLK		-	20	0.	-	-	-	0	13	0
			Cl	108		6	4	163	31.		50	
			us	.6			4.	.2	6		.3	
			te				4		+/-			
			r						1.5			
			1									
3	tlr4_pe p4_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GVLNDILSRL		-	20	0.	-	-	-	0	13	0
			Cl	96.		5	4	132	29.		03	
			us	8			0.	.9	6		.7	
			te				6		+/-			
			r						3.1			
			1									
4	tlr4_pe p5_ro_ refined	TRFQTLLALH RSYLTLLSVG GYEQYIKWP W		-	20	0.	-	-	-	0	12	0
			Cl	111		5	5	71.	46.		38	
			us	.7			0.	9	6		.3	
			te				8					

			r						+/-			
			1						1.9			
5	tlr4_pe	TRFQTLALH		-	20	0.	-	-	-	0	15	0
	p6_ro_	RSYLTLLSVG	Cl	109		5	6	29.	42.		04	
	refined	GYLQPRTFLL	us	.1			0.	3	6		.6	
			te				6		+/-			
			r						0.5			
			1									
6	tlr4_pe	TRFQTLALH		-	20	0.	-	-	-	0	11	0
	p7_ro_	RSYLTLLSVG	Cl	88.		5	5	59.	25.		68	
	refined	GVRFPNITNL	us	5			1.	4	1		.3	
			te				5		+/-			
			r						1.1			
			1									
7	tlr4_pe	PINLVRDLPQ		-	20	0.	-	-	-	0	12	0
	p8_ro_	GFSALLSVG	Cl	97.		5	4	120	24.		69	
	refined	GTRFQTLAL	us	3			8.		9		.9	
			te				4		+/-			
			r						1.5			
			1									
8	tlr4_pe	PINLVRDLPQ		-	20	0.	-	-	-	0	14	0
	p9_ro_	GFSALLSVG	Cl	98.		5	4	187	15.		37	
	refined	GLTDEMIAQY	us	9			5.	.9	4		.4	
			te				9		+/-			
			r						0.9			
			1									

Tabel V. Rezultatele statistice ale docking-ului peptidelor vaccinale cu TLR2

	HADDOCK K score	Cluste r size	RMS D	Van der Waals energy	Electrostat ic energy	Restrain ts violation energy	Buried Surface Area
coun t	9	9	9	9	9	9	9
mea n	-126.644	20	0.5	- 66.3444	-229.3	0	2019.34 4
std	18.96939	0	0	10.2117 7	78.37563	0	226.134 3
min	-156.6	20	0.5	-83.2	-366.4	0	1670.5
25%	-132.1	20	0.5	-72.3	-258.5	0	1854.1
50%	-124.4	20	0.5	-66.3	-211.7	0	2091.9
75%	-121.4	20	0.5	-60.2	-183.2	0	2184.3
max	-98.1	20	0.5	-49.6	-129.2	0	2288.8

Tabel VI. Rezultatele statistice ale docking-ului peptidelor vaccinale cu TLR4

	HADDOCK K score	Clust er size	RMSD	Van der Waals energy	Electrostat ic energy	Restrain ts violatio n energy	Buried Surface Area
cou nt	9	9	9	9	9	9	9
mea n	-104.422	20	0.5222 22	- 50.377 8	-111.411	0	1378.9 11

std	9.857583	0	0.0440	6.6086	54.59914	0	147.42
			96	64			71
min	-121.2	20	0.5	-60.6	-187.9	0	1168.3
25%	-109.1	20	0.5	-51.5	-161.8	0	1269.9
50%	-107.7	20	0.5	-50.8	-120	0	1350.3
75%	-97.3	20	0.5	-45.9	-71.9	0	1504.6
max	-88.5	20	0.6	-40.6	-29.3	0	1571.9

I.3. Teste de dinamică moleculară – simulare *in silico*

Interacțiunile proteină – receptor au fost analizate prin simulările MD (molecular dynamics). Aceste simulări au fost efectuate cu GROMACS 2018 package, pentru a efectua simulări de 10 ns folosind câmpul de forță OPLS. A fost selectat modelul de apă TIP3P pentru solubilizarea complexelor proteice, urmată de adăugarea ionilor pentru neutralizare. Au fost folosite condițiile de limitare periodică iar echilibrarea sistemului a fost făcută cu ajutorul ansamblului NVT și NPT pentru 100 ps. Traectoria a fost setată să fie generată la fiecare 2 fs și salvată la fiecare 2 ps. Complexul protein-proteină a fost analizat conform cu Enayatkhani *et al.*, 2020 [20].

RMSD < 1 nm indică faptul că diferențele dintre structura dizolvată în apă și cea inițială (cristalizată) sunt foarte mici, sugerând că peptidele noastre sunt stabile. Valoarea mică a RMSF indică faptul că fluctuațiile atomilor constituenți sunt mici (peptidele nu sunt foarte flexibile). O valoare medie a “radius of gyration” mică, dublată de o variație mică în jurul mediei indică faptul că în timpul simulării nu au avut loc modificări conformaționale majore - acest fapt sugerează că peptidele sunt relativ "compacte". Era și de așteptat, în special la cele cu structură de tip foaie beta-pleată. În general, alpha helix-urile și structurile globulare tind să aibă un Rg mai mare. Energia potențială negativă indică faptul că procesul de minimizare a energiei sistemului apos a fost realizată cu succes. Densitatea sistemului este apropiată de cea a apei (1000

kg/m³, având în vedere că în afară de peptid există numai molecule de apă + cațiva ioni), deci sistemul este bine echilibrat. Temperatura setată a fost de 300 K și a fost atinsă în toate cazurile.

Parametrii folosiți au fost:

Presiune = 1 bar

Temperatură = 300 K

Volum = 8000 nm³

Câmp de forțe OPLS-AA

Water model - SPC216

Timp simulat = 10 ns (5 x 10⁶ pași)

Tabel VII. Valorile parametrilor obținuți la testele de dinamică moleculară pentru toate peptidele vaccinale (SLPs)

	Sequence	rm	rm	rm	rm	te	te	de	de	po	po	Rg	Rg
		sd	sd	sf	sf	m	m	nsi	nsi	te	te	me	std
		M	St	M	St	pe	pe	ty	ty	nti	nti	an	ev
		ea	De	ea	De	rat	rat	M	St	al	al		
		n	v	n	v	ur	ur	ea	De	M	St		
						e	e	n	v	ea	De		
						M	St	(k		n	v		
						ea	De	g/		(k			
						n	v	m		J/			
						(K		^3		m			
))		ol)			
p	TRFQTLL	0.7	0.2	0.4	0.1	29	1.6	10	3.4	-	24	1.0	0.1
e	ALHRSYL	96	62	76	64	9.9	88	01.	37	58	46	24	56
	TLLSVGG	37	77	33	70	41	85	37	78	47	6.1	12	93

p	CVADYSV	10	15	82	20	68	23	77	83	23.	53	95	60
1	LY	38	58	05	29	16	5	16	21	10	86	81	69
										8			
p	TRFQTLL	0.4	0.1	0.4	0.1	30	1.8	10	3.0	-	25	1.4	0.1
e	ALHRSYL	09	02	02	24	0.0	37	02.	13	50	36	27	45
p	TLLSVGG	88	02	74	41	36	72	63	10	93	1.6	57	04
2	NYNYLYR	81	44	31	29	05	98	76	26	33.	81	25	76
	LF	08	43	07	39	6	05	2	48	42	69	37	69
										74			
p	TRFQTLL	0.4	0.1	0.4	0.1	30	1.6	10	3.6	-	25	1.2	0.1
e	ALHRSYL	31	71	22	76	0.1	89	01.	30	61	32	81	01
p	TLLSVGG	68	75	57	20	44	36	57	47	39	8.8	85	75
3	RLFRKSN	38	25	04	49	05	72	05	79	64.	26	38	98
	LK	77	92	06	44	17	89	15	86	80	4	66	5
										65			
p	TRFQTLL	0.4	0.1	0.3	0.1	30	1.8	10	3.1	-	27	1.2	0.0
e	ALHRSYL	16	19	94	38	0.1	73	01.	40	51	74	48	47
p	TLLSVGG	07	28	80	08	03	86	34	10	39	9.3	96	79
4	VLNDILSR	07	48	58	39	87	67	87	46	46.	38	73	64
	L	21	55	59	19	97	67	92	22	92	34	63	44
										59			
p	TRFQTLL	0.2	0.0	0.1	0.0	29	3.1	10	4.5	-	12	0.8	0.0
e	ALHRSYL	45	50	96	94	9.5	41	07.	31	22	60	28	19
p	TLLSVGG	19	37	81	70	48	03	85	54	69	8.9	50	83
5	YEQYIKW	85	53	92	20	47	43	84	68	37.	67	74	21
	PW	58	58	68	91	64	1	68	62	37	82	59	2
										86			

p	TRFQTLL	0.6	0.2	0.4	0.1	29	1.8	10	3.0	-	26	1.2	0.0
e	ALHRSYL	07	00	15	61	9.8	25	01.	81	52	25	01	96
p	TLLSVGG	91	05	86	99	85	64	28	81	28	4.1	44	88
6	YLQPRTF	01	32	50	57	19	10	91	35	35.	09	98	41
	LL	18	6	29	93	83	74	15	55	67	58	5	99
										86			
p	TRFQTLL	0.3	0.1	0.2	0.1	30	3.7	10	5.5	-	11	0.8	0.0
e	ALHRSYL	21	15	68	36	0.0	53	10.	44	14	22	19	40
p	TLLSVGG	06	33	42	66	02	05	15	45	43	7.9	76	12
7	VRFPNITN	33	33	82	24	11	27	88	53	84.	32	36	97
	L	4	11	26	29	8	71	52	13	22	36	64	1
										28			
p	PINLVRDL	0.3	0.0	0.2	0.0	29	3.2	10	5.5	-	12	0.8	0.0
e	PQGFSAL	65	72	10	73	9.5	07	09.	37	16	04	93	20
p	LLSVGGT	79	21	32	87	63	38	72	14	26	6.4	53	00
8	RFQTLLA	66	95	39	62	75	55	31	44	71.	48	02	38
	L	62	63	92	31	12	05	13	22	42	86	75	1
										33			
p	PINLVRDL	0.6	0.1	0.4	0.1	30	1.9	10	3.7	-	26	0.9	0.1
e	PQGFSAL	41	84	44	39	0.2	96	03.	15	40	08	49	41
p	LLSVGGL	82	98	82	66	57	27	61	99	47	5.2	30	50
9	TDEMIAQ	11	21	24	92	79	86	70	57	28.	58	95	33
	Y	17	11	4	01	88	96	93	77	81	22	06	75
										94			

I.4. Teste de simulare a răspunsului imun *in silico* – C-ImmSim

Profilul răspunsului imun la administrarea peptidelor vaccinale a fost

înregistrat prin metoda *in silico* C-ImmSim, server de simulare online

(<http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php>) [21]. Modelul C-ImmSim descrie

atât răspunsul umoral, cât și cel celular al sistemului imun uman la administrarea unui construct vaccinal.

C-ImmSim include următoarele ipoteze de lucru sau teorii (Rapin N et al., 2010) [22]:

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

Pentru simularea efectelor peptidelor vaccinale la nivelul sistemului imun uman am utilizat 3 doze, la interval de 30 de zile între doze. Rezultatele sunt prezentate în Figurile 8, 9 și 10. În figura 8 se vede cum limfocitele T prezintă fluctuații în cursul perioadei de stimulare, predominând răspunsul celular. Macrofagele (MA) și populația de celule dendritice (DC) prezintă peak-uri de activare la administrarea celor 3 doze vaccinale. Aceste vârfuri de activare coincid cu creșterea numărului de celule cu capacitate de prezentare antigenică. Celulele NK prezintă fluctuații pe toată perioada de simulare, cu creșteri ale nr. de celule/mm³ suprapuse cu stimularea antigenică. În figura 9 se observă că vaccinul SLPs nu stimulează formarea de anticorpi de tip IgG, dar populația totală de limfocite B active este crescută la aproximativ 500 celule/mm³. Vaccinul SLP stimulează selectiv populațiile de limfocite T helper, totale dar și

cele de memorie, la fiecare stimulare antigenică numărul de celule crescând progresiv, ajungând la valoarea de 2×10^4 după a treia doză de stimulare, acestea fiind limfocite T active, de memorie, de tip Th1. Legenda: Act = active; Intern = internalizare Ag; Pres II = prezentare pe MHC clasa II; Dup = în ciclu mitotic; Anergic = anergic; Resting = inactive. În figura 10 se vede 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.

II. Sinteza peptidelor lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 și testarea toxicității

II.1. Sinteza peptidelor lungi sintetice (SLPs)

Peptidele vaccinale astfel validate au fost sintetizate și purificate prin HPLC. Produsul a fost liofilizat și TFA-free. Analiza calitativă a fost efectuată prin MALDI-MS și prin HPLC.

Tabel VIII. Peptidele vaccinale și masa moleculară corespunzătoare fiecărui SLP

Peptid nr.	Secvența de AA	MW
Peptid 1	GINITRFQTLLALHRSYLTPG	2370.32
Peptid 2	VGGNYNYLYRLFRKSNLKPFR	2733.45
Peptid 3	TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY	3358.77
Peptid 4	TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGNYNYLYRLF	3591.94
Peptid 5	TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK	3488.03
Peptid 6	TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGVLNDILSRL	3368.93

Peptid 7	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYEQYIKWPW	3638.94
Peptid 8	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYLQPRTFLL	3476.97
Peptid 9	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRFPNITNL	3399.91
Peptid 10	PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLAL	3208.83
Peptid 11	PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTDEMIAQY	3229.71

II.2. Teste *in vitro* pe celule umane de tip PBMC - preluarea peptidelor sintetice lungi (SLP) din mediul de cultură de către celulele prezentatoare de antigen (APC)

Pentru a investiga dacă peptidele din componența vaccinului sunt preluate de către APC, urmând a fi prezentate limfocitelor T, am folosit un peptid de tip SLP conjugat cu fluoresceină, ce poate fi detectat prin microscopie de fluorescență.

Am evaluat practic mai multe protocoale de diferențiere a monocitelor în celule dendritice, în care am variat mediile folosite pentru diferențiere, numărul de celule, populațiile de celule utilizate, intervalul de timp. În final, am redus un protocol de generare a celulelor dendritice (DC) în 7 zile cu ajutorul mediului specializat DC Generation Medium (Promocell) la doar 2 zile: inducția celulelor DC din monocite timp de 24 de ore, urmată de maturarea lor timp de 24 de ore cu stimuli proinflamatorii.

Gradul de maturare a fost apreciat pe baza expresiei markerilor fenotipici CD83, CD80, HLA-DR de către celulele obținute, în timp ce își păstrează expresia de CD45 și scad expresia de CD14, marker caracteristic monocitelor (Fig.11).

Utilizând celulele aderente la plastic din fracția de celule mononucleare (Fig.11, A-D) am obținut peste 90% celule în fracția de monocite, care și-au redus expresia de CD14 și exprima CD80 (>70%), existând o populație CD83 high și o populație CD83 low. În cazul în care încercăm diferențierea cu întreaga

populație de mononucleare (Fig.11 E-F), populația de monocite e mult mai mică (20-25%), și nu se diferențiază în totalitate în celule dendritice. Totuși, în acest caz, putem efectua condiționarea APC și stimularea limfocitelor simultan.

În Figura 11 se vede cum monocitele (A, albastru deschis) încep să exprime CD80 (B, P1, albastru închis) în proporție de 70%, dar și markerul de maturare al celulelor dendritice CD83 (C), în timp ce își reduc expresia de CD14 (D).

În continuare, celulele dendritice derivate din monocite au fost pulsate cu SLP fluorescente pentru a evalua preluarea peptidelor din mediul de cultură de către APC, în scopul prezentării și activării limfocitelor T (Fig.12). În figura 12 se vede cum se distinge semnal fluorescent verde datorită pătrunderii peptidului marcat în celule. D-E Analiză de citometrie în flux. Se disting 2 populații CD83+ (albastru), înainte de punere în contact (D) și după incubare cu SLP marcat cu fluoresceină (E). Se observă semnalul pe canalul FITC dat de preluarea peptidului de celulele prezentatoare de antigen. În roșu, populația de limfocite, care nu prezintă semnal verde, deci nu a preluat SLP din mediu.

II.3. Teste de toxicitate *in vivo* a peptidelor sintetice lungi (SLPs)

Pentru studiul inițial, de toxicitate pe model animal am stabilit următorul protocol:

Specie: șobolan Wistar

Doza: o singură doză

Loturi: control și experimental (20/lot, 10 M/10 F)

Durată: laparoscopie exploratorie și excizie chirurgicală splină la 2 săptămâni de la administrare

Mortalitate/examinare animale: zilnic

Examinare clinică: săptămânală, cu examinare nazală pentru reatogenicitate locală

Greutate: măsurată săptămânal

Temperatura: măsurată zilnic timp de 2 săptămâni; oprirea experimentului pentru animalele care prezintă febră mai mult de 24 de ore

Mâncare: alimentație normală standard și apă *ad libitum*

Răspuns imun celular: recoltare sânge periferic și flowcitometrie la 7 și la 14 zile

Au fost constituite 2 loturi pentru animalele de experiment, șobolani Wistar: 1 lot control (n = 20) și un lot experimental (n = 20). Lotului control al animalelor de experiment li s-a administrat vitamina A uleioasă, 10 uL / nară. Amestecul de 11 peptide sintetice lungi diluate în DMSO la o concentrație de 45 uM / peptid a fost suspendat 1:1 vol:vol în soluție uleioasă de vitamina A, din care s-au administrat 10 uL /nară la fiecare animal din lotul experimental. Pentru administrarea intranazală a produsului specific fiecărui lot, animalele de experiment au fost anesteziate, folosind protocolul de anestezie VIMA, anestezie volatilă cu Sevofluran 8% în oxigen pentru inducție și 3,5% anestezic în oxigen pentru menținere pe durată administrării intranazale. Au fost monitorizați parametrii cardiaci și respiratori ai animalului de experiment pe toată durata experimentului.

La examinările zilnice am constatat:

- greutatea corporală a fost menținută la aproximativ 300 g
- mucoasa nazală nu a prezentat semne ale inflamației locale (rubor, calor, edem)
- temperatura corpului a fost menținută în limite normale
- nu a decedat nici unul dintre animalele de experiment
- laparoscopia exploratorie a fost efectuată la 14 zile de la administrarea intranazală a peptidelor și nu au fost constatate modificări morfologice la nivelul organelor interne; splina a fost excizată chirurgical selectiv la 5 animale/lot și nu au fost observate modificări morfologice sau de dimensiune ale acestui organ.

Am determinat profilul imun al animalelor de experiment înainte și la un interval de 7, respectiv 14 zile de la administrarea intranazală a amestecului de peptide sintetice lungi. Amestecul de 11 peptide sintetice lungi diluate în DMSO la o concentrație de 45 uM/ peptid a fost suspendat 1:1 vol:vol în soluție uleioasă de vitamina A, din care s-au administrat 10 uL /nară la fiecare animal din lotul experimental. Sângele periferic folosit pentru analiza imunofenotipică a fost colectat pe anticoagulant EDTA din vena femurală. Marcarea s-a făcut cu anticorpi anti-CD3 și anti-CD4 de șobolan (Biolegend), care au fost incubăți timp de 30 min cu proba de sânge, după care s-a efectuat liza eritrocitelor, urmată de spălare și resuspendarea probelor în PBS. Achiziția datelor s-a făcut cu citometrul în flux FACSVerse (BD), iar analiza cu software-ul FloJo.

În figura 13 sunt prezentate 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. În urma analizei populațiilor și subpopulațiilor de limfocite la animalele incluse în experiment, am constatat că nu au existat modificări semnificative nici la nivelul limfocitelor în ansamblu, și nici la nivelul subpopulațiilor specifice de limfocite T helper sau citotoxice.

III. Determinarea eficienței amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2

III.1. Determinarea ex vivo a reactivității limfocitelor T provenite de la pacienți COVID-19 față de amestecul de peptide

Celule mononucleare izolate de la pacienți convalescenți, care au trecut prin boala COVID-19, au fost decongelate și puse în cultură la o densitate de

2.5x10⁶ celule/mL, în plăci cu 12 godeuri, în mediu XVIVO10, suplimentat cu 10% ser uman. Au fost luate în studiu 12 probe de celule provenite de la pacienți COVID-19, denumite în continuare CoPx și 4 probe provenite de la persoane sănătoase, neexpuse la SARS-CoV-2, denumite Ctrlx, unde x reprezintă un indice numeric.

A doua zi, fiecare probă a fost tratată, în paralel, cu: (1) amestecul de peptide vaccinale P11, la concentrația de 5μM/fiecare peptid, dizolvat în DMSO, (2) amestecul PepTivator SARS-CoV-2 Prot_S (Miltenyi), dizolvat, de asemenea, în DMSO, sau (3) nestimulată/control DMSO.

Simultan, au fost adăugate la mediul de cultură Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28, pentru a stimula expansiunea limfocitelor T. În ziua următoare, apoi la fiecare 2 zile, s-a adăugat IL-2 la concentrația de 50U/mL, factor mitogen pentru celulele T.

Au fost urmărite modificările de la nivelul subpopulațiilor de limfocite T helper (CD4+) și T citotoxice (CD8+), atât în ceea ce privește fenotipul de memorie, cât și markerii de activare CD69 și CD134 (OX40). Imunofenotiparea celulelor aflate în cultură s-a realizat prin marcarea cu anticorpi specifici și evaluare prin citometrie în flux, cu ajutorul aparatului FACSVerse (BD). Panelul de markeri folosit a fost următorul:

Panel FCM

Tub 1. CD3-PB/CD8-BV510/CCR7-FITC/CD4-PE/CD45RA-PECy7/CD56-APC

Tub 2. CD3-PB/CD8-BV510/CD69-FITC/CD134-PE/CD4-APC

Determinările s-au realizat în ziua punerii în cultură a celulelor Z0 și la o săptămână de la stimulare.

Analiza datelor de citometrie s-a realizat cu ajutorul programului FlowJo 10 (BD), iar partea de statistică cu GraphPad Prism 7. Strategia de gating pentru subpopulațiile de memorie este prezentată în Figura 14.

În funcție de expresia markerilor CCR7, un receptor de chemokine, care favorizează migrația către ganglionii limfatici, și CD45RA, izoforma lungă a receptorului pan-leucocitar CD45, limfocitele T helper, respectiv T citotoxice, au fost clasificate în următoarele subseturi de memorie:

- naive, T_N , care exprimă ambii markeri CD45RA+CCR7+;
- central memory, T_{CM} , care după întâlnirea cu antigenul, pierde expresia de CD45RA, are mare capacitate proliferativă, dar nu efectoare, și tendința de a migra către ganglionii limfatici;
- efector memory, T_{EM} , efectoare de memorie, rezultate prin diferențierea în continuare a celulelor de memorie, sub acțiunea susținută a stimulului antigenic, și care nu prezintă nicio expresie de markeri;
- celule T, numite T_{EMRA} , care reînchiziționează markerul CD45RA după încetarea stimulării antigenice.

În figura 14 se vede cum din populația de celule viabile, evidențiate pe axele FSC/SSC corespunzătoare parametrilor fizici de dimensiune și granularitate, au fost alese limfocitele T, pe baza expresiei markerului CD3, dintre care au fost identificate celulele T helper, care exprimă co-receptorul CD4. În funcție de prezența sau absența markerilor CCR7 și CD45RA, limfocitele T helper pot fi clasificate în 4 subtipuri de memorie: naive (N), central memory (CM), efector memory (EM) și diferențiate final (EMRA). S-a procedat la fel pentru identificarea subtipurilor de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice CD8+.

În figura 15 se prezintă analiza citometrică a subseturilor de memorie din cadrul limfocitelor T helper în ziua 0, la punerea în cultură: naive (N) CD45RA+CCR7+, central memory (CM) CD45RA-CCR7+, efector memory (EM) CD45RA-CCR7- și diferențiate final (EMRA) CD45RA+CCR7-.

reprezentate 12 probe provenite de la pacienți COVID-19, notați CoPx, și 4 controale de la indivizi neexpuși.

În figura 16 se prezintă analiza citometrică a subseturilor de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, la punerea în cultură: naive (N) CD45RA+CCR7+, central memory (CM) CD45RA-CCR7+, effector memory (EM) CD45RA-CCR7- și diferențiate final (EMRA) CD45RA+CCR7-. Sunt reprezentate 12 probe provenite de la pacienți COVID-19, notați CoPx, și 4 controale de la indivizi neexpuși.

În figura 17 se prezintă frecvența relativă a subseturilor de memorie în cadrul populației de limfocite T citotoxice (sus) sau de limfocite T helper (jos), în ziua 0, înainte de stimularea *in vitro* cu peptide.

În momentul inițial, înainte de stimularea *in vitro*, nu s-au observat diferențe semnificative între pacienții COVID-19 și indivizii neexpuși, în ceea ce privește distribuția relativă a limfocitelor T helper și citotoxice în subseturile de memorie (Fig.17).

În grupul de limfocite T citotoxice, populația de celule T_{EMRA} este bine reprezentată, fiind ușor crescută în lotul pacienților trecuți prin boală, cu unii dintre indivizi prezentând chiar o frecvență de 70-80% a acestor celule, fapt descris și în cazul altor infecții virale, după încetarea stimulării antigenice.

În Fig. 18 și Fig.19 sunt prezentate distribuțiile relative în subseturi de memorie ale limfocitelor T citotoxice, respectiv helper, după 7 zile de stimulare *in vitro* cu peptidele vaccinale P11, cu un amestec de peptide din structura proteinei S, PepTivator sau nestimulate.

III.2. Determinarea răspunsului *in vivo* față de peptidele vaccinale la șoareci umanizați

Imunogenicitatea amestecului de peptide SLP a fost evaluat în șoareci umanizați HuPBMC-Nog (Taconic), al căror sistem imun a fost reconstituit cu celule mononucleare umane cu alele HLA cunoscute. Au fost imunizate 4 loturi

de animale, fiecare lot purtând celule mononucleare umane de la un singur donator, cu posibilitatea de a recunoaște un număr diferit de peptide din vaccin, astfel:

- Donatorul 1 (D1), 6 SLP recunoscute de alele HLA clasa I și clasa II, 2 SLP recunoscute doar de alele clasa I;
- Donatorul 2 (D2), 3 SLP clasa I+clasa II, 6 clasa II;
- Donatorul 3 (D3), 1 SLP recunoscut doar de HLA I;
- Donatorul 4 (D4), nici un peptid recunoscut.

Animalele au fost imunizate prin administrarea intranazala a amestecului de peptide, dizolvat in vitamina A. S-au administrat 100ug din fiecare SLP per animal, cu rapel la ziua 7 și ziua 14. In cazul lotului D1, 6 animale au fost imunizate cu P11, iar la restul s-a administrat doar vitamina A.

Evaluarea răspunsului imun specific s-a realizat prin izolarea de celule mononucleare și restimulare in vitro cu peptidele vaccinale, în prezența de factori de diferențiere a monocitelor în celule dendritice și factori mitogeni pentru limfocite T. Stimularea celulară in vitro s-a facut cu o concentrație de 5uM/peptid SLP. S-au determinat prin marcare cu anticorpi specifici si analiză modificările subtipurilor de memorie ale limfocitelor T și apariția markerilor de activare CD69 și CD134. Am comparat reactivitatea limfocitelor la 7 și 14 zile de la administrarea vaccinului cu reactivitatea înainte de administrare.

Celulele mononucleare au fost izolate prin centrifugare în gradient de densitate, în prezența reactivului Ficoll, din sânge periferic colectat de la fiecare animal experimental și amestecat în cadrul unui lot. Dintre acestea, 2×10^5 celule au fost utilizate pentru analiza citometrică conform panelului și strategiei de analiză, 1×10^6 au fost supuse restimulării antigenice, iar restul de celule au fost congelate în vederea extracției ARN și secvențierii genice pentru identificarea TCR.

Celulele mononucleare izolate de la animalele experimentale înainte de administrarea vaccinului, cu excepția celor provenite de la lotul D1, au prezentat

o viabilitate scăzută, care ar putea fi atribuită perioadei scurte de timp de la momentul reconstituirii sistemului imun la aceste animale, precum și tipului HLA cu care s-a realizat reconstituirea. În timpul stimulării in vitro a celulelor provenite de la animalele nevaccinate, viabilitatea lor scade dramatic, proliferând doar un procent foarte mic de celule, în special limfocite T citotoxice. Limfocitele T, atât citotoxice, cât și helper, prezintă înainte de stimulare in vitro un fenotip efector, urmând ca în urma stimulării să dobândească expresie de CCR7. Celulele provenite de la lotul D3 prezintă, spre deosebire de restul, fenotip de memorie cu expresie de CD45RA (EMRA), expresie pe care o păstrează in vitro. În ceea ce privește expresia markerilor de activare, constatăm o expresie nespecifică indusă de cultivare și stimulare, marcat mai mică însă la lotul D4, care nu prezintă nicio alelă HLA care poate recunoaște peptidele din vacin.

Celulele mononucleare izolate la o săptămână de la administrarea vaccinului la loturile de experiment au prezentat o viabilitate bună, ambele subpopulații de limfocite T afișând, din nou, preponderent un fenotip efector de memorie, care după restimulare in vitro, devine de timp de memorie centrală cu expresie de CCR7. În cazul celulelor nestimulate provenite de la loturile D2 și D3, însă, remarcăm prezența unui fenotip celular de limfocite naive, care ar putea fi rezultat din proliferarea unor rare celule naive, în absența unui stimul recunoscut de celulele efectoare. Constatăm o activare uniformă și nespecifică a celulelor, indiferent de prezența peptidelor în mediul de cultură, care poate fi atribuită cultivării ex vivo, dar și activării grefă-contra-gazdă a limfocitelor umane față de proteine de natură murină.

In figura 20 se prezinta analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, la animale nevaccinate.

In figura 21 se prezinta analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 7 de la stimulare in vitro cu peptidele SLP, la animale nevaccinate.

In figura 22 se prezinta analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 0, înainte de restimulare in vitro, la o săptămână de la administrarea vaccinului.

In figura 23 se prezinta analiza citometrică a subseturile de memorie din cadrul limfocitelor T citotoxice în ziua 7 de la stimulare in vitro cu peptidele SLP (dreapta) vs. celule nestimulate (stânga), la animale vaccinate.

III.3. Teste de eficacitate *in vivo* pe model de șoarece umanizat NOG grefat cu PBMCs umane

Studiul a fost efectuat pe 50 de șoareci umanizați huPBMC-NOG, grefați cu PBMC umane provenite de la 4 donatori cu imunofenotip cunoscut:

- Donator 1 (D1) – 14 șoareci/lot; HLA clasa I - A*01:01:01G, 11:01:01G; B*08:01:01G, 45:01:01G; C*07:01:01G, 16:01:01G; HLA clasa II - DRB1*09:01:02G, 11:01:02; DRB3*03:01:01G; DRB4*01:01:01G; DQB1*03:03:02G, 05:02:01G; DPB1*04:01:01G. Pentru acest lot, prezentarea antigenică a peptidelor vaccinale, conform predicțiilor *in silico*, a fost posibilă pentru 6 dintre peptidele de tip sintetice lungi (6 SLPs) și pentru 2 peptide care se leagă de molecule HLA clasa I;
- Donator 2 (D2) – 12 șoareci/lot; HLA clasa I - A*03:01:01G, 25:01:01G; B*07:02:01G, 50:01:01G; C*06:02:01G, 07:02:01G; HLA clasa II - DRB1*07:01:01G, 13:01:01G; DRB3*01:01:02G; DRB4*01:01:01G; DQB1*02:01:01G, 06:03:01G; DPB1*02:01:02G, 03:01:01G. Pentru acest lot, prezentarea antigenică a peptidelor vaccinale, conform predicțiilor *in silico*, a fost posibilă pentru 3 dintre peptidele de tip sintetic lungi (6 SLPs) și pentru 6 peptide care se leagă de molecule HLA clasa II;
- Donator 3 (D3) – 12 șoareci/lot; HLA clasa I - A*02:01:01G, 29:02:01G; B*44:03:01G, 57:01:01G; C*06:02:01G, 16:01:01G; HLA clasa II - DRB1*07:01:01G, 09:01:02G; DRB4*01:01:01G; DQB1*03:03:02G;

DPB1*02:01:02G, 04:01:01G. Pentru acest lot, prezentarea antigenică a peptidelor vaccinale, conform predicțiilor *in silico*, a fost posibilă pentru 1 peptid care se leagă de molecule HLA clasa I;

- Donator 4 (D4) – 12 șoareci/lot; HLA clasa I - A*30:01:01G, 68:01:01G; B*15:03:01G, 42:01:01G; C*05:01:01G, 17:01:01G; HLA clasa II - DRB1*01:02:01G, 07:01:01G; DRB4*01:01:01G; DQB1*02:01:01G, 05:01:01G; DPB1*13:01:01G, 15:01:01G. Pentru acest lot, prezentarea antigenică a peptidelor vaccinale, conform predicțiilor *in silico*, nu era posibilă, astfel încât acest lot a fost considerat control.

Studiul a fost efectuat cu acordul Comisiei de etică a Spitalului Clinic Județean de Urgență „Pius Brînzeu” Timișoara, în Biobaza acreditată a OncoGen.

Fiecare șoarece de tip NOG a fost anesteziat folosind metoda VIMA (Volatile Induction and Maintenance Anesthesia). Inducerea anesteziei s-a efectuat volatil cu 8% Sevofluran în oxigen, urmată de menținerea anesteziei cu 3,5% Sevofluran în oxigen. La nivelul spațiului inghinal s-a efectuat o incizie de aproximativ 5-6 mm, prin abord minim invaziv. S-a identificat vena femurală și a fost puncționată cu ac subțire, recoltându-se aproximativ 100-200 microlitri de sânge venos/animal. Ulterior inciziei și recoltării s-a efectuat sutura plăgii într-un singur plan cu fir de sutură resorbabil 4-0.

Amestecul de peptide vaccinale a fost administrat intranasal, 5 microlitri peptid/nară, la concentrația stabilită în etapa anterioară ca nefiind toxică, raportat la suprafața mucoasei nazale a animalului de experiment. Schema de recoltare sânge venos și administrare peptide vaccinale a fost următoarea: administrare peptide Z0 și Z7; recoltare sânge venos periferic Z 0, Z7, Z14.

Sângele recoltat de la fiecare lot de șoareci a fost „pooled”, iar celulele de tip PBMC au fost separate folosind centrifugarea în gradient de densitate. O parte din celule au fost utilizate pentru purificarea RNA și efectuarea analizei de secvențiere genică (NGS), conform protocolului recomandat de producător

pentru kit-ul Oncomine Human Immune Repertoire, Oncomine TCR beta-SR Assay (IonTorrent). Pe scurt, protocolul de lucru presupune purificarea RNA (GeneJET Whole Blood RNA Purification Mini Kit, Thermo Scientific), cuantificarea fluorimetrică (Qubit RNA HS Assay Kit și Qubit 3, Invitrogen), revers-transcripția a 25 ng RNA (SuperScript IV VILO Master Mix, Thermo Scientific) și pregătirea manuală a librăriilor (Ion AmpliSeq Library Kit Plus și Ion Torrent Dual Barcode Kit 1-96). Templating-ul a fost efectuat folosind sistemul Ion Chef, pe chip-uri de 530, 8 librării/chip, urmat de secvențierea genică cu ajutorul sistemului Gene Studio 5, Ion Torrent. Interpretarea rezultatelor a fost realizată cu soft-ul IonReporter – workflow Immune Repertoire.

Repertoriul imun se referă la colecția de receptori ai limfocitelor B și T prezenți la un individ. Receptorii limfocitelor T umane (TCR) sunt heterodimeri care se împart în două clase: TCR- $\alpha\beta$ și TCR- $\gamma\delta$. Celulele T TCR- $\alpha\beta$ constituie cea mai mare parte a repertoriului receptorilor celulelor T (de obicei > 90% din celulele T) și sunt contribuitorii primari la imunitatea adaptativă celulară. Complexul receptor al celulelor B umane (BCR) constă dintr-o subunitate de legare a antigenului care este cunoscută sub numele de imunoglobulină membranară. Imunoglobulina membranară este compusă din două lanțuri ușoare de imunoglobuline (IGL) și două lanțuri grele de imunoglobuline (IGH), precum și două subunități heterodimere de Ig- α și Ig- β . Lanțurile β TCR și IGH-urile BCR sunt formate din regiuni variabile (V), diversitate (D), unire (J) și constante. Recombinarea acestor regiuni, cu adaosuri și/sau deleții suplimentare de nucleotide, dă o mare diversitate de receptori rearanjați pentru a permite recunoașterea a milioane de antigene. Regiunea 3 care determină complementaritatea (CDR3) se află pe joncțiunea V(D)J și este locul principal de contact cu antigenul. Dintre componentele receptorilor celulelor B și T, regiunea CDR3 a lanțului TCR și IGH conține cea mai mare diversitate de secvențe. Această diversitate de secvență poate fi utilizată pentru a urmări

celulele B sau T în probe longitudinale, pentru a măsura diversitatea repertoriului imun și expansiunea clonală și pentru a identifica motivele de aminoacizi legate de expunerea la antigen.

Tabel IX. Tabel rezumativ al numărului de clone identificat la cele 4 loturi de șoareci huPBMC-NOG

	D1	D2	D3	D4
Z0	3280	373	193	34
Z7	120	43	9	1
Z0 + 7 zile cultură	1523	136	1883	8
Z7 + 7 zile cultură	540	152	383	5

În figura 24 sunt prezentați epitopii specifici identificați la cele 4 loturi de șoareci de tip huPBMC-NOG pe baza specificității TCR. Se constată că după administrarea amestecului de peptide lungi sintetice, sunt prezente limfocite T specifice la toate loturile.

Referințe bibliografice :

1. <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
2. Bojin F, Gavriluc 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
3. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med* 2021; 384: 403-416.

4. Ott PA, Hu Z, Keskin DB, Shukla SA, Sun J, Bozym DJ, et al. An immunogenic personal neoantigen vaccine for patients with melanoma. *Nature* 2017; 547: 217-221.
5. Mulligan MJ, Lyke KE, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. *Nature* 2020; 586: 589-593.
6. Rodda LB, Netland J, Shehata L, Pruner KB, Morawski PA, Thouvenel CD, et al. Functional SARS-CoV-2-Specific Immune Memory Persists after Mild COVID-19. *Cell* 2021; 184(1): 169-183.e17.
7. Nelde A, Bilich T, Heitmann JS, Maringer Y, Salih H, Roerden M, et al. SARS-CoV-2-derived peptides define heterologous and COVID-19-induced T cell recognition. *Nature Immunology*, 2021; 22: 74-85.
8. Swadling L, Diniz MO, Schmidt NM, Amin OE, Chandran A, Shaw E, et al. Pre-existing polymerase-specific T cells expand in abortive seronegative SARS-CoV-2. *Nature* 2022; 601: 110-117.
9. Schulien I, Kemming J, Oberhardt V, Wild K, Seidel LM, Kilmer S, et al. Characterization of pre-existing and induced SARS-CoV-2-specific CD8+ cells. *Nature Medicine* 2021; 27: 78-85.
10. Rabu C, Rangan L, Florenceau L, Fortun A, et al. Cancer vaccines: designing artificial synthetic long peptides to improve presentation of class I and class II T cell epitopes by dendritic cells. *OncImmunology*, 2019; 8: 4, e1560919. doi: 10.1080/2162402X.2018.1560919
11. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_045512.2
12. [http:// crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/](http://crdd.osdd.net/raghava/ifnepitope/)
13. <http://crdd.osdd.net/raghava/tox- inpred/>
14. <http://www.ddg- pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>
15. <http:// crdd.osdd.net/raghava/toxinpred/>

16. Larsen MV, Lundegaard C, Lamberth K, Buus S, Lund O, Nielsen M. Large-scale validation of methods for cytotoxic T-lymphocyte epitope prediction. *BMC Bioinformatics* 2007; 8: 424.
17. <https://www.iedb.org/>
18. Constantinescu I, Boscaiu V, Cianga P, Dinu AA, Gai E, Melinte M, Moise A. The frequency of HLA alleles in the Romanian population. *Immunogenetics*, 2016; 68(3): 167-78; doi: 10.1007/s00251-015-0891-9
19. Abraham Peele K, Srihansa T, Krupanidhi S, Vijaya Sai A, Venkateswarulu TC. Design of multi-epitope vaccine candidate against SARS-CoV-2: a in-silico study. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* 2020. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32419646/>
20. Enayatkhani M, Hasaniazad M, Faezi S, Guklani H, Davoodian P, et al. Reverse vaccinology approach to design a novel multi-epitope vaccine candidate against COVID-19: an *in silico* study. *J Biomol Struct Dyn.*, 2020;1-16; doi: 10.1080/07391102.2020.1756411.
21. <http://150.146.2.1/C-IMMSIM/index.php>
22. Rapin N, Lund O, Bernaschi M, Castiglione F. Computational Immunology Meets Bioinformatics: The use of Prediction Tools for Molecular Binding in the Simulation of the Immune System. *PLOS One*, 2010; 5(4): e9862. doi:10.1371/journal.pone.0009862

REVEDICARI

1. Metoda de realizare a amestecului de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 **caracterizată prin aceea că se realizează prin parcurgerea următoarelor etape:**

- Identificarea epitopilor imunogenici din structura SARS-CoV-2 pe baza prezentării specifice a acestor epitopi de către moleculele MHC caracteristice populației din România, prin metode in silico de predicție
- Generarea peptidelor lungi sintetice formate din 2 epitopi, unul specific pentru MHC clasa I (9 AA) și unul specific pentru MHC clasa II (15 AA), legați printr-un linker de 6 AA
- Testarea in silico a toxicității, alergenității, stabilității structurii 3D, a capacității de legare de TLR, a dinamicii moleculare și a generării răspunsului imun
- Testarea in vitro (pe culturi celulare) și in vivo (pe model animal) a toxicității amestecului de peptide lungi sintetice (SLPs)
- Testarea eficacității amestecului de SLP de a genera răspuns imun celular (limfocite Th și Tc) in vitro (pe culturi celulare) și in vivo (pe model animal)

2. Produs amestec de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 realizat conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că se definește și prin următoarele :**

- Niste epitopi imunogenici selectați ca fiind specifici pentru moleculele MHC clasa I ale populației din România sunt: TRFQTLALHRSYLT, PINLVRDLPQGFSAL
- Niste epitopi imunogenici selectați ca fiind specifici pentru moleculele MHC clasa II ale populației din România sunt: CVADYSVLY,

NYNYLYRLF, RLFKSNLK, VLNDILSRL, YEQYIKWPW,
YLQPRTFLL, VRFPNITNL, TRFQTLLAL, LTDEMIAQY

- Niste peptide lungi sintetice (SLPs) din amestec în număr de 9, având următoarea secvență de aminoacizi, rezultată din combinarea epitopilor specifici MHC clasa I și clasa II și legați prin linker-ul LLSVGG de 6 AA:

TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGNYNYLYRLF,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGVLNDILSRL,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGYEQYIKWPW,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGYLQPRTFLL,
TRFQTLLALHRSYLTLLSVGGVRFPNITNL,
PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLLAL,
PINLVRDLPQGFSAALLSVGGLTDEMIAQY.

- Un amestec de peptide lungi sintetice pentru prevenția infecției cu SARS-CoV-2 mai conține 2 peptide din structura proteinei S, care se leagă de multiple alele MHC: GINITRFQTLLALHRSYLTPG,
VGGNYNYLYRLFRLFRKSNLKPFER
- Un amestec de peptide lungi sintetice are o acoperire de 99,89% pentru populația din România și poate fi solubilizat în vitamina A uleioasă pentru administrare intranasală, în 2 doze

1-1

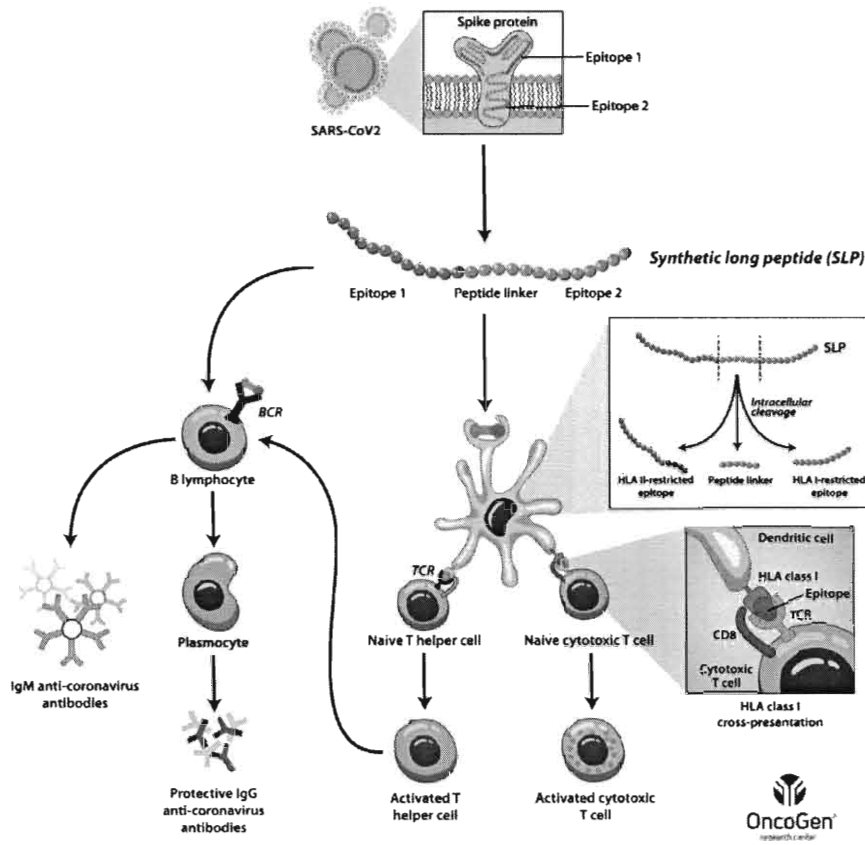
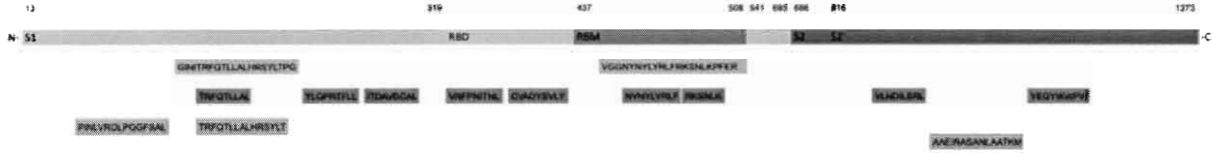


Fig.1

146



Nr.	Secvența aminoacizl	Pozitia	MHC clasa I	MHC clasa II
1.	GINITRFQTLALHRSYLTTPG	232-252	B*08:01; C*07:01;	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
2.	VGGNYNYLYRFRKSNLKPFER	445-466	A*24:02; B*08:01; C*07:01; A*03:01; A*11:01	DRB1*11:04; 11:01; 16:01
3.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGCVADYSVLY	(236-250); (361-369)	B*35:01; A*01:01; A*11:01;	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
4.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGNYNYLYRLF	(236-250); (448-456)	A*24:02	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
5.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGRLFRKSNLK	(236-250); (454-462)	A*03:01; A*11:01	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
6.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVLNDILSRL	(236-250); (976-984)	A*02:01;	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
7.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYEYIKWPW	(236-250); (1206-1214)	B*18:01;	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
8.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGYLQPTFLL	(236-250); (269-277)	A*02:01; B*08:01	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
9.	TRFQTLALHRSYLTLLSVGGVRFNITNL	(236-250); (327-335)	C*07:01	DRB1*11:04; 11:01; 13:01; 16:01
10.	PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTRFQTLAL	(209-223); (236-244)	C*07:01	DRB*03:01
11.	PINLVRDLPQGFSAALLSVGGTDEMQY	(209-223); (976-984)	A*01:01; B*35:01	DRB*03:01

Fig.2



Fig.3

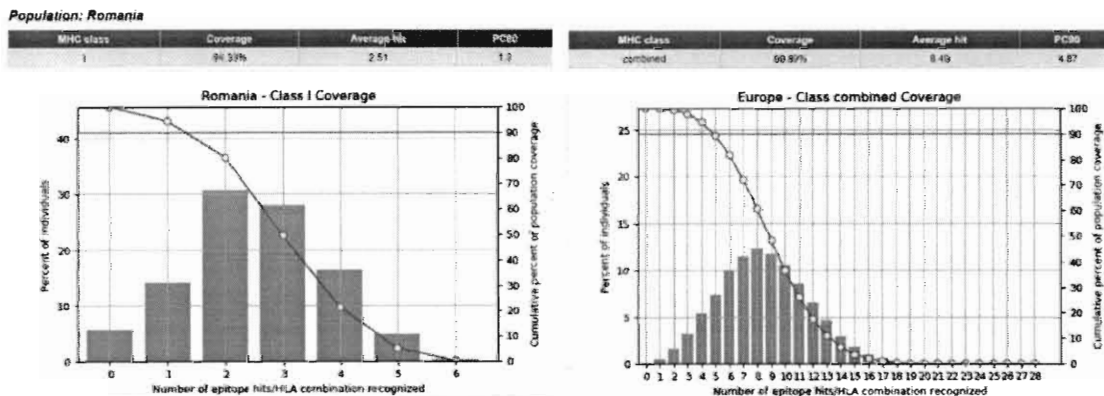


Fig.4

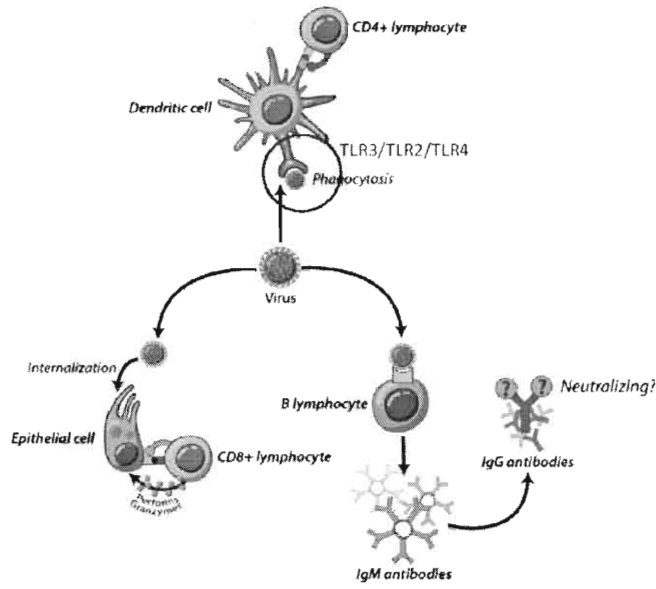


Fig.5

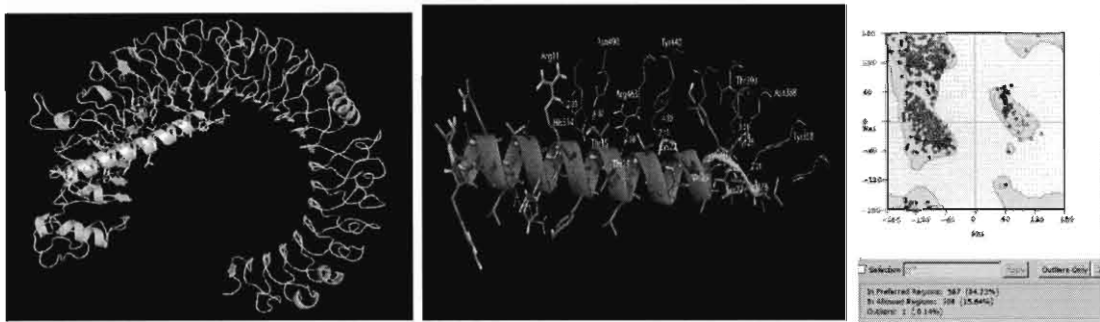


Fig.6

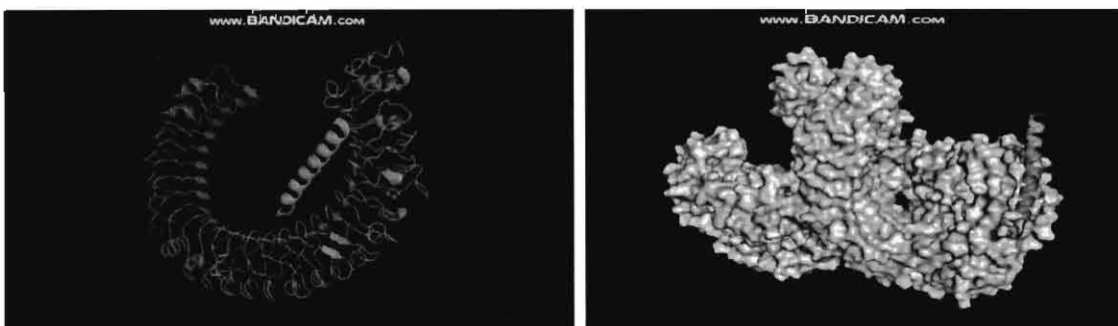


Fig.7

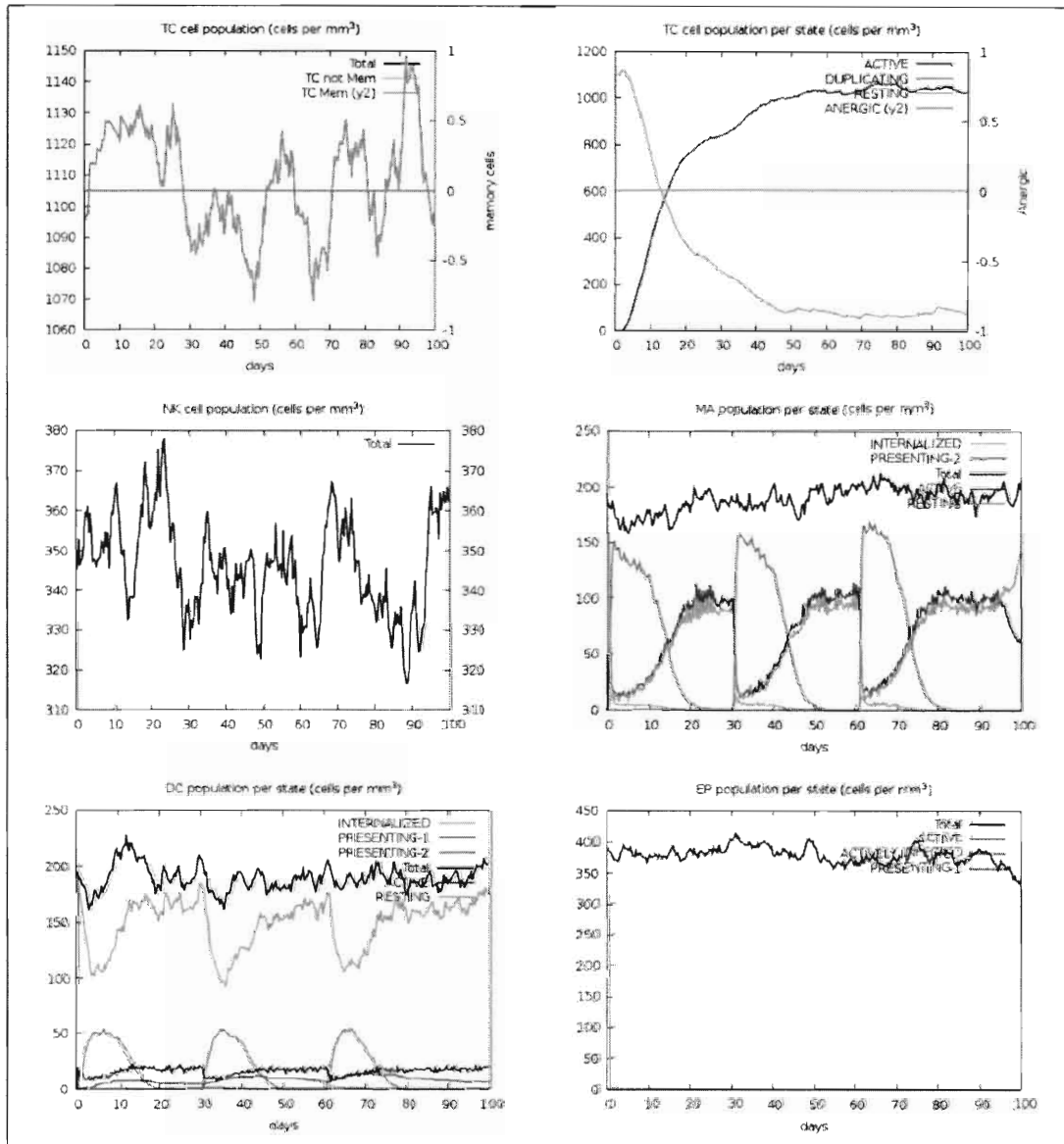


Fig.8

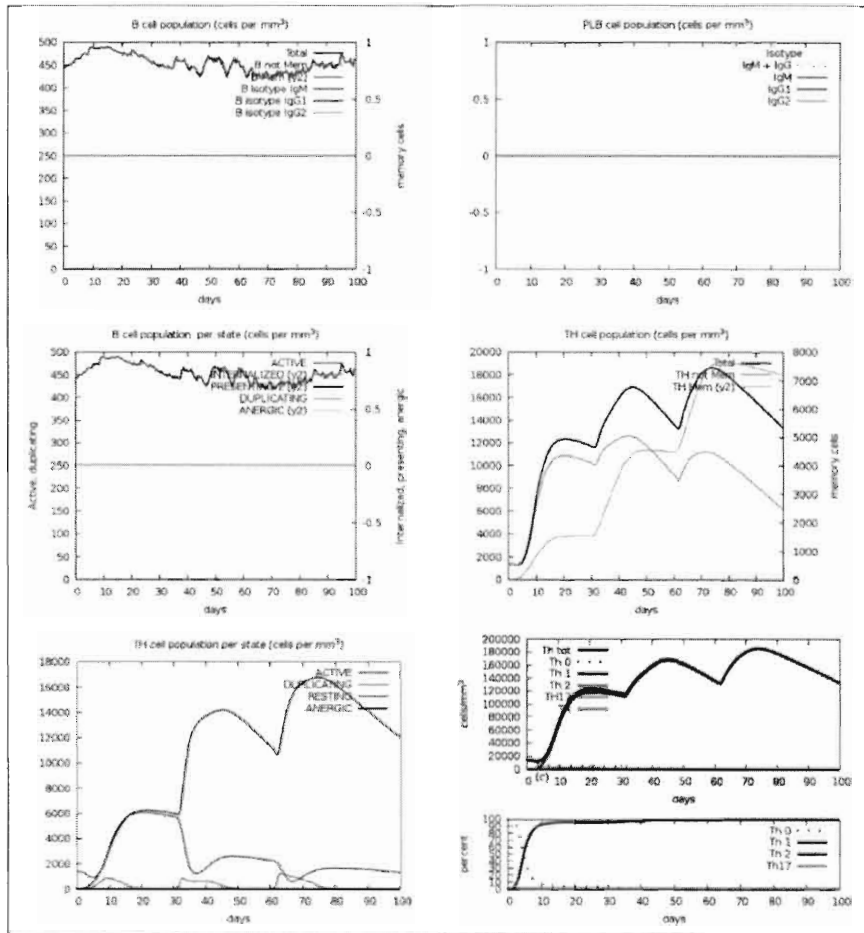


Fig.9

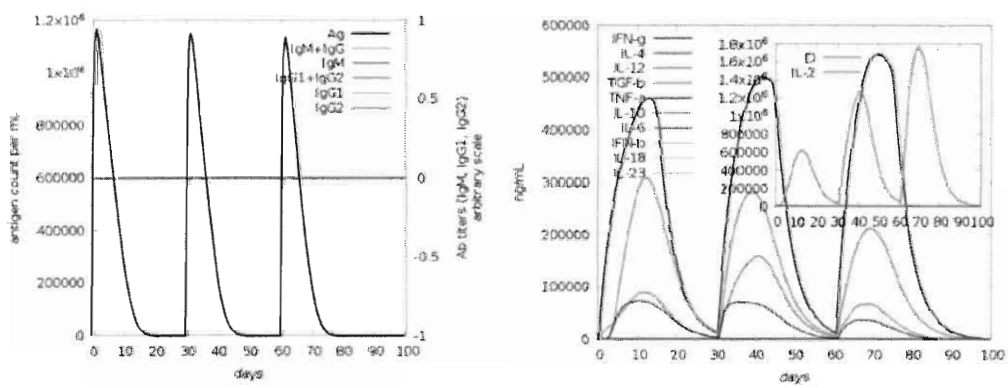


Fig.10

142

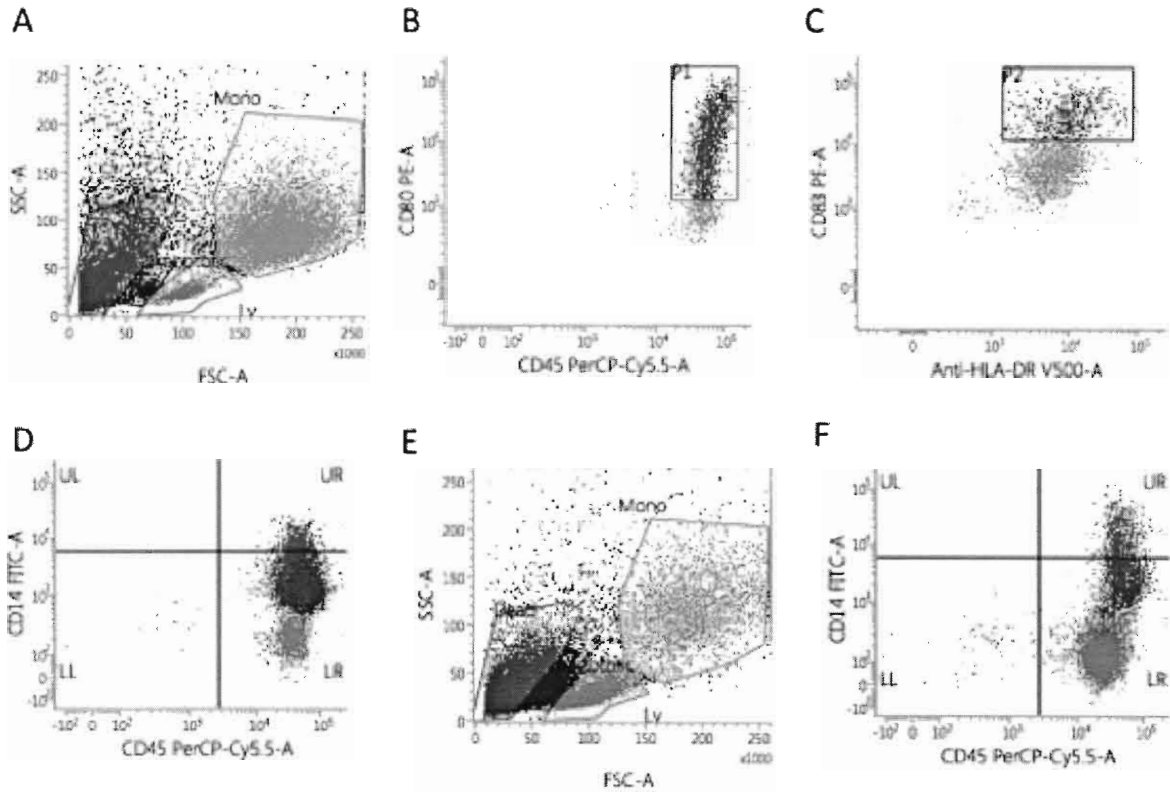


Fig.11

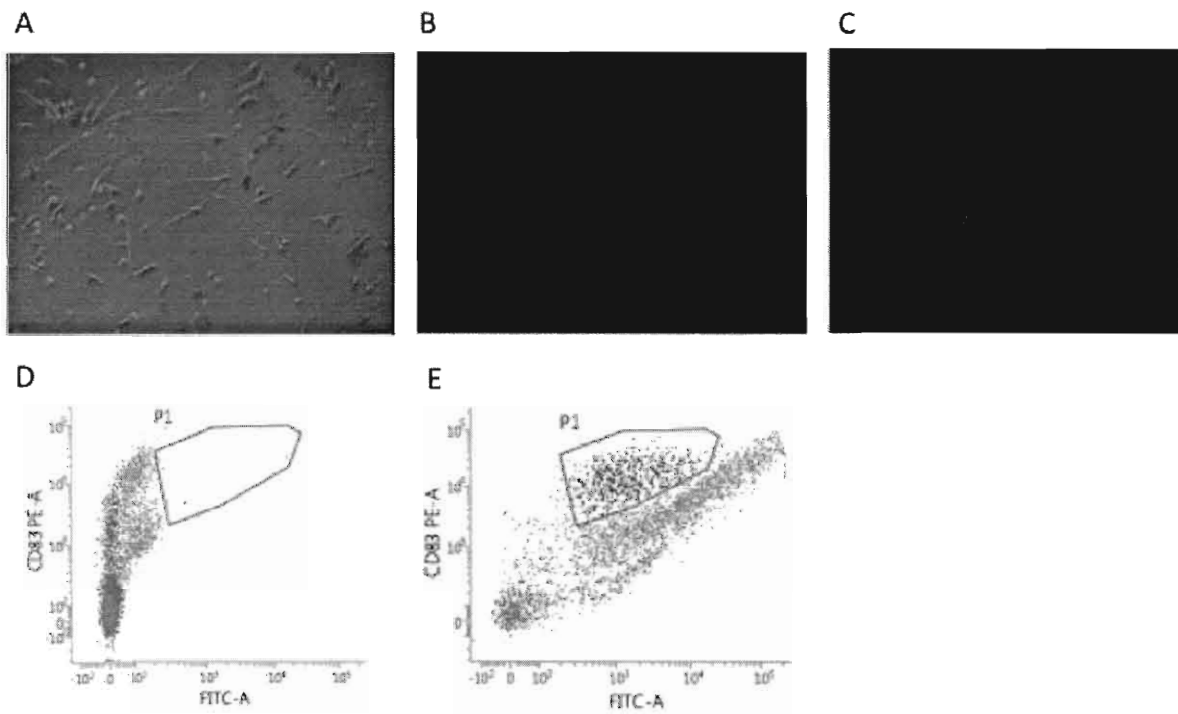


Fig.12

141

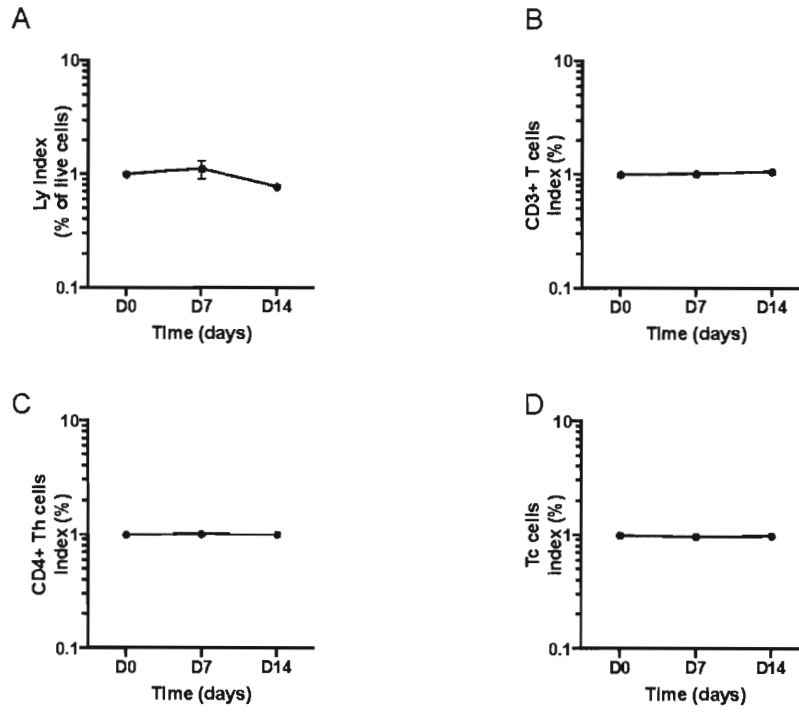


Fig.13

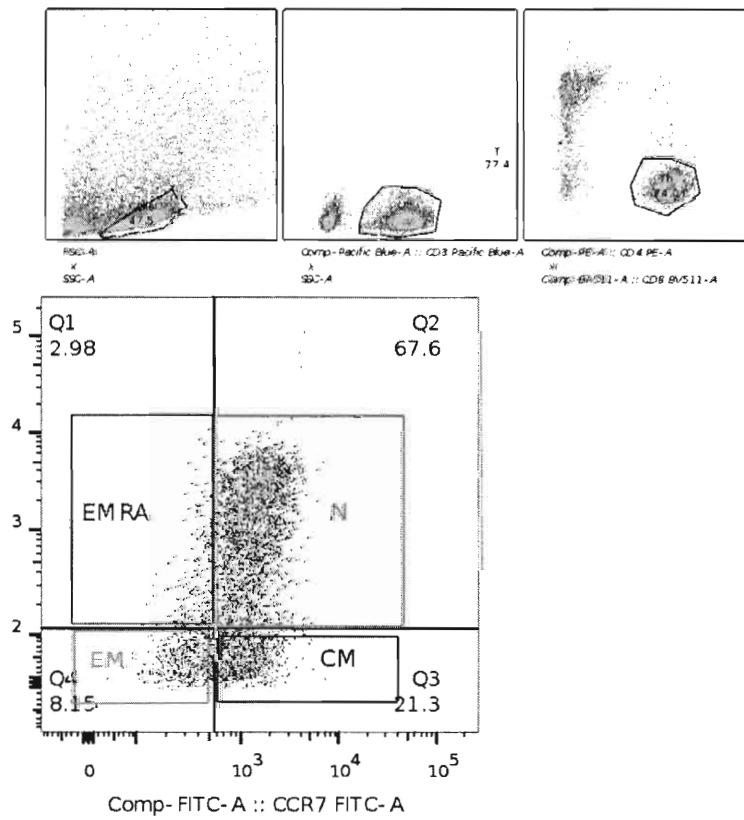


Fig.14

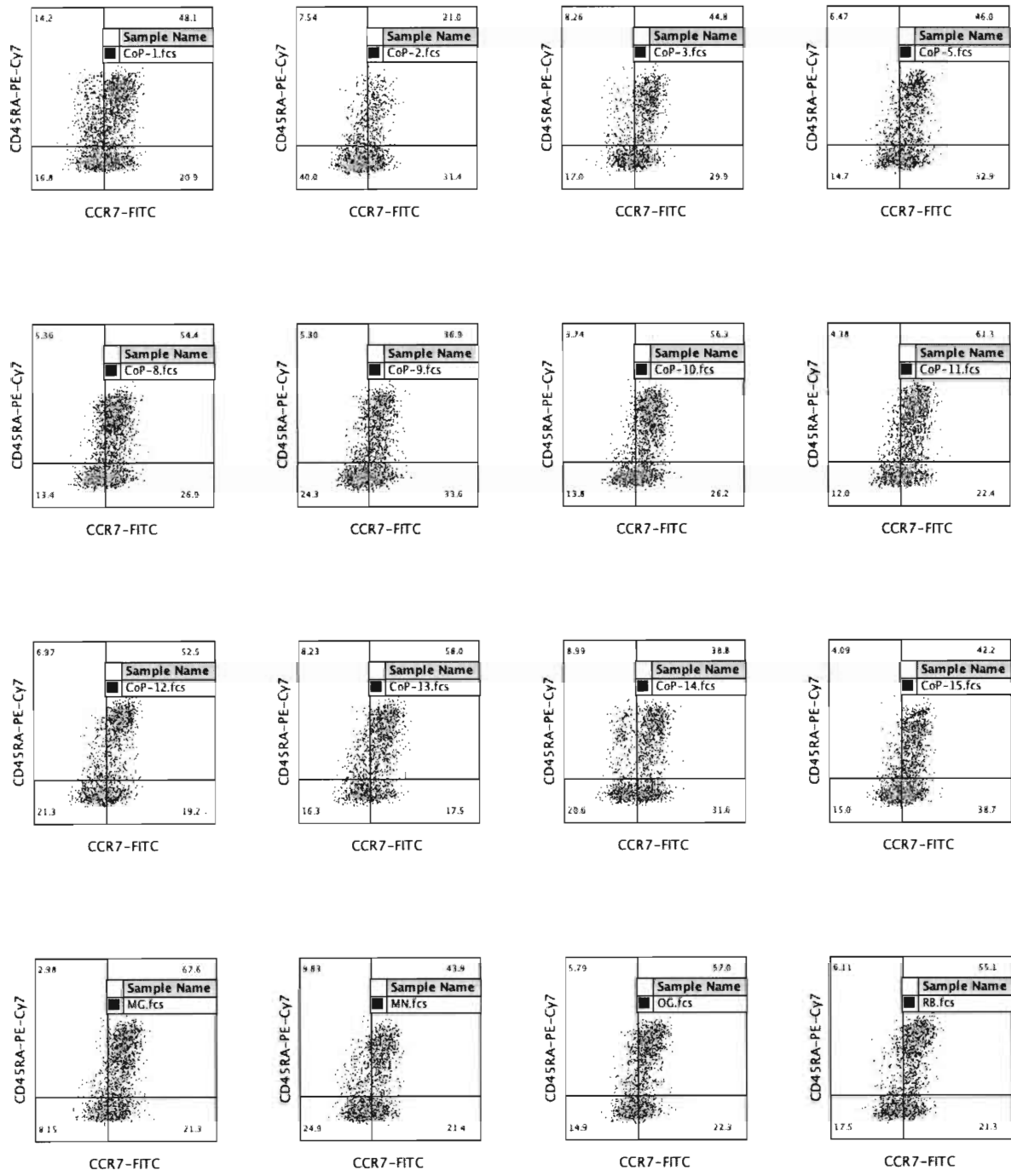


Fig.15

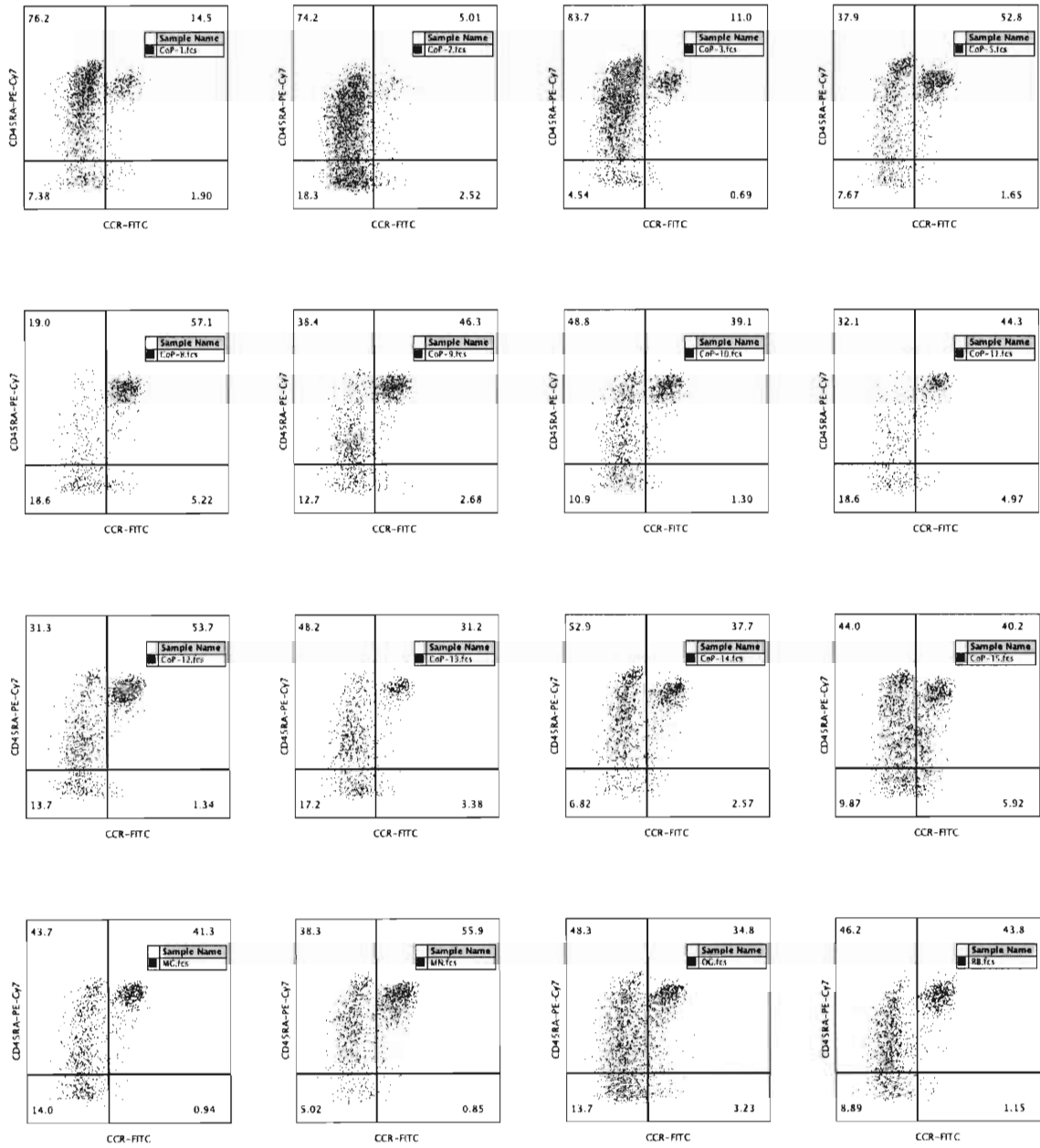
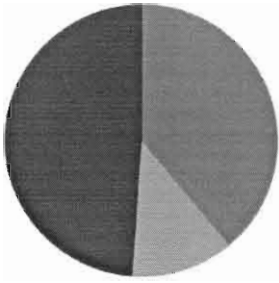
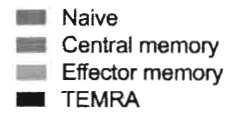
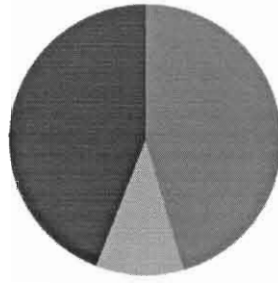


Fig.16

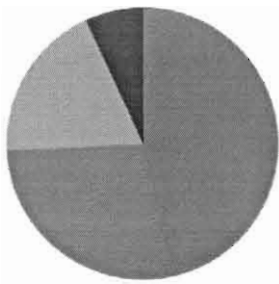
CoP - Tc memory subsets, day 0



Ctrl - Tc memory subsets, day 0



CoP - Th memory subsets, day 0



Ctrl - Th memory subsets, day 0

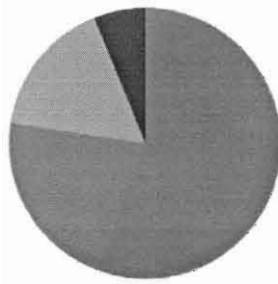
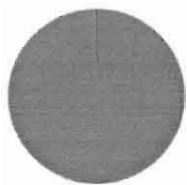


Fig.17

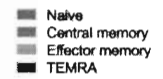
CoP - Tc memory subsets, day 7, P11



CoP - Tc memory subsets, day 7, Pep



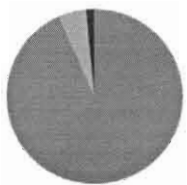
CoP - Tc memory subsets, day 7, unstim



Ctrl- Tc memory subsets, day 7, P11



Ctrl- Tc memory subsets, day 7, Pep



Ctrl- Tc memory subsets, day 7, unstim

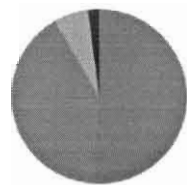


Fig.18

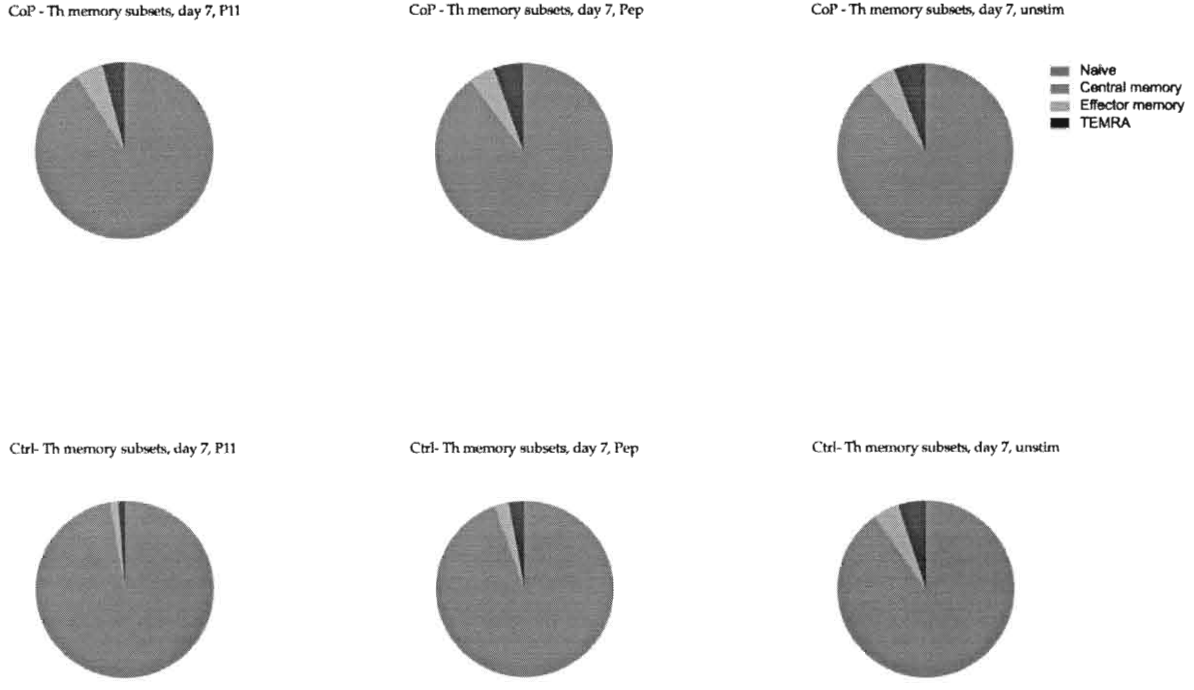


Fig.19

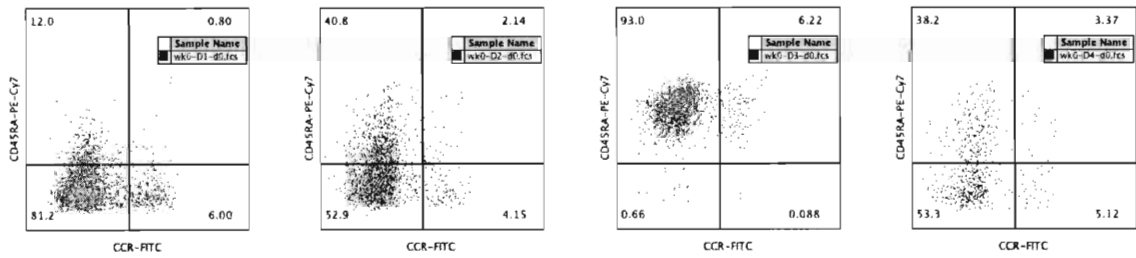


Fig.20

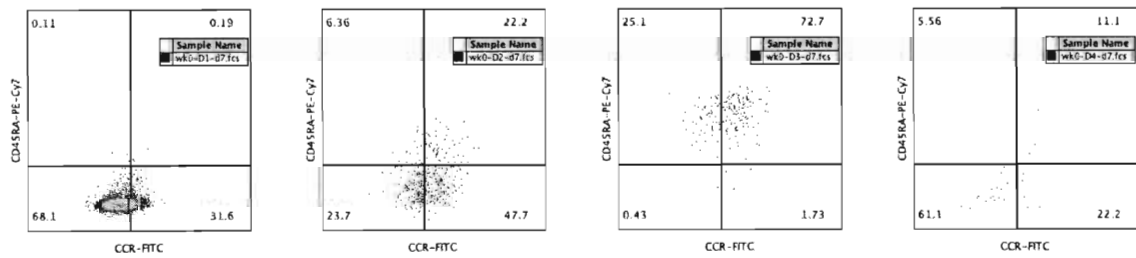


Fig.21

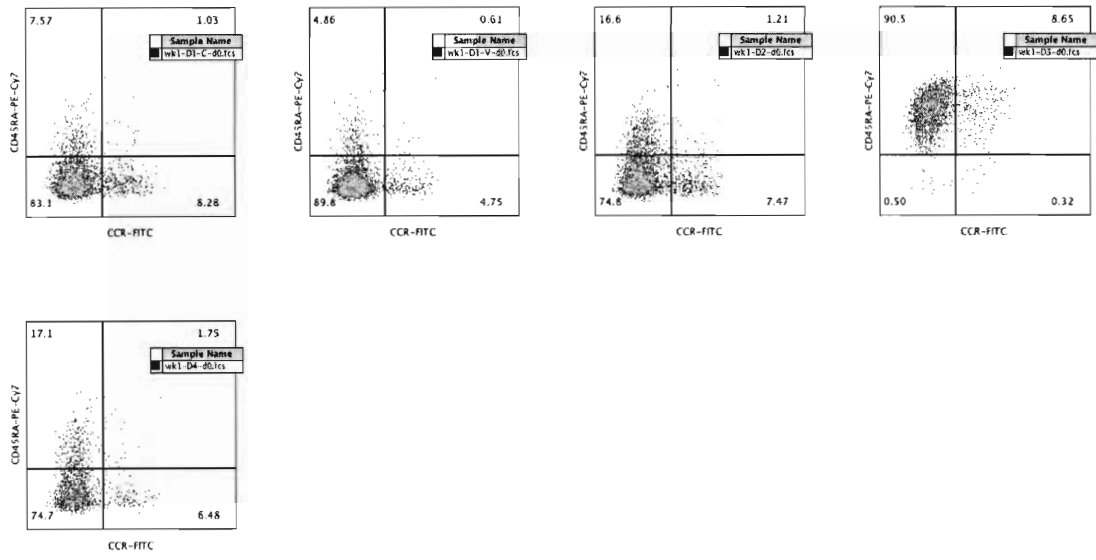


Fig.22

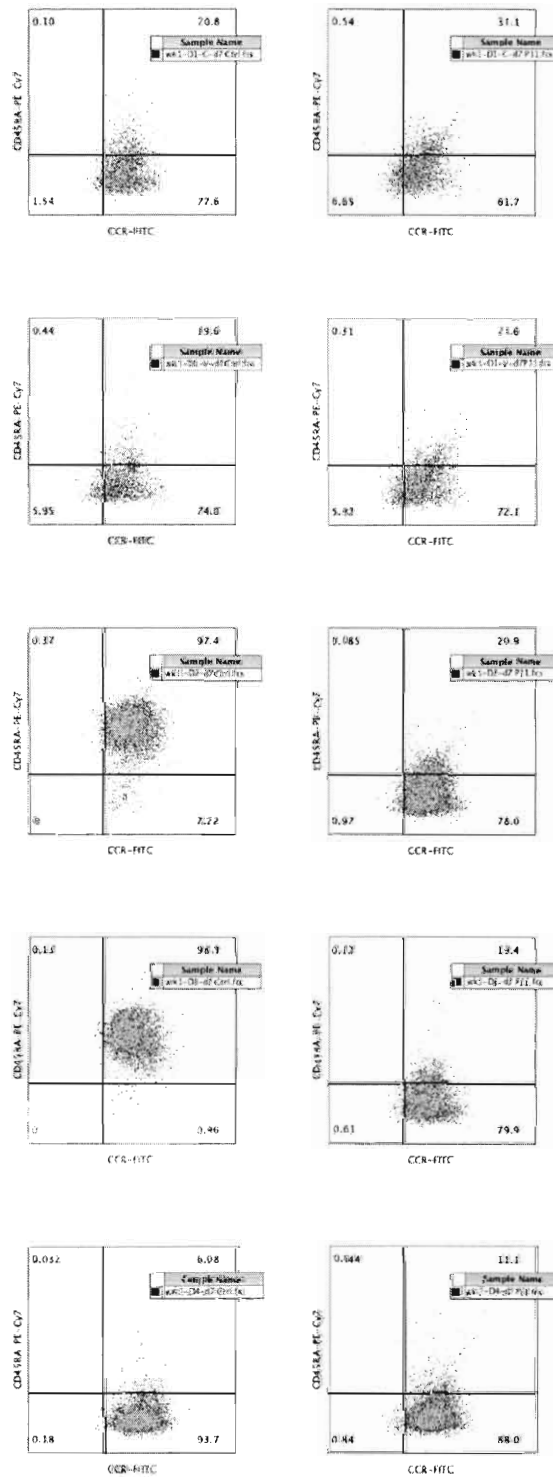


Fig.23

Vaccine epitope	TCR epitope	SA score
D1_PBMC_20_7D		
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
CVADYSVLY	YAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFT	9
RLFRKSNLK	LPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERD	9
NYNLYRLF	NYNLYRLF	9
YEQYKWPW	YEQYKWPWYI	9
YLOPRTFLL	YLOPRTFLL	9
D1_PBMC_27_7D		
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
D2_PBMC_20		
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
PINLVRDLPQGFSAL	TPINLVRDL	8
D3_PBMC_20		
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
YEQYKWPW	YEQYKWPWYI	9
YEQYKWPW	YEQYKWPWYI	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
D3_PBMC_20_7D		
YLOPRTFLL	YLOPRTFLL	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
YEQYKWPW	YEQYKWPWYI	9
RLFRKSNLK	RLFRKSNLK	9
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
VGGNYYLYRLF	RLFRKSNLK	9
VGGNYYLYRLF	ARSVASQSHIAYTMSLGAENSVAYSNSNSIAIPTNFTISVTTEI	9
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
PINLVRDLPQGFSAL	TPINLVRDL	8
D3_PBMC_27		
PINLVRDLPQGFSAL	MGYINVFAPFTIYSL	7
D3_PBMC_27_7D		
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
VRFPNITNL	VQPTESIVRFPNITNLCPF	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
YLOPRTFLL	YVGYLQPRTELL	9
LTDEMIQY	VLPPLLTDemiaQYT	9
D4_PBMC_27_7D		
PINLVRDLPQGFSAL	MIELSLDFYLCFLAFLFLVLIIML	7

Fig.24