



Strategie per sviluppo di molecole antivirali Nucleic acid based dirette verso regioni genetiche di packaging del virus Sars-CoV-2

Proponente responsabile scientifico: Dott.ssa Maria Alfreda Stincarelli

Gruppo ricerca

Dipartimento Medicina Sperimentale e Clinica, Università di Firenze

Lab Virologia

Dott.ssa Maria Alfreda Stincarelli

Dott.ssa Arianna Rocca

Prof. Simone Giannecchini



Background

Dall'inizio del nuovo secolo, l'emergere dell'infezione da coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave 2 (SARS-CoV-2) ha determinato la terza trasmissione alla popolazione umana di un coronavirus altamente patogeno negli ultimi due decenni (1). Se i due precedenti coronavirus hanno causato epidemie gravi come quella determinata dal coronavirus da sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) e quella da sindrome respiratoria mediorientale (MERS) ma limitate nella loro diffusione, la malattia associata al coronavirus 2019 (COVID-19) rimane un grosso problema di sanità pubblica mondiale. L'origine della pandemia di COVID-19 è stata fatta risalire a un gruppo di casi di polmonite collegati ad un mercato di pesce nella città di Wuhan, provincia di Hubei, Cina (1). A seguito del probabile spillover di una malattia zoonotica ulteriori lavori hanno confermato che l'agente eziologico era un nuovo Betacoronavirus correlato a SARS-CoV (1-3). Dai primi casi dei pazienti che hanno sviluppato sintomi nel 1° dicembre 2019, la trasmissione inter umana rapidamente diffusa in tutto il mondo è stata dichiarata pandemia dall'OMS nel marzo 2020 (4). Da allora, ~250 milioni persone sono state infettate da SARS-CoV-2, con oltre 4 milioni di morti in 235 paesi, aree o territori (4). Ad oggi è sempre più evidente che, sebbene i vaccini siano la soluzione principale per contrastare la pandemia, la loro efficacia a lungo termine e la loro disponibilità mondiale è limitata (5). Inoltre, l'emergere di varianti che evadono la risposta immunitaria al virus rende ulteriormente limitata la protezione indotta dalla vaccinazione. In questo contesto va aggiunto anche che gli antivirali esistenti e le opzioni di trattamento contro il COVID-19 hanno dimostrato fino ad oggi solo un'efficacia limitata (5). Nasce quindi l'esigenza di sviluppare nuove strategie antivirali che possano intervenire in questo contesto e che riducano la trasmissione del virus all'interno della popolazione umana. È noto che spesso la maggior parte dei virus a RNA possono sviluppare grandi delezioni nel proprio genoma virale quando sono passati in vitro (6). Questi genomi difettosi privi di sequenze codificanti essenziali possono ancora replicarsi ed essere impacchettati in virioni in presenza di virus funzionali a lunghezza intera interferendo con la loro replicazione virale. Esempio maggiormente conosciuto sono le particelle difettive prodotte dai virus influenzali che interferiscono con la loro replicazione (7). Nei virus influenzali queste particelle difettive sono recentemente state proposte come nuova terapia antivirale per la loro attività interferente (7). Questi genomi interferenti difettosi sono stati descritti e sembrano essere comuni anche nei coronavirus dove sono stati utilizzati per localizzare gli elementi funzionali dei loro genomi fondamentali per il processo di formazione del virione maturo (8). Come nel caso degli altri virus dove sono state studiate approfonditamente, questi elementi funzionali genetici costituiscono le sequenze di packaging del genoma virale che servono ad impacchettare il corretto genoma nella particella virale matura mediante le loro interazioni con proteine virali. Visto la presenza di queste sequenze nelle particelle difettive virali, di particolare importanza è il fatto che per i virus influenzali le sequenze di packaging sono state utilizzate per sviluppare nuovi antivirali a base di molecole composte da acidi nucleici (9-11).



Scopo

Obiettivo principale è lo sviluppo di nuove strategie antivirali basate sull'utilizzo di acidi nucleici (*Nucleic acid based*) per l'inibizione virale di Sars-CoV-2. Lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali *Nucleic acid based* per la loro facilità di utilizzo e costi contenuti è di fondamentale importanza per intervenire contro infezioni virali emergenti per le quali al loro inizio non sono disponibili vaccini (12). Inoltre è importante anche in caso di emergenza di varianti virali resistenti alla risposta immunitaria indotta dai vaccini sviluppati. In questo nostro progetto saranno analizzate le attività antivirali verso il Sars-CoV-2 di oligonucleotidi modificati disegnati sulle regioni di packaging individuate nella sequenza del genoma virale.

Materiali e metodi

Cellule e virus. Le cellule utilizzate saranno le Vero E6 e le cellule A549 passate in laboratorio utilizzando il terreno di coltura DMEM addizionato con siero fetale al 10 %. Il virus usato sarà un isolato del Sars-CoV-2 cresciuto su cellule Vero E6 e titolato tramite il metodo delle placche.

Sintesi di oligonucleotidi fosforotioati. Le sequenze degli oligonucleotidi fosforotioati (S-ON) saranno disegnate selezionando le sequenze genomiche del Sars-CoV-2 presenti in banca dati e di cui si conoscono le loro partecipazioni al packaging virale. La sintesi degli S-ON di lunghezza variabile da 8 a 24 nt sarà fatta secondo le metodiche tradizionali e utilizzando le modifiche per renderli stabili.

Esperimenti di inibizione virale. I composti S-ON selezionati saranno saggiati per la capacità inibitoria di virus Sars-CoV-2. I composti saranno saggiati a differenti concentrazioni (0,1-100 μ M) su piastre da 24 pozzetti contenenti cellule Vero E6 e cellule A549 (5×10^5 cellule per pozzetto) utilizzando differenti molteplicità di infezione (MOI). I composti saranno somministrati tramite il metodo della Lipofectamina. In breve, quando le cellule Vero E6 o A549 saranno confluenti, il terreno DMEM sarà aspirato e i pozzetti lavati due volte con PBS e inoculati con 100 microlitri di virus Sars-CoV-2 ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0,01. Dopo 1 h di incubazione a 37°C e 5% di CO₂, gli inoculi virali verranno rimossi e le cellule lavate due volte con PBS e trattato con gli S-ON sotto studio. Per facilitare l'ingresso di S-ON nelle cellule, Lipofectamina sarà utilizzata come lipide vettore. Alla Lipofectamina, diluita in DMEM (5%) senza siero e mantenuta a temperatura ambiente per 5 min, saranno aggiunti gli S-ON, opportunamente disciolti in DMEM senza siero (la concentrazione finale aggiunto alle cellule variava da 0,1 a 100 μ M), mescolati delicatamente e mantenuti a temperatura ambiente per 20 min. Lipofectamina senza S-ON servirà da controllo negativo. Successivamente, 200 microlitri delle miscele Lipofectamina e S-ON saranno aggiunti alle cellule infettate e incubato tutto a 37 °C in un incubatore a CO₂ per 4 h. Le cellule poi saranno lavate e sarà aggiunto terreno DMEM con siero fetale. I supernatanti di coltura saranno raccolti dopo 72 ore e saggiati per la presenza di virus infettivo tramite il metodo delle placche. L'attività inibitoria sarà analizzata seminando i sopranatanti virali trattati con gli S-ON su piastre da 6 pozzetti contenenti cellule Vero E6 e analizzando l'effetto citopatico (ECP) come riduzione delle placche (PRA) a 3 giorni rispetto al controllo virale cresciuto in assenza degli S-



ON. Inoltre, si cercherà di analizzare il meccanismo di azione dei composti selezionati con maggior attività compiendo esperimenti di time-of-addition, dove il composto sarà aggiunto a tempi differenti dall'inizio dell'infezione virale per valutare la fase del ciclo di replica su cui agisce il farmaco. Tutti gli esperimenti saranno condotti in laboratorio di biosicurezza di livello 3 (BSL3).

Studio del meccanismo d'azione dei composti S-ON più attivi identificati. In questi esperimenti saranno valutati gli effetti dell'inibizione di S-ON sulla replicazione del genoma virale, sulla sua trascrizione e sulla sua incorporazione nel virione maturo prodotto. Per i composti più attivi derivanti dalle prove di inibizione si cercherà di analizzare il meccanismo dell'inibizione sulla replicazione virale. Sarà possibile valutare la tempistica di attività del composto in relazione al ciclo di replica virale effettuando esperimenti del tipo "time-of-addition". In questi esperimenti gli S-ON saranno addizionati a tempi differenti durante la replicazione virale (prima e dopo l'infezione a 1, 3, 6 e 24 ore) nelle medesime condizioni sperimentali descritte prima. Per tale scopo, si valuterà la capacità inibitoria della replicazione dell'RNA genomico, dell'espressione dei RNA messaggero virale e della sua presenza nel virione maturo tramite estrazione dell'RNA totale dalle cellule infettate, o da supernatante virale, successiva retrotrascrizione specifica per il genoma virale o per il l'RNA messaggero, con successiva quantificazione tramite PCR real-time.

Saggi di citotossicità. La citotossicità dei composti S-ON candidati inibitori del packaging virale sarà valutata tramite il saggio di riduzione del MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 2,5-diphenyltetrazolium bromide) sulle cellule Vero E6 e A549. Le cellule Vero E6 o A549 seminate a una densità di 1×10^5 cellule per pozzetto in una piastra di coltura a 96 pozzetti a fondo piatto e lasciato aderire per una notte. Quindi, quando gli strati cellulari saranno confluenti, il terreno di coltura sarà rimosso, i pozzetti lavati due volte con PBS e trattati con 100 microlitri di DMEM da solo o con lipofectamina con o senza le concentrazioni appropriate degli S-ON in studio e incubati a 37°C in un incubatore a CO₂ per 24 h. Dopo il trattamento, il composto MTT sarà utilizzato secondo le istruzioni del fornitore analizzando la quantità di formazione del prodotto dall'azione enzimatica cellulare. I pozzetti così trattati saranno letti allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. La citotossicità degli S-ON sulle cellule sarà valutata dividendo la media della densità ottica ottenuta dalle cellule trattate con S-ON con la media della densità ottica ottenuta nelle cellule in assenza degli S-ON.

Risultati attesi e sviluppi applicativi

Dalle attività descritte si prevede di individuare almeno 2 o 3 S-ON di lunghezza variabile (da 8 a 20 nt) con una buona attività inibitoria e bassa citotossicità cellulare. La loro identificazione servirà a capire se le regioni genetiche fondamentali per il packaging virale possono essere un buon target per lo sviluppo di antivirali per il Sars-CoV-2. L'impatto di questa attività è di sicuro rilevante per la salute pubblica come testimoniano le problematiche osservate nella recente pandemia da Sars-CoV-2 che ha testimoniato la mancanza di strategie terapeutiche antivirali immediate per il suo contenimento.



Riferimenti bibliografici

1. Zhou, P. et al. (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 579, 270–273.
2. Peiris, J. et al. (2003) Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319–1325.
3. Huang, C. et al. (2020) Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet* 395,497–506.
4. WHO (2020) Coronavirus Disease (COVID-19) Pandemic, WHO. <https://covid19.who.int>.
5. Tao K, et al. (2021) SARS-CoV-2 Antiviral Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 28;34:e0010921.
6. Tanner, E. J., et al. (2016). Exploiting Genetic Interference for Antiviral Therapy. *PLoS Genet*, 12, e1005986.
7. Alnaji FG and Brooke CB (2020) Influenza virus DI particles: Defective interfering or delightfully interesting? *PLoS Pathog* 16(5): e1008436.
8. Yao S, et al. (2021) A synthetic defective interfering SARS-CoV-2. *PeerJ.* 2021 Jul 1;9:e11686. doi: 10.7717/peerj.11686.
9. Giannecchini, et al. (2009). Oligonucleotides derived from the packaging signal at the 5' end of the viral PB2 segment specifically inhibit influenza virus in vitro. *Arch. Virol.* 154, 821–832.
10. Giannecchini, S., et al. (2011). Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules. *Antiviral Res.* 92, 64–72.
11. Hutchinson, et al. (2010). Genome packaging in influenza A virus. *J. Gen. Virol.* 91, 313–328.
12. Rossi JJ, and Rossi D. (2020) Oligonucleotides and the COVID-19 Pandemic: A Perspective. *Nucleic Acid Ther.* 30:129-132.