



## **RESOCONTO ATTIVITÀ DI RICERCA ANNO 2022**

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

**Responsabile scientifico:** Dr.ssa Maria Alfreda Stincarelli, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Sezione di Medicina critica e medicine specialistiche, Viale Morgagni 48

#### **PREMESSA**

L'origine della pandemia di COVID-19 è dovuta a un nuovo Betacoronavirus correlato a SARS-CoV (SARS-CoV-2). Oggi è sempre più evidente che, sebbene i vaccini siano la principale soluzione per contrastare la pandemia, la loro efficacia a lungo termine e la loro disponibilità a livello mondiale è limitata. Le varianti emergenti segnalate e la potenziale trasmissione di nuovi coronavirus animali alla popolazione umana destano preoccupazione. Inoltre, gli antivirali e le opzioni terapeutiche esistenti contro il COVID-19 hanno mostrato fino ad oggi solo un'efficacia limitata. In natura, come per altri virus a RNA, è stato descritto che genomi difettivi interferenti del SARS-CoV-2, che emergono durante l'infezione virale, possono contrastare la propagazione virale. Questi genomi difettivi interferenti sono stati utilizzati per individuare gli elementi di impacchettamento funzionali dei genomi di coronavirus che sono fondamentali per il processo di formazione del virione maturo.

#### **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, analizzando 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.** Sono state utilizzate le linee cellulari Vero E6, coltivate in laboratorio, mentre in alcuni esperimenti sono state utilizzate anche cellule di adenocarcinoma mammario umano esprimenti il recettore ACE2 umano (MCF7-hHACE2) e le Madin-Darby canine kidney (MDCK). Sono stati utilizzati virus isolati da clinici di SARS-CoV-2 (varianti Wuhan-like, Alpha-like e Delta-like) cresciuti su cellule Vero E6 e titolati con il metodo a placche. È stato utilizzato anche il virus influenzale A/Firenze/02/2019 H1N1pmd cresciuto su cellule MDCK e titolato con il metodo a placche.



**Sintesi di oligonucleotidi fosforotioati.** Gli oligonucleotidi fosforotioati (S-ON) sono stati disegnati sulla con sequenza senso e antisenso della sequenza genomica SARS-CoV-2 delle strutture a stem-loop dell'RNA all'interno dell'estremità 3' dell'ORF1b e sono stati sintetizzati e purificati secondo metodi tradizionali e utilizzando delle modifiche per renderle stabili.

**Saggi di inibizione SARS-COV-2 con S-ON.** Per l'attività inibitoria contro le varianti SARS-CoV-2, i composti S-ON selezionati sono stati testati su cellule Vero E6 utilizzando una molteplicità di infezione (MOI) di 0,01. Per facilitare l'ingresso di S-ON nelle cellule, il reagente lipofectamina è stato utilizzato come vettore a base di lipidi. La trasfezione è stata effettuata aggiungendo i complessi S-ONs – lipofectamina a ciascun pozzetto (la concentrazione finale aggiunta alle cellule variava da 0,1 a 10  $\mu$ M). L'attività inibitoria è stata analizzata seminando i surnatanti virali trattati con S-ON raccolti dopo 72 ore su piastre da 6 pozzetti contenenti cellule Vero E6 e analizzando la riduzione di placche (PRA) a 3 giorni, rispetto al controllo virale cresciuto in assenza di S-ON.

**Saggio di citotossicità cellulare.** La citotossicità dei composti S-ON candidati è stata valutata mediante il test di riduzione MTT. Le cellule Vero E6 sono state trattate con MEM da solo o con lipofectamina con o senza le opportune concentrazioni degli S-ON in esame e incubati a 37°C in un incubatore a CO<sub>2</sub> per 72 h. Dopo il trattamento, è stato utilizzato un kit MTT secondo le istruzioni del fornitore e l'assorbanza di ciascun pozzetto è stata determinata utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre a una lunghezza d'onda di 595 nm.

**Estrazione dell'RNA, trascrizione inversa e real-time PCR del filamento genomico positivo e negativo virale.** L'RNA è stato estratto e purificato dalle cellule sopranatanti e infettate utilizzando il kit mini RNAeasy. Cento nanogrammi di RNA totale di ciascun campione sono stati retrotrascritti e successivamente amplificati tramite real-time PCR utilizzando primer specifici per gene N e RdRP virale per discriminare il filamento genomico positivo e negativo virale.

**Indagine di immunofluorescenza.** La microscopia a immunofluorescenza è stata eseguita su cellule fissate Vero E6 infettate con SARS-COV-2 e trattate con composto marcato con S-ON Cy5. La marcatura cellulare è stata effettuata utilizzando un anticorpo policlonale primario di coniglio anti-M o un anticorpo monoclonale di coniglio anti-NP seguito da un anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor-488. I nuclei sono stati colorati con 4,6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI).

## RISULTATI

**Attività antivirale degli S-ON dalla sequenza SL1 e SL2 all'estremità 3' dell'ORF1b contro SARS-CoV-2.** Tra i 12 S-ON testati (provenienti dalla regione steem-loop 1 e 2, con sequenza senso e antisenso As), diversi



composti hanno mostrato una potente attività antivirale mostrando una concentrazione inibitoria del cinquanta per cento (IC<sub>50</sub>) compresa tra 0,27 e 12  $\mu$ M. Tre S-ON con elevata attività antivirale (SL1-2, SL1-2A e SL2-2 con IC<sub>50</sub> rispettivamente di 0,27, 1,0 e 1,60  $\mu$ M) si sovrapponevano all'estremità di SL1 e SL2 e hanno mostrato una struttura secondaria che riproduceva quella del genoma dell'RNA bersaglio. Quindi, per individuare la sequenza minima coinvolta nell'attività antivirale, sono stati sintetizzati ulteriori 12 S-ON con lunghezza ridotta (6-10 mer) e mutati nei residui nucleotidici centrali degli S-ON più attivi (SL1-2, SL1-2 As, SL2-2 e SL2-2 As). L'attività antivirale dei 12 S-ON corti hanno mostrato un IC<sub>50</sub> compreso tra 0,19 e 31,12  $\mu$ M. Gli S-ON con la lunghezza di 10-mer (SL1-4 e SL1-4AS, e SL2-4 e SL2-4AS) hanno conservato una potente attività antivirale con riduzione della loro efficacia se ridotti a 6-mer (SL1-5, SL1-6, SL1-7 e SL2-5). Tuttavia, quando la regione centrale dell'S-ON di 10-mer è stata completamente mutata, la sua attività antivirale veniva persa (forma mutata degli S-ON, SL1-4 e SL1-4 As, SL2-4 e SL2-4 As). I risultati confermano che la regione del loop del dominio SL1 e SL2 è essenziale per l'attività antivirale. Gli S-ON 10-mer selezionati (SL1-4, SL1-4 As, SL2-4, SL2-4 As) sono stati analizzati contro diverse dosi infettive del virus mostrando la loro efficacia a diverse dosi infettive e mostrando un'attività antivirale indipendente dalle cellule. Infine, l'attività antivirale degli S-ON 10-mer selezionati è stata analizzata utilizzando diverse varianti SARS-CoV-2 (intervallo IC<sub>50</sub> da 0,60 a 4,12, da 1,23 a 2,34 e da 1,8 a 5,61, ottenute per variante Wuhan-like, variante Alpha-like e variante Delta-like, rispettivamente). Da notare che quando gli S-ON sono stati utilizzati contro virus non correlati, come il virus dell'influenza di tipo A/H1N1, l'attività antivirale era totalmente assente.

**Localizzazione di S-ON all'interno di cellule infette.** Gli S-ON hanno mostrato una presenza dose-dipendente all'interno delle cellule. Gli S-ON selezionati (SL1-2, SL 1-4, SL 1-4 As e SL2-4) hanno riportato una localizzazione peri-nucleare/citoplasmatica predominante simile a quella riportata per le proteine M, N e S di SARS-CoV-2.

**Effetto della variazione del tempo del trattamento S-ON sull'inibizione del virus.** Per valutare meglio l'attività antivirale degli S-ON, è stato selezionato l'S-ON SL1-4 come rappresentante per studiare il meccanismo d'azione. Questo esperimento è stato eseguito con le stesse modalità dei precedenti saggi di inibizione virale, tranne per il fatto che le colture cellulari sono state trattate con l'S-ON SL1-4 in tempi differenti dopo l'infezione (1 h prima dell'infezione, 1, 2, 3 ore dopo infezione). Gli studi sul tempo di aggiunta, eseguiti a diverse concentrazioni di SL1-4, hanno chiaramente dimostrato che l'S-ON ha agito nelle prime 2 ore dell'infezione di SARS-CoV-2, poiché l'aggiunta di SL1-4 dopo 3 ore dopo l'infezione non aveva effetto sulla replicazione virale.



**Effetto del trattamento con S-ON sulla replicazione dell'RNA virale e sull'espressione delle proteine M e N in differenti momenti dell'infezione.** In primo luogo, è stato esaminato il filamento positivo di RNA genomico virale nel sopranatante immediatamente (T0) e dopo 24 ore (T24) e 48 ore (T48) di infezione utilizzando uno specifico test di trascrizione inversa e real-time PCR per gene N e RdRP. È stata osservata una significativa riduzione dei livelli relativi di RNA durante il trattamento con S-ON per entrambe le molecole SL1-4 e SL1-4 As dopo 24 ore dall'infezione. Dunque è stato esaminato l'accumulo degli RNA a filamento positivo e negativo prodotte nelle cellule Vero, trattate con SL1-4 e SL1-4 As. In questo caso, non è stata osservata una differenza significativa per entrambi i tipi di RNA virale con il trattamento di SL1-4 e SL1-4 As. Successivamente, è stata esaminata la presenza di espressione delle proteine N e M all'interno delle cellule infette. Rispetto alle cellule infette trattate con virus e lipofectamina da sola, durante il trattamento con gli S-ON SL1-4 e SL1-4As l'espressione delle proteine virale M e N non era significativamente ridotto. Al contrario, è stato osservato un elevato accumulo di proteine M e N a 48 ore dall'infezione nelle cellule trattate con entrambi gli S-ON rispetto a quelli nel solo controllo del virus, che era assente nelle basse concentrazioni di S-ON.

## CONCLUSIONI

L'inibizione della replicazione del virus SARS-CoV-2 da parte di brevi S-ON (SL1-4, SL1-4 As, SL2-4, SL2-4 As) si è dimostrata essere dose-dipendente, indipendente dalla molteplicità dell'infezione e l'effetto è risultato essere sequenza-specifico. Inoltre, l'attività antivirale dei brevi S-ON selezionati era attiva anche con diverse varianti SARS-CoV-2 ma inefficace quando gli S-ON venivano usati contro virus non correlati come il virus dell'influenza di tipo A/H1N1. L'osservazione che questi S-ON e gli anti-senso esercitano un'attività inibitoria, suggerisce che queste molecole potrebbero agire contrastando l'interazione dell'RNA virale con altri RNA virali e/o proteine. Quindi, una possibile spiegazione potrebbe essere che l'S-ON interagisca con l'RNA o la proteina (N e/o M), che contiene il sito bersaglio dell'RNA virale endogeno, e gli S-ON As si leghino direttamente con la regione del segnale di impacchettamento dell'RNA del genoma ORF1b, in entrambi i casi ostacolando l'interazione molecolare necessaria per la produzione di virus infettivi. Tuttavia, l'identificazione del modo preciso con cui avviene l'inibizione della replicazione del virus richiederà ulteriori studi. Mirare alla regione di impacchettamento del SARS-CoV-2 all'estremità 3' dell'ORF1b, che è altamente conservata tra i coronavirus e svolge un ruolo dominante nel corretto assemblaggio dei virioni, lo rende comunque un bersaglio estremamente interessante per lo sviluppo di nuove terapie per affrontare questi virus in continua evoluzione. Ulteriori indagini saranno di garanzia per lo sviluppo di una terapia antivirale.



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI  
MEDICINA SPERIMENTALE  
E CLINICA

## **PUBBLICAZIONI**

Maria Alfreda Stincarelli, Arianna Rocca, Alberto Antonelli, Gian Maria Rossolini and Simone Giannecchini, **Antiviral activity of oligonucleotides targeting the SARS-CoV-2 genomic RNA stem-loop sequences within the 3'-end of the ORF1b.** Pathogens, 2022; 11,1286.

## **COMUNICAZIONI A CONGRESSI**

M. A. Stincarelli, A. Rocca, A. Antonelli, G. M. Rossolini and S. Giannecchini, 2022. **Strategies for nucleic acid-based antiviral molecules targeting the genetic packaging regions of the SARS-COV-2.** 6<sup>th</sup> national congress of the Italian Society for Virology, Hotel Royal Continental – Napoli, Italy 3-5 Luglio 2022

## **PIANO FINANZIARIO**

Materiale di consumo 20.000,00 euro ripartiti in:

Reagenti per biologia molecolare 10.000,00 euro

Reagenti per colture cellulari 7.000,00 euro

Spese generali: 3.000,00 euro

Borsa di ricerca: 20.000,00 euro

Totale: 40.000,00 **euro**

*Maria Alfreda Stincarelli*