

Wirusy RNA stanowią zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi oraz zwierząt, a pośrednio także dla gospodarki światowej. Spośród wielu wirusów RNA kilka, które powodują epidemie i wybuchy pandemii, budzą szczególnie duże obawy. Do tej grupy wirusów należą między innymi: grypa, SARS (w tym SARS-CoV-2), Ebola, Zika, MERS i Denga. Obecna pandemia, wywołana wirusem SARS-CoV-2, dotknęła do tej pory ponad 165 milionów ludzi, a około 3.5 miliona osób zmarło (Johns Hopkins University of Medicine z dnia 19 maja 2021). Obecna pandemia uświadamia również opinii publicznej wysoki potencjał pandemiczny wirusa grypy typu A (IAV). Według informacji WHO każdego roku około 1 miliard ludzi choruje na grypę sezonową, a około 600 tysięcy umiera z powodu powikłań chorobowych. Szacuje się, że grypa Hiszpanka (lata 1918/19) spowodowała śmierć 50-100 milionów ludzi. Genom wirusów RNA, w tym wirusa grypy i SARS, ulega zmianom, które powodują pojawianie się nowych wariantów i szczepów. Z tego powodu trudno jest opracować uniwersalne terapie i szczepionki, które często z biegiem czasu muszą ulegać zmianie. Dlatego lepsze zrozumienie biologii wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2 i rozwój antysensowych terapii byłoby bardzo pomocne w kontekście skutecznego przeciwdziałania obu tym wirusom.

Przedmiotem badań grantu są dwa wirusy RNA: wirus grypy typu A oraz SARS-CoV-2. Wirus grypy A posiada genom złożony z jednoniciowego (-)RNA, podzielonego na osiem segmentów. Podczas gdy SARS-CoV-2 jest wirusem o (+)RNA jednoniciowym genomie. Pomimo różnic w cyklu wirusowym obu wirusów, ich replikacja jest na każdym etapie w pełni zależna od RNA. Dodatkowo, w wielu badaniach, w tym także tych, które sami prowadzimy, udowodniono, że struktura RNA wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2 RNA zawiera liczne konserwatywne motywy i jest kluczowa w namnażaniu obu wirusów. Ogólnym celem projektu są badania biologiczne, chemiczne i biofizyczne mające na celu wykorzystanie peptydowych kwasów nukleinowych (PNA) do tworzenia struktur trypleksowych (trójniciowych) z wybranymi konserwatywnymi dwuniciowymi regionami RNA (dsRNA) wirusa grypy typu A oraz SARS-CoV-2. Planujemy także przeprowadzenie wyskoprzepustowej analizy przesiewowej i wirtualnej wyskoprzepustowej analizy przesiewowej mających na celu wyszukanie niskocząsteczkowych ligandów selektywnie wiążących się do wybranych motywów strukturalnych RNA obu wirusów. Obie te grupy badań mają na celu wyszukanie optymalnego PNA i ligandu wiążącego się do tego samego motywu strukturalnego wirusowego RNA i utworzenie koniugatów PNA-ligand zdolnych do tworzenia specyficznego trypleksu dsRNA/PNA-ligand, o ulepszonych właściwościach wiązania i zwiększonej aktywności przeciwwirusowej.

W projekcie postulowane jest przeprowadzenie następujących badań:

1/ zaprojektowanie zmodyfikowanych PNA tworzących trypleksy z dwuniciowymi rejonami konserwatywnych motywów strukturalnych RNA wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2 oraz określenie właściwości wiązania tych PNA z wybranymi motywami. Zastosowanie modyfikacji monomerów PNA spowoduje, że tworzenie przez niego trypleksu z dwuniciowym RNA będzie mniej zależne od sekwencji, a jednocześnie trypleks będzie stabilniejszy termodynamicznie.

2/ przeprowadzanie wysokoprzepustowych badań przesiewowych (ang. high-throughput screening, HTS) i wirtualnych wysokoprzepustowych badań przesiewowych (ang. virtual high-throughput screening, VHTS) w poszukiwaniu ligandów, które silnie wiążą się do wybranych motywów strukturalnych RNA wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2. Oba badania przesiewowe pozwolą na wybranie ligandów odpowiednich do przygotowania koniugatów PNA-ligand.

3 / stworzenie optymalnych koniugatów PNA-ligand, określenie cech ich wiązania do wirusowych RNA oraz właściwości biofizycznych tworzonych kompleksów. Koniugaty PNA-ligand powinny silniej i bardziej specyficznie wiązać docelowe RNA w porównaniu ze związkami „macierzystymi”, a w konsekwencji posiadać lepsze działanie przeciwwirusowe. Przeprowadzone analizy pozwolą na wyselekcjonowanie najlepszych kandydatów do testów komórkowych w celu zbadania ich właściwości inhibitorowych na replikację wirusa.

4 / ocena właściwości inhibitorowych wybranych koniugatów PNA-ligand, SM i PNA na namnażanie wirusa grypy typu A i SARS-CoV-2. W badaniach zostanie zastosowany szczep A/California/04/2009(H1N1) wirusa grypy oraz niezakaźny replikon SARS-CoV-2 powstały w grupie kierownika projektu. Określone zostaną miejsca wiązania związków w wirusowym RNA oraz zostanie oceniona specyficzność tego wiązania.

5 / ocena aktywności inhibitorowej najbardziej efektywnych i specyficznych koniugatów PNA-ligand na modelu mysim. Wybierzemy około 10 koniugatów PNA-ligand aby sprawdzić ich właściwości przeciwgrypowe na myszach. Badania pozwolą ocenić skuteczność terapeutyczną wybranych do badań koniugatów, jak również dokonać histopatologicznej oceny ich wpływu na myszy laboratoryjne.