

Università degli Studi di Padova  
Dipartimento di Biologia  
Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

**Sviluppo di un sistema basato su particelle simil-lentivirali  
esprimenti la glicoproteina “Spike” dell’envlope di SARS-CoV-2**

Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri

Co-tutor: Dott.ssa Adriana Vitiello

Dipartimento di Medicina Molecolare -DMM

Laureando: Mauro Casagrande

Anno Accademico 2021/2022

## Indice

1	<b>Sommario</b> .....	3
2	<b>Abstract</b> .....	4
3	<b>Introduzione</b> .....	5
3.1	Principali caratteristiche di SARS-CoV-2 e infezione.....	5
3.2	Particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina “Spike” di SARS-CoV-2....	6
3.3	Farmaci anti SARS-CoV-2.....	7
4	<b>Obiettivo dello studio</b> .....	9
5	<b>Materiali e metodi</b> .....	10
5.1	Materiali.....	10
5.1.1	Linee cellulari .....	10
5.1.2	Plasmidi .....	10
5.1.3	Farmaci anti SARS-CoV-2.....	11
5.2	Metodi.....	13
5.2.1	Saggio di citotossicità mediante MTT .....	13
5.2.2	Produzione delle particelle simil-lentivirali esprimenti diverse glicoproteine .....	13
5.2.3	Trasduzione delle particelle simil-lentivirali e titolazione mediante citofluorimetro.....	14
5.2.4	Verifica dell’efficienza di traduzione delle particelle simil-lentivirali prodotte.....	15
6	<b>Risultati</b> .....	16
6.1	Analisi citotossica in seguito a trattamento con i farmaci LP11, LP14, Acido Glicirretico e FS37 .....	16
6.2	Analisi dell’efficienza di trasduzione da parte delle particelle lentivirali prodotte .....	17
6.3	Valutazione dell’efficienza di traduzione delle particelle simil-lentivirali pseudotipizzate con VSV-G e “Spike” wild type di SARS-CoV-2.....	17
7	<b>Discussione e conclusioni</b> .....	19
8	<b>Bibliografia</b> .....	20

## **1 Sommario**

Questo lavoro di tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio riguardante lo sviluppo di un sistema per validare strategie terapeutiche mirate a bloccare le fasi iniziali del ciclo replicativo di virus patogeni per l'uomo, in particolare interferendo con il riconoscimento tra recettore cellulare e antirecettore virale. Questa tesi è incentrata sullo sviluppo di particelle lentivirali ricombinanti che incorporano nel proprio envelope la glicoproteina Spike del virus pandemico SARS-CoV-2 (pseudotipizzazione) al fine di mimare le fasi iniziali del ciclo replicativo di SARS-CoV-2 mentre il genoma esprime un gene reporter per valutare l'efficienza delle particelle pseudotipizzate di infettare le cellule target. Il vantaggio di questo sistema è che ci permette di lavorare in laboratori di BLS 2, mentre il virus wild-type andrebbe utilizzato in laboratori BLS 3. Questo lavoro di tesi ha previsto la produzione delle particelle simil lentivirali pseudotipizzate con la Spike di SARS-COV-2 mediante trasfezione di cellule 293T le quali sono poi state utilizzate per trasdurre cellule suscettibili di infezione da SARS-CoV-2 e la percentuale di cellule esprimenti la proteina reporter è stata valutata al citofluorimetro. I dati ottenuti indicano che questo sistema funziona e potrà essere impiegato per valutare molecole inibitrici l'ingresso del virus SARS-CoV-2.

## **2 Abstract**

This work is part of a larger project concerning the development of a system to validate therapeutic strategies aimed to blocking the early stages of the replicative cycle of humans pathogenic viruses, in particular interfering with the recognition between cellular receptor and viral anti-receptor. This thesis focuses on the development of recombinant lentiviral particles that incorporate into their envelope the Spike glycoprotein of the pandemic virus SARS-CoV-2 (pseudotyping) in order to mimic the early stages of the replicative cycle of SARS-CoV-2 and the genome expresses a reporter gene to evaluate the efficiency of the pseudotyped particles to infect target cells. The advantage of this system is that it allows us to work in BLS 2 laboratories, while the wild-type virus should be used in BLS 3 laboratories. This thesis work involved the production of pseudotyped lentiviral-like particles with the SARS-COV-2 Spike by transfection of 293T cells which were then used to transduce cells susceptible to SARS-CoV-2 infection and the percentage of cells expressing the reporter protein was assessed by cytofluorometer. The data obtained indicate that this system works and may be used to evaluate molecules that inhibit SARS-CoV-2 entry.

## 3 Introduzione

### 3.1 Principali caratteristiche di SARS-CoV-2 e infezione.

Il virus SARS-CoV-2 (Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus 2) appartiene alla famiglia dei *Coronaviridae* ed al genere dei *Betacoronavirus*, così come i virus SARS-CoV e MERS-CoV responsabili di precedenti epidemie di Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) e Middle East Respiratory Syndrome (MERS), rispettivamente. Caratteristica comune di questi virus è quella di infettare e diffondersi principalmente attraverso le vie respiratorie causando una sintomatologia che include febbre, dispnea e polmonite acuta.

I *Coronavirus* sono virus di forma sferica dotati di involucro che racchiude il genoma di RNA a singolo filamento, a polarità positiva, di circa 26-32 kb che codifica per proteine strutturali e non strutturali. Le proteine strutturali sono 4: la glicoproteina "Spike" (*S*), la proteina di membrana (*M*), la proteina envelope (*E*) e la proteina nucleocapsidica (*N*). Le subunità della proteina *N* si assemblano per costituire il nucleocapside che contiene il genoma a RNA a singolo filamento; mentre le proteine *S*, *M* ed *E* si assemblano a formare il capsido o envelope. Il genoma a RNA codifica anche per le proteine non strutturali quali diverse proteasi e l'RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp) le cui funzioni sono di dirigere la replicazione, l'espressione del genoma e la sintesi di nuovi virioni.

L'ingresso del virus SARS-CoV-2 è mediato dalla glicoproteina *S* composta da due subunità, *S1* ed *S2*. La subunità *S1* contiene il dominio di legame al recettore ed è sorretta dalla subunità *S2* che fa da stelo e media la fusione tra involucro e membrana cellulare nella fase di internalizzazione del virus, dopo il riconoscimento. Nei virus maturi la proteina *S* si posiziona in trimeri in modo aleatorio nel capsido. Le glicoproteine sono di per sé inattive e necessitano di attivazione la quale è mediata da proteasi specifiche localizzate sulla membrana della cellula ospite. La proteina *S* interagisce con il recettore cellulare enzimatico per la conversione dell'angiotensina di tipo 2 (ACE2) espresso in cellule polmonari, cellule endoteliali di arterie, cellule miocardiche, cellule renali e cellule intestinali.

Nel dettaglio il dominio Receptor Binding Domain (RBD) situato su *S1* è responsabile del riconoscimento specifico del recettore cellulare ACE2, una volta avvenuto questo legame avviene un taglio proteolitico mediato da proteasi, situate sulla superficie cellulare, a livello del legame tra *S1* ed *S2*, questo permette la formazione del peptide di fusione che interagirà poi con la membrana cellulare e permetterà la successiva fusione con l'envelope.

Il taglio proteolitico causa un cambio conformazionale su *S2* che stimola l'interazione del peptide di fusione con la membrana e ne permette la fusione. Questo porta l'RNA virale nel citoplasma della cellula ospite dove può essere tradotto; inizialmente vengono tradotte le proteine non

strutturali, tra cui la proteasi principale Mpro (Main Protease), e in seguito le 4 proteine strutturali. Le proteine strutturali prodotte vengono poi accumulate in endosomi del reticolo endoplasmatico grazie alla presenza della proteina *E*, nel mentre il genoma virale viene replicato con un intermedio a RNA a polarità negativa che verrà utilizzato come stampo. A questo punto la proteina *N* interagisce con il genoma neosintetizzato aumentandone la stabilità e permettendogli di assumere la struttura necessaria al seguente impacchettamento. Infine, attraverso una rete che prevede la formazione di vescicole dall'apparato di Golgi dirette alla membrana cellulare (trans-golgi network), i virioni vengono assemblati e successivamente rilasciati attraverso la fusione delle vescicole provenienti dall'apparato di Golgi con la membrana cellulare. (Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses 2020; Hoffmann et al. 2020; Walls et al. 2020; Ou et al. 2020)

### **3.2 Particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina “Spike” di SARS-CoV-2**

In questo elaborato di tesi sono stati sviluppati ed utilizzati vettori lentivirali di terza generazione self-inattivanti (SIN) esprimenti la glicoproteina “Spike” di SARS-CoV-2 per testare l'efficacia di diversi farmaci, progettati in silico, sull'inibizione delle fase di entry di SARS-CoV-2 nelle cellule target (Calu-3).

La produzione di particelle simil-lentivirali di terza generazione Self-Inattivanti (SIN) prevede la trasfezione di una cellula target (293T) con i plasmidi necessari a produrre la particella simil-lentivirale esprimente una determinata proteina nell'envelope e contenente nel genoma una sequenza genica da integrare nel genoma della cellula ospite, detta transgene. In particolare la produzione di vettori di terza generazione prevede di effettuare la trasfezione delle cellule target con 4 diversi plasmidi: *packaging plasmid*, *envelope plasmid*, *Rev plasmid* e *transfer plasmid*, a differenza dei vettori di seconda generazione dove la sequenza Rev era integrata nel plasmide packaging. La presenza della sequenza Rev è indispensabile alla replicazione virale e localizzarla su un plasmide indipendente ha reso l'utilizzo di questi vettori più sicuro. La biosicurezza dei vettori virali di terza generazione è aumentata anche dal fatto che il plasmide di trasferimento è strutturato in modo che la sua retro-trascrizione, necessaria per l'integrazione, comporti la delezione di una regione (3' LTR) contenente elementi promotoriali essenziali alla replicazione virale, nelle cellule trasdotte con il sistema SIN si ottiene quindi l'inattivazione trascrizionale dei genomi virali.

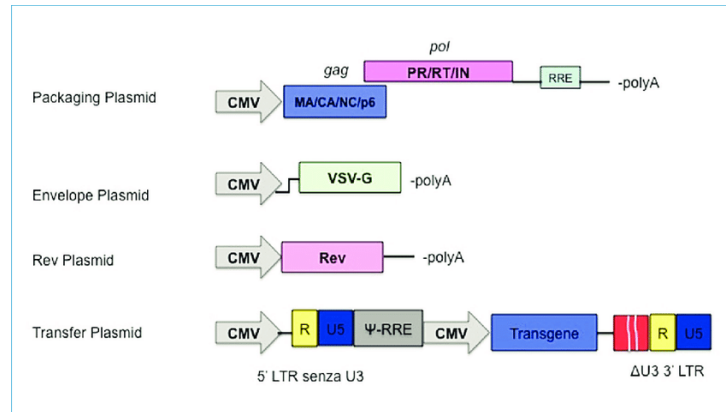


Figura 1: Vettori lentivirali di terza generazione (Biancamaria Pietrangeli et al. 2014)

Le particelle simil-lentivirali da noi prodotte esprimevano, alternativamente, 3 diverse tipologie di proteine sull'envlope ovvero "S" di SARS-CoV-2, "S" di SARS-CoV-2 presentante la mutazione D614G oppure la proteina "G" del virus della stomatite vescicolare (VSV-G); il transgene, ovvero la sequenza che si integrerà nel genoma della cellula ospite e conseguentemente verrà espressa, era costituito dalla proteina verde fluorescente (GFP) e permetteva di seguire e visualizzare i risultati già nel corso degli esperimenti. (Yan et al. 2007) (Giroglou et al. 2004)

È stato necessario sviluppare il sistema basato su particelle simil-lentivirali per determinare le condizioni sperimentali da utilizzare conseguentemente con SARS-CoV-2 che, in quanto patogeno di gruppo 3, è maneggiabile esclusivamente in laboratori di biosicurezza livello 3, i quali sono numericamente limitati e solo un personale ridotto può accedervi. Le particelle simil-lentivirali prodotte con il sistema SIN sono invece classificate come patogeni di gruppo 2 e di conseguenza maneggiabili in laboratori di biosicurezza livello 2 (BLS2).

L'utilizzo di particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina "Spike" di SARS-CoV-2, in BLS2, ha quindi permesso una prima selezione delle concentrazioni di farmaco più promettenti velocizzando quindi il lavoro sperimentale con il virus wild-type in BLS3.

### 3.3 Farmaci anti SARS-CoV-2

Per gli studi sull'entry di SARS-CoV-2 sono stati progettati in silico e, successivamente prodotti, farmaci derivati dall'acido obetico (acido 6 $\alpha$ -etil-chenodeossico), farmaco comunemente utilizzato per trattare la colangite biliare primaria (CBP), una patologia epatica, con il nome di Ocaliva. L'acido obetico è un agonista del recettore farnesoide X (FXR), un recettore nucleare espresso nel fegato e nell'intestino ed è un regolatore delle vie infiammatorie, fibrotiche, metaboliche e degli acidi biliari. Presenta una struttura tetraciclica aromatica e da esperimenti precedentemente

condotti in laboratorio, si è osservato che l'acido obeticolico esegue interazioni specifiche con l'anti-recettore virale, la proteina "Spike" di SARS-CoV-2, e il recettore cellulare, ACE2. In particolare è in grado di interagire ed inibire il riconoscimento specifico tra la glicoproteina "Spike" di SARS-CoV-2 e il recettore cellulare ACE2.

In seguito a questa osservazione ed in collaborazione con il Prof. Passatella dell'Università degli Studi di Milano la struttura chimica dell'acido obeticolico è stata manipolata al fine di ottimizzare l'interazione inibente l'entry mediante l'aggiunta di: anelli aromatici (acido glicirretico), unione di più strutture cicliche aromatiche con ammine secondarie (FS37) e mediante l'unione di più strutture cicliche aromatiche attraverso legami peptidici (LP11 e LP11).

È stato quindi necessario testare la citotossicità di tali composti chimici prima di verificare la loro capacità inibente sull'entry di SARS-CoV-2 sulle cellule target Calu-3 onde evitare di falsare i risultati degli esperimenti eseguiti con il virus wild-type in BLS3.



#### **4 Obiettivo dello studio**

Questo progetto di ricerca prevede una prima fase di sviluppo di un sistema basato su particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina "*Spike*" di SARS-CoV-2 wild-type o con la mutazione D614G mediante tecnica della trasfezione con calcio fosfato in cellule 293T e successiva verifica dell'efficienza di traduzione. La seconda parte del progetto prevede, invece, di valutare la citotossicità cellulare di farmaci in grado di inibire l'ingresso del virus SARS-CoV-2 nella cellula. I farmaci considerati agiscono sulla fase di riconoscimento tra la glicoproteina virale ed il recettore cellulare, ACE2, pertanto non dovrebbero permettere la trasduzione delle cellule da parte dei vettori lentivirali.

## 5 Materiali e metodi

### 5.1 Materiali

#### 5.1.1 Linee cellulari

In questo elaborato di tesi sono state utilizzate tre linee cellulari:

- **Calu-3** (ATCC® HTB-55™): linea cellulare isolata da cellule polmonari epiteliali di un soggetto di *H.sapiens* con adenocarcinoma polmonare. Essendo cellule polmonari presentano un'elevata espressione del recettore ACE2.
- **VERO clone E6** (ATCC® CRL-1586™): linea cellulare isolata da cellule epiteliali di rene di scimmia (*Cercopithecus aethiops*); utilizzate per studiare l'infezione da parte del sistema simil-lentivirale poiché hanno un'elevata espressione del recettore ACE2.
- **293T** (ATCC® CRL-3216™): linea cellulare isolata da cellule epiteliali di rene di *H.sapiens*; sono state utilizzate per la produzione delle particelle simil-lentivirali.

Queste linee cellulari vengono coltivate in terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) addizionato con FBS (Fetal Bovine Serum) per un volume pari al 10% del volume totale e mantenute in incubatore a condizioni controllate che corrispondevano a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> e 95% umidità.

#### 5.1.2 Plasmidi

Per produrre le particelle simil-lentivirali in questo progetto di tesi, sono stati usati i seguenti plasmidi:

- **pHAGE-CMV-Luc2-IRES-ZsGreen-W** (BEI cod. NR-52516): plasmide per il backbone lentivirale codificante per il gene della proteina luciferasi seguita da un IRES ed il gene per la proteina fluorescente verde ZsGreen sotto il controllo del promotore del citomegalovirus (CMV)
- **pHDM-VSVG**: plasmide esprime la glicoproteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV) sotto controllo del promotore CMV
- **pHDM-IDTSpike-fixK** (BEI cod. NR-52514): plasmide esprime sotto il controllo del promotore di CMV la proteina spike (S) del ceppo strain Wuhan-Hu-1 (Genbank NC\_045512) di SARS-CoV-2, codone ottimizzata usando IDT e la sequenza di Kozak

- **pHDM-Spike-Whuan-Hu1-D614C** (BEI cod. NR-53765): plasmide esprimente sotto il controllo del promotore CMV, la glicoproteina spike (S) del ceppo Whuan-Hu-1 (Genbank MN908947) del virus SARS-CoV-2 con la mutazione D614G e codone ottimizzata con la delezione C terminale di 21 aminoacidi
- **pHDM-Hgpm2** (BEI cod. NR-52517): plasmide Lentivirale helper che esprime i geni Gag-Pol di HIV sotto il controllo del promotore CMV
- **pHDM-tat1b** (BEI cod. NR-52518): plasmide Lentivirale helper che esprime il gene Tat di HIV sotto il controllo del promotore CMV
- **pRC-CMV-Rev1b** (BEI cod. NR-52519): plasmide Lentivirale helper che esprime il gene Rev di HIV sotto il controllo del promotore CMV

(Crawford et al. 2020)

### 5.1.3 Farmaci anti SARS-CoV-2

I farmaci utilizzati in questo elaborato di tesi sono derivati dell'acido obeticolico (Figura 2), progettati in silico, e successivamente sintetizzati. I farmaci sono: acido glicirretico, FS37, LP11 ed LP14 (Figure 3-6) e tutti presentano la struttura ad anelli aromatici tipica dell'acido obeticolico a cui hanno aggiunto mediante modificazioni chimiche anelli aromatici, ammine secondarie e gruppi metilici oppure l'unione di più strutture ad anello mediante legami peptidici. Grazie alla particolare struttura molecolare, questi farmaci sono in grado di inibire il riconoscimento specifico tra recettore cellulare, ACE2, e il dominio RBD della glicoproteina "Spike" di SARS-CoV-2. Questi farmaci sono stati ottenuti dal gruppo del Professor Daniele Passarella dell'Università degli Studi di Milano.

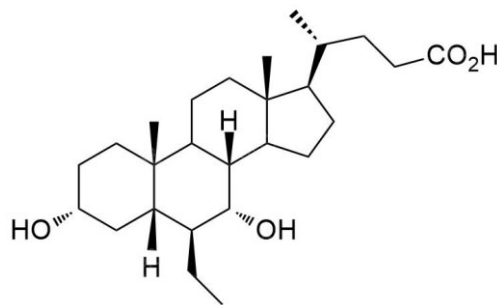


Figura 2: Struttura Acido Obeticolico

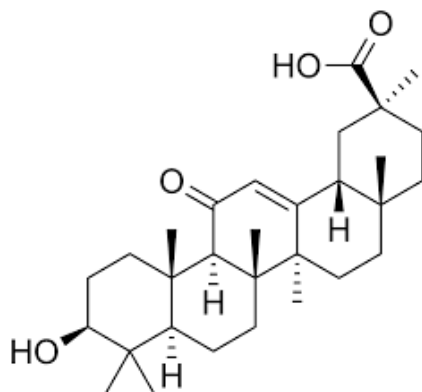


Figura 3: Struttura Acido Glicirretico

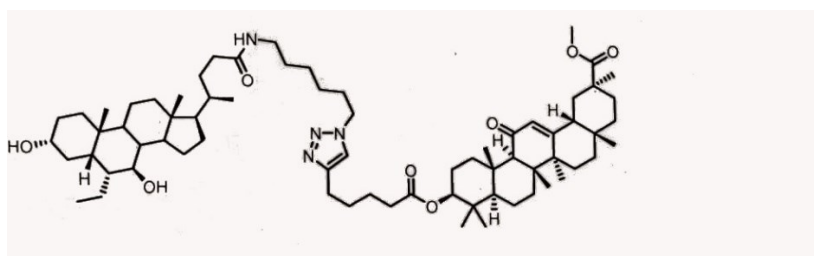


Figura 4: Struttura FS37

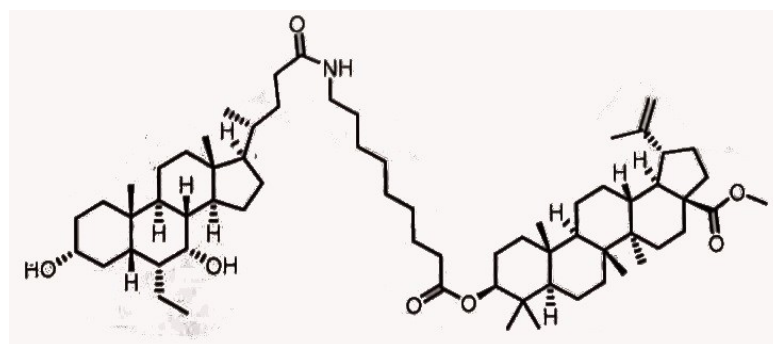


Figura 5: Struttura LP11

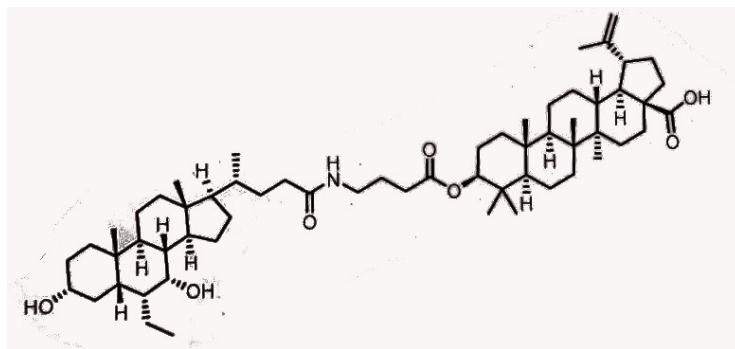


Figura 6: Struttura LP14

## 5.2 Metodi

### 5.2.1 Saggio di citotossicità mediante MTT

I farmaci sono stati analizzati per valutare eventuali effetti citotossici sulle cellule e per decidere la concentrazione ottimale di utilizzo. A questo scopo è stato impiegato il saggio MTT (bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) mediante l'utilizzo del kit Cell Proliferation I (Roche, cod. 11465007001).

Questo saggio colorimetrico sfrutta la capacità di un enzima cellulare mitocondriale (succinato deidrogenasi) di ridurre l'MTT (di colore giallo paglierino) a formazano, un sale di colore blu. L'enzima è attivo solo in cellule vive, quindi il viraggio di colore avverrà solamente nei pozzetti in cui le cellule sono ancora vive.

Sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti  $3 \times 10^5$  cellule Calu-3 per pozzetto in 100  $\mu\text{L}$  di DMEM 10% FBS. Il giorno successivo sono state trattate con concentrazioni scalari in base 10, da 10mM a 0,1 $\mu\text{M}$ , dei farmaci FS37, LP11, LP14 e acido glicirretico. Dopo 72 ore di incubazione sono stati aggiunti 10  $\mu\text{L}$  per pozzetto della soluzione 1 del kit contenente MTT e dopo un'ulteriore incubazione di 4 ore, sono stati aggiunti 100  $\mu\text{L}$  per pozzetto della soluzione 2. Il giorno seguente è stata eseguita la lettura della piastra allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 620 nm.

### 5.2.2 Produzione delle particelle simil-lentivirali esprimenti diverse glicoproteine

Le particelle simil-lentivirali sono state prodotte mediante tecnica della trasfezione con il calcio fosfato del sistema SIN nella linea cellulare 293T. In particolare, le particelle simil-lentivirali, esprimevano uno dei seguenti anti-recettori virali:

- **VSV-G:** glicoproteina "G" del Rhabdovirus della stomatite vescicolare (VSV-G)

- **Spike WT**: glicoproteina wild type del virus SARS-CoV-2
- **Spike D614G**: glicoproteina del virus SARS-CoV-2, isoforma mutata

I *Lentivirus* prodotti contengono la sequenza codificante per la proteina verde fluorescente (Green Fluorescent Protein, GFP), per facilitare l'osservazione e la titolazione negli esperimenti successivi.

2,5 x 10<sup>6</sup> cellule 293T sono state seminate in piastre cellulari ed il giorno seguente si è proceduto con la trasfezione. Sono state preparate le soluzioni necessarie alla trasfezione così costituite:

- TE 1/10
- 50µL CaCl<sub>2</sub>
- DNA: 1µg NR-52516, 0,22µg NR-52517, 0,22µg NR-52518, 0,22µg NR-52519, 0,34µg del plasmide codificante la glicoproteina (VSV-g, "Spike" o "Spike" portante la mutazione D614G)

Sono stati poi aggiunti 500 µL di 2x Hepes Phosphate Buffer (HPB) ed i tubi sono stati quindi incubati a temperatura ambiente per 30 minuti. Trascorsi i 30 minuti le soluzioni sono state aggiunte alle piastre contenenti le cellule ed incubate per 6 ore a 37°C.

Trascorse le 6 ore sono stati effettuati 2 lavaggi con PBS1X e sono stati aggiunti 12 mL di DMEM 10% FBS e le cellule sono state riposte nuovamente in incubatore per 60 ore a 37°C.

I surnatanti sono stati poi raccolti, centrifugati a 1000rpm per 8 minuti a 4°C, filtrati con filtri da 0,45 µm, concentrati su colonna e posti a -80°C. (Crawford et al. 2020; Giroglou et al. 2004)

### **5.2.3 Trasduzione delle particelle simil-lentivirali e titolazione mediante citofluorimetro**

Una volta prodotte le particelle simil-lentivirali, queste sono state utilizzate per trasdurre cellule VERO E6 al fine di valutarne il titolo in unità trasducenti per mL mediante il citofluorimetro.

In una piastra da 6 pozzetti sono state seminate 1 x 10<sup>5</sup> cellule Vero E6 e dopo 24 ore sono state trasdotte utilizzando diverse diluizioni delle particelle virali prodotte. Le diluizioni utilizzate sono state 1:100 e 1:500, in DMEM 10% FBS. La piastra è stata incubata per 5 ore, è stata effettuata un'aggiunta di 1ml di DMEM 10% FBS e nuovamente incubata per 72 ore.

Trascorse 72 ore di incubazione, le cellule sono state preparate per la lettura al citofluorimetro. Dopo un lavaggio con la soluzione di lavaggio, le cellule sono state staccate con l'ausilio di tripsina 0,5% per 5 minuti. Le cellule sono state poi centrifugate a 800 rpm per 5 minuti a 4°C, lavate nuovamente ed infine risospese in 500 µL di PBS1X. I tubi così preparati

sono stati conservati in ghiaccio sino al momento dell'analisi citofluorimetrica. (Denning et al. 2013)

#### 5.2.4 Verifica dell'efficienza di traduzione delle particelle simil-lentivirali prodotte

Dopo aver prodotto e titolato le particelle simil-lentivirali è stata verificata l'efficienza di trasduzione delle particelle esprimenti VSV-G e "Spike" wild-type di SARS-CoV-2, in cellule VERO E6 e Calu-3.

In unna piastra da 24 pozzetti sono state seminate  $1 \times 10^5$  cellule VERO E6 o  $1 \times 10^5$  cellule Calu-3 per pozzetto. Il giorno seguente le cellule sono state trasdotte con le particelle simil-lentivirali esprimenti le due diverse glicoproteine alle MOI (molteplicità d'infezione) di 1, 0,1 e 0,01 UT/cellula e la piastra incubata per 5 ore. Trascorso il periodo d'incubazione sono stati aggiunti 1 mL di DMEM 10% FBS per pozzetto e la piastra è stata nuovamente riposta in incubatore a 37°C per 72 ore.

Dopo 72 ore, è stato effettuato un lavaggio con PBS1X, sono stati aggiunti 100  $\mu$ L di PLB1X (Passive Lysis Buffer, Promega cod. E1941) e la piastra è stata posta in agitazione orbitale a temperatura ambiente per 15 minuti a 500 rpm. Trascorsi i 15 minuti è stata conservata a -80°C.

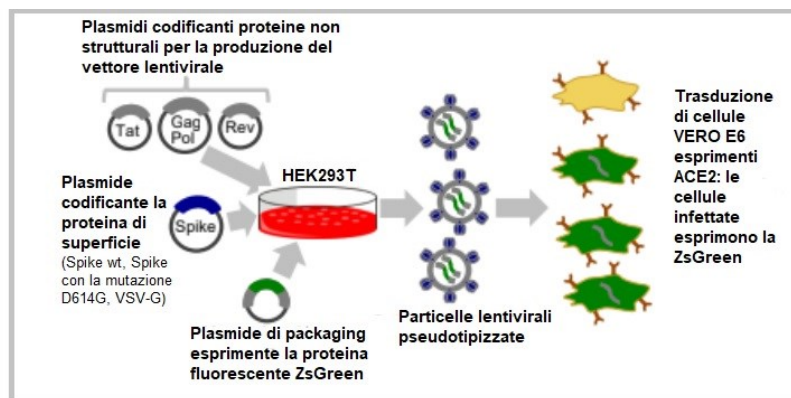


Figura 7. Rappresentazione schematica della produzione delle particelle simil-lentivirali. Immagine adattata da Crawford et al. 2020

La lettura per la quantificazione della fluorescenza di GFP, proporzionale all'efficienza di trasduzione, sono stati prelevati 30  $\mu$ L di lisato da ogni pozzetto e trasferiti in piastre da 96 pozzetti con fondo piatto nero (Costar). La fluorescenza è stata acquisita per 1 sec/pozzetto utilizzando uno spettrometro compatibile con misurazioni fluorescenti (VICTOR X2 Multilabel Plate Reader, PerkinElmer, Waltham, MA, USA) in combinazione con un filtro di eccitazione fluorimetrico (passa banda  $485 \pm 14$  nm) e un filtro di emissione fluorimetrico (passa banda  $535 \pm 25$  nm).

## 6 Risultati

### 6.1 Analisi citotossica in seguito a trattamento con i farmaci LP11, LP14, Acido Glicirretico e FS37

Prima di valutare l'effetto dei farmaci in presenza del virus, è necessario valutarne l'eventuale citotossicità e determinare la concentrazione ottimale di utilizzo mediante un saggio MTT. Le cellule Calu-3 sono state trattate con i farmaci FS37, LP11, LP14 e con l'acido glicirretico a diverse concentrazioni quali 10mM, 1mM, 0,1mM, 10µM, 1µM e 0,1µM. Dopo 72 ore di trattamento è stato aggiunto il kit MTT secondo il manuale d'istruzione e la piastra è stata letta allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 620 nm.

I risultati mostrati in Figura 8 dimostrano che tutti i farmaci utilizzati, in particolare l'acido glicirretico, mostrano effetti citotossici alla concentrazione di 10 mM. Alle concentrazioni inferiori, 1 mM, 0,1 mM e 0,01 mM i farmaci LP11 ed LP14 mostrano una tossicità maggiore rispetto agli altri due farmaci, FS37 e acido glicirretico.

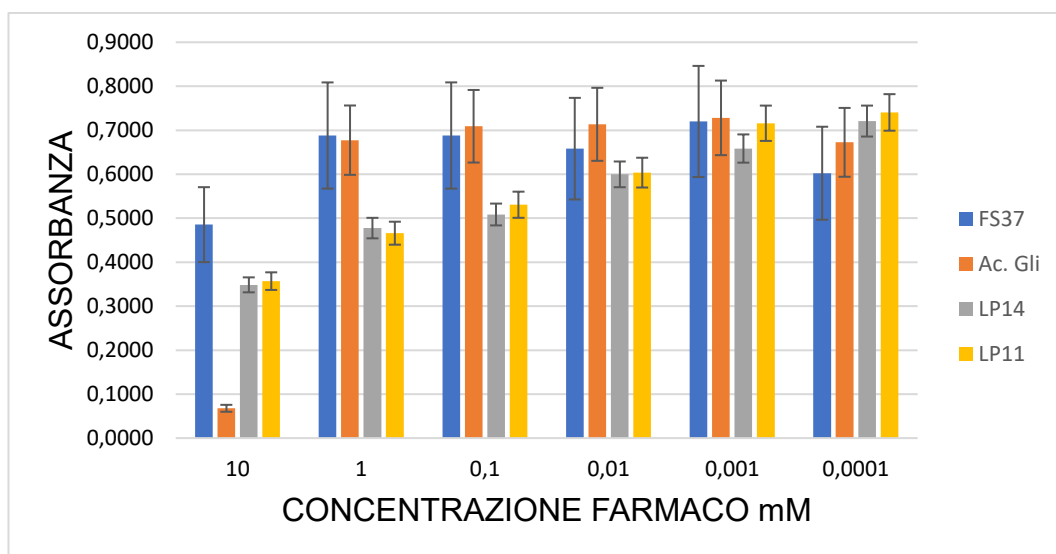


Figura 8. Valori di assorbanza del Saggio MTT con i farmaci FS37, Acido glicirretico, LP14 e LP11

IC50	
FS37	(0,490±0,086) mM
Acido Glicirretico	(2,226±0,259) mM
LP11	(2,619±0,147) mM
LP14	(2,767±0,135) mM

Figura9. Valori della Concentrazione Inibente al 50% calcolati con regressione lineare per ciascun farmaco

Alla luce di questi risultati abbiamo deciso che le concentrazioni ottimali di farmaco da utilizzare per gli esperimenti successivi in presenza delle particelle simil-lentivirali o del virus saranno 10 µM, 1 µM e 0,1 µM.



## 6.2 Analisi dell'efficienza di trasduzione da parte delle particelle lentivirali prodotte

La produzione delle particelle simil-lentivirali è stata valutata mediante trasduzione di cellule VERO E6.

1 x 10<sup>5</sup> cellule VERO E6 sono state seminate per pozzetto in una piastra da 6 pozzetti ed il giorno successivo sono state trasdotte con le particelle lentivirali opportunamente diluite, 1:100 e 1:500, al fine di valutarne il titolo in unità trasducenti per mL. Trascorse 72 ore dalla trasduzione, le cellule sono state preparate per la lettura della fluorescenza di GFP al citofluorimetro. La proteina fluorescente verde viene espressa solo nelle cellule trasdotte correttamente dalle particelle simil-lentivirali.

Al citofluorimetro sono state ottenute le seguenti percentuali di fluorescenza:

- 94% per simil-lentivirus esprimenti la proteina G di VSV
- 61,48% simil-lentivirus esprimenti la proteina "Spike" wt di SARS-CoV-2
- 65,38% per simil-lentivirus esprimenti la proteina "Spike" con la mutazione D614G di SARS-CoV-2

A partire dal valore ottenuto è possibile calcolare le unità trasducenti per mL con la seguente formula:

$$\frac{\text{unità trasducenti}}{\text{ml}} = \frac{\left(\frac{\% eGFP}{100}\right) \cdot n^{\circ} \text{cells} \cdot \text{fattore di diluizione}}{\text{volume trasduzione}}$$

Quindi, i titoli virali calcolati sono di seguito riportati:

- 4,23 x 10<sup>5</sup> UT/mL per i simil-lentivirus esprimenti la proteina G di VSV
- 2,76 x 10<sup>5</sup> UT/mL per i simil-lentivirus esprimenti la "Spike" wt di SARS-CoV-2
- 2,94 x 10<sup>5</sup> UT/mL per i simil-lentivirus esprimenti la "Spike" con la mutazione D614G di SARS-CoV-2

## 6.3 Valutazione dell'efficienza di traduzione delle particelle simil-lentivirali pseudotipizzate con VSV-G e "Spike" wild type di SARS-CoV-2

Dopo aver valutato il titolo delle precedentemente prodotte particelle simil-lentivirali ne è stata verificata l'efficienza di trasduzione trasducendo le linee cellulari VERO E6 e Calu-3 utilizzando MOI 0,01, MOI 0,1 e MOI 1. Dopo la trasduzione è stata verificata l'efficienza di trasduzione grazie al vettore per la GFP che le particelle contenevano.

Come osservabile in Figura 10, è emerso che l'efficienza di trasduzione è proporzionale alla MOI utilizzata e che la linea cellulare VERO E6 si trasduce meglio rispetto alla linea cellulare Calu-3.

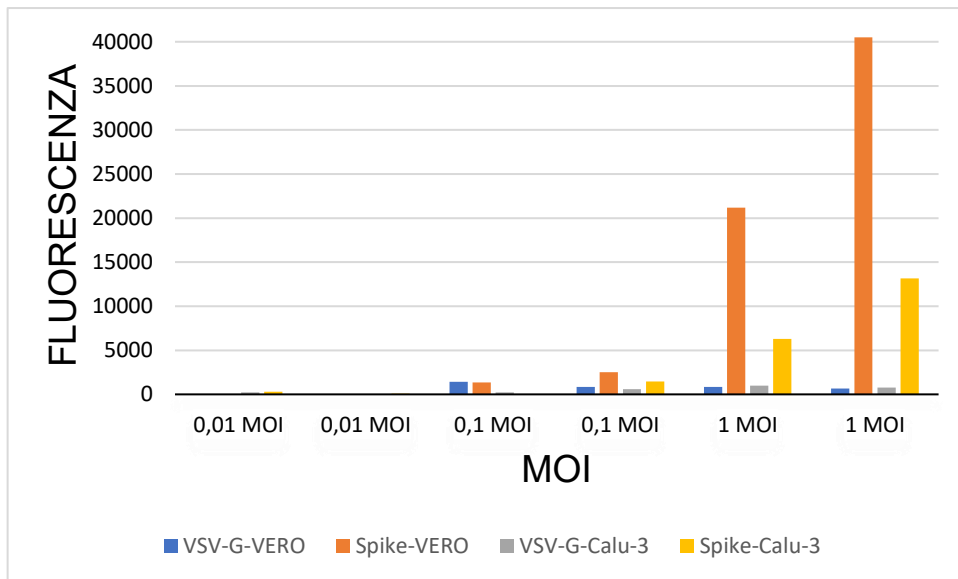


Figura 10. Valori della fluorescenza della GFP espressa in seguito a trasduzione delle cellule VERO E6 e Calu-3 con vettori lentivirali esprimenti VSV-G o la "Spike" wt di SARS-CoV-2.

## 7 Discussione e conclusioni

Dalle ricerche svolte durante questo elaborato di tesi è stato dimostrato che i farmaci sviluppati in silico e in seguito prodotti FS37, acido glicirretico, LP11 ed LP14 possono essere utilizzati in concentrazioni 10  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$  su cellule Calu-3 senza mostrare significativi effetti citotossici sulle cellule testate. Sarà quindi, in futuro, possibile testare la capacità inibitoria dei farmaci in presenza del virus SARS-CoV-2.

È stato dimostrato che la trasfezione di cellule 293T con il metodo del calcio fosfato è efficace per produrre particelle simil-lentivirali esprimenti la proteina "Spike" wild-type e la variante mutata della proteina "Spike" D614C di SARS-CoV-2, le particelle simil-virali ottenute mediante trasfezione sono in seguito state trasdotte su cellule VERO E6. La trasduzione ha portato alla produzione di  $2,76 \times 10^5$  UT/mL particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina "Spike" wild-type di SARS-CoV-2 e di  $2,94 \times 10^5$  UT/mL particelle simil-lentivirali esprimenti la proteina "Spike" con la mutazione D614G di SARS-CoV-2.

È stata poi valutata l'efficienza di trasduzione su cellule VERO E6 e Calu-3 utilizzando particelle simil-lentivirali esprimenti la glicoproteina "Spike" di SARS-CoV-2 o la proteina "G" di VSV ed è emerso che le cellule VERO E6 si trasducono meglio rispetto a cellule Calu-3 con l'utilizzo di particelle simil-lentivirali esprimenti la proteina "Spike" wild-type di SARS-CoV-2. Questo esperimento ha quindi permesso di ottenere i dati necessari, ovvero la MOI da utilizzare, all'impostazione degli esperimenti futuri dove verrà testata l'efficacia di inibizione dei farmaci FS37, acido glicirretico, LP11 ed LP14 nei confronti della trasduzione da parte di particelle simil-lentivirali esprimenti la proteina "Spike" wild-type o la proteina "Spike" con la mutazione D614G di SARS-CoV-2 su cellule Calu-3.

Attraverso gli esperimenti a cui questo elaborato di tesi ha preso parte è ora possibile affermare che la produzione di particelle simil-lentivirali di terza generazione, esprimenti la glicoproteina "Spike" dell'envelope di SARS-CoV-2, con il metodo del calcio fosfato, offre una valida alternativa per effettuare analisi preliminari riguardanti farmaci progettati con lo scopo di inibire l'entry di SARS-CoV-2, senza dover ricorrere all'utilizzo del virus wild-type.

## 8 Bibliografia

- Biancamaria Pietrangeli, E Fattori, M Biava, A Cara, e Z Michelini. 2014. «La biosicurezza connessa all'utilizzo di vettori lentivirali nella sperimentazione biotecnologica».
- Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. 2020. «The Species Severe Acute Respiratory Syndrome-Related Coronavirus: Classifying 2019-NCoV and Naming It SARS-CoV-2». *Nature Microbiology* 5 (4): 536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>.
- Crawford, Katharine H. D., Rachel Eguia, Adam S. Diggins, Andrea N. Loes, Keara D. Malone, Caitlin R. Wolf, Helen Y. Chu, et al. 2020. «Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays». *Viruses* 12 (5): 513. <https://doi.org/10.3390/v12050513>.
- Denning, Warren, Suwendu Das, Siqi Guo, Jun Xu, John C. Kappes, e Zdenek Hel. 2013. «Optimization of the Transductional Efficiency of Lentiviral Vectors: Effect of Sera and Polycations». *Molecular Biotechnology* 53 (3): 308–14. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9528-5>.
- Giroglou, Tsanan, Jindrich Cinatl, Holger Rabenau, Christian Drosten, Harald Schwalbe, Hans Wilhelm Doerr, e Dorothee von Laer. 2004. «Retroviral Vectors Pseudotyped with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus S Protein». *Journal of Virology* 78 (17): 9007–15. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.17.9007-9015.2004>.
- Hoffmann, Markus, Hannah Kleine-Weber, Simon Schroeder, Nadine Krüger, Tanja Herrler, Sandra Erichsen, Tobias S. Schiergens, et al. 2020. «SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor». *Cell* 181 (2): 271-280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>.
- Ou, Xiuyuan, Yan Liu, Xiaobo Lei, Pei Li, Dan Mi, Lili Ren, Li Guo, et al. 2020. «Characterization of Spike Glycoprotein of SARS-CoV-2 on Virus Entry and Its Immune Cross-Reactivity with SARS-CoV». *Nature Communications* 11 (1): 1620. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15562-9>.
- Walls, Alexandra C., Young-Jun Park, M. Alejandra Tortorici, Abigail Wall, Andrew T. McGuire, e David Veelsler. 2020. «Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein». *Cell* 181 (2): 281-292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>.
- Yan, Ke-Xia, Wen-Jie Tan, Xiang-Min Zhang, Hui-Juan Wang, Yan Li, e Li Ruan. 2007. «[Development and application of a safe SARS-CoV neutralization assay based on lentiviral vectors pseudotyped with SARS-CoV spike protein]». *Bing Du Xue Bao = Chinese Journal of Virology* 23 (6): 440–46.