

Симпозијум

COVID-19 ПАНДЕМИЈА:
ПОРУКЕ, НОВА САЗНАЊА И ДИЛЕМЕ

COVID-19 ПАНДЕМИЈА:
ПОРУКЕ, НОВА САЗНАЊА И ДИЛЕМЕ



Свечана сала САНУ, петак 4. јун 2021. године

10.00 УВОДНА РЕЧ
Академик Владимир С. Костић

Сесија 1 ШТА СМО ДО ДАНАС САЗНАЛИ О COVID-19 ИНФЕКЦИЈИ?		Сесија 2 КОМПЛИКАЦИЈЕ COVID-19 ИНФЕКЦИЈЕ		Сесија 3 НАУЧНИ ПРОЈЕКТИ ЧЛАНОВА САНУ И ЧЛАНОВА ОДБОРА САНУ: ИСТРАЖИВАЊА У ОБЛАСТИ COVID-19	
10.20	ЕПИДЕМИОЛОШКЕ ДЕТЕРМИНАНТЕ COVID-19 ПАНДЕМИЈЕ Проф. др Татјана Пекмезовић	12.40	ГОЈАЗНОСТ И COVID-19 Академик Драган Мицић	16.00	ИМУНОЛОШКИ ПРОФИЛ У ПАЦИЈЕНАТА СА РАЗЛИЧИТОМ ТЕЖИНОМ КЛИНИЧКЕ СЛИКЕ COVID-19 Виши научни сарадник Сергеј Томић
10.40	ВИРУС SARS-CoV-2 И ИМУНСКИ ОДГОВОР Академик Миодраг Чолић	13.00	ДИЈАБЕТЕС У ДОБА COVID-19 ПАНДЕМИЈЕ Академик Небојша М. Лалић	16.20	ПОРЕМЕЋАЈ РЕДОКС ХОМЕОСТАЗЕ У COVID-19 Дописни члан САНУ Татјана Симић
11.00	ПАТОХИСТОЛОШКЕ ПРОМЕНЕ У COVID-19 Академик Владимир Кањух	13.20	КАРДИОВАСКУЛАРНИ СИСТЕМ И COVID-19 Дописни члан САНУ Горан Станковић	16.40	ТЕРАПИЈА РНК-ВИРОЗА МАЛИМ МОЛЕКУЛИМА. ПРЕНАМЕНОВАЊЕ ИМИНОШЕЋЕРА И ХЛОРОКИНСКИХ АНАЛОГА ПРОТИВ COVID-19 Академик Радомир Н. Саичић
11.20	КЛИНИЧКА СЛИКА И ТЕРАПИЈА COVID-19: ШТА НИСМО ОЧЕКИВАЛИ Проф. др Горан Стевановић	13.40	ЦЕНТРАЛНИ НЕРВНИ СИСТЕМ И COVID-19 Академик Владимир С. Костић	17.00	ПРОИЗВОДЊА РЕКОМБИНАНТНИХ АНТИГЕНА SARS CoV-2 И ОДРЖИВИ РАЗВОЈ СЕРОЛОШКИХ И ИНОВАТИВНИХ АНТИГЕНСКИХ ТЕСТОВА НА COVID-19 Дописни члан САНУ Тања Ђирковић Величковић
11.40	ВАКЦИНАЦИЈА ПРОТИВ SARS-CoV-2: МОГУЋНОСТИ И НЕИСТРАЖЕНО Проф. др Тања Јовановић	14.00	МЕНТАЛНО ЗДРАВЉЕ У ДОБА КОРОНЕ Академик Душица Лечић Тошевски	17.20	УЛОГА АУТОФАГИЈЕ У ИМУНСКОЈ ДИСРЕГУЛАЦИЈИ ПРОУЗРОКОВАНОЈ SARS-CoV-2 ИНФЕКЦИЈОМ Проф. др Владимир Трајковић
12.00	Дискусија Пауза за кафу	14.20	Дискусија Пауза за ручак	17.40	Дискусија

ЗАВРШНА РЕЧ
Академик Миодраг Чолић

Производња рекомбинантних антигена и развој одрживих тестова за Covid-19

Тања Ћирковић Величковић*¹

¹ Универзитет у Београду – Хемијски факултет
tcirkov@chem.bg.ac.rs

Абстракт

Нови корона вирус (SARS CoV-2) је нови инфективни агенс за хуману популацију и веома је брзо детектован у великом броју земаља. Брзо ширење, одсуство имунитета на овај вирус и одсуство поузданих тестова за детекцију вируса у тренутку избијања пандемије су болест изазвану овим вирусом брзо претворили у здравствени и друштвени проблем највишег приоритета на глобалном нивоу. Иако су највеће биотехнолошке компаније убрзано почеле са развојем и масовном производњом дијагностичких тестова и вакцина, њихова доступност у тренуцима највеће потражње је и даље недовољна, а цене истих су лимитирајући фактор за бољу контролу болести и ширења пандемије. Тестови имају и своја ограничења, посебно када су у питању антигенски тестови, тако да се и даље ради на унапређењу осетљивости истих. У фокусу наших истраживања је развој дијагностичких и серолошких тестова за COVID-19. Дијагностички тестови детектују делове вируса: генетског материјала вируса, односно протеинске компоненте вируса. Серолошки тестови који детектују присуство антитела на протеине вируса. Важна компонента ових тестова је рекомбинанто произведен протеин. Истраживачки тим Хемијског факултета је до сада произвео рекомбинантне протеине шиљка и нуклеокапсида за потребе развоја серолошког теста и N протеин високе чистоће на великој скали за потребе добијања специфичких антитела и развоја антигенског теста. Добијена високо специфична поликлонска антитела на N протеин вируса из имунизованих животиња, биће употребљена за дизајн основног сендвич ЕЛИСА теста за детекцију SARS CoV-2 вируса на бази препознавања N-протеина вируса. Очекује се даље унапређење осетљивости теста применом различитих техника, као што су имобилисана специфична антитела на принципу имуноафинитетног ЕЛИСА теста што ће омогућити хватање вирусних антигена у хуманим телесним течностима попут крви, урина и пљувачке, и њихово даље концентрисање, што са једне стране повећава могућност за тачан резултат а са друге стране шири репертоар врсте узорака.

Кључне речи: SARS CoV-2, рекомбинантна производња протеина, нуклеокапсид, антигенски тест

1. УВОД

Нови корона вирус (SARS CoV-2) који се појавио у Вухану 2019 године припада групи једноланчаних РНК вируса [1]. Представља нови инфективни агенс за хуману популацију и веома је брзо детектован у великом броју земаља. Узрочник је респираторних инфекција које могу да буду праћене и веома тешком клиничком сликом. Брзо ширење, одсуство имунитета на овај вирус и одсуство поузданих тестова за детекцију вируса у тренутку избијања пандемије су болест изазвану овим вирусом брзо претворили у здравствени и друштвени проблем највишег приоритета на глобалном нивоу. Иако су највеће биотехнолошке компаније убрзано почеле са развојем и масовном производњом дијагностичких тестова и вакцина, њихова доступност у тренуцима највеће потражње је и даље недовољна, а цене истих су лимитирајући фактор за бољу контролу болести и ширења пандемије [2]. Развој сопствених и одржива производња тестова и вакцина за COVID-19 су од великог друштвеног значаја.

2. ТЕСТОВИ ЗА COVID-19

Тестови који се користе у контроли болести изазване новим корона вирусом могу да се поделе на три основна типа [3,4]:

Дијагностички тестови детектују делове вируса: real time RT PCR тестови за детекцију генетског материјала вируса и антигенски тестови који детектују протеинску компоненту вируса).

Серолошки тестови који детектују присуство антитела на протеине вируса и други тестови који детектују адаптивни имуни одговор.

Тестови за менаџмент пацијената су тестови који детектују биомаркере инфламације.

Најпоузданији дијагностички тест за утврђивање инфекције новим коронавирусом је тренутно RT-PCR и изводи се узимањем назалног и, или фарингеалног бриса. Принцип теста је прво реверзна транскрипција потенцијално присутне вирусне једноланчане РНК, а затим умножавање одабраних делова генома PCR-ом употребом специфичне

олигонуклеотидне пробе. Највећа предност ових тестова је њихова висока специфичност и због тога се и сматрају златним стандардом у дијагностици SARS CoV-2 изазваних инфекција. Међутим, више различитих фактора може довести до лажно негативних резултата у случају RT-PCR тестова. Неки од њих су лош квалитет узорка, прикупљање узорка у прераној или прекасној фази инфекције, неисправно руковање или транспорт узорка, оштећење вирусне РНК или инхибиција саме RT-PCR -а реакције различитим контаминантима ензима који се користе у овом тесту (реверзна транскриптаза, ДНК полимераз). Поред тога, извођење RT-PCR тестова је процес који траје релативно дуго и захтева изузетно добро обучен кадар, што негативно утиче на ефикасност и брзину тестирања, као и на контролу болести у најранијим фазама инфекције [1]. Ови тестови се најлакше и најбрже развијају. Неопходан предуслов за нове тестове је познавање генома вируса и његових специфичних секвенци. Информације о геному вируса су веома брзо биле доступне научној јавности (први геном SARS CoV-2 је био доступан јавности већ у јануару 2020) и развој одговарајућих тестова је потом захтевао оптимизацију реакције употребном специфичних олигонуклеотидних проба које се рутински синтетишу. Подаци о секвенци генома вируса су изузетно значајни за праћење епидемиологије и настанка SARS CoV-2, као и за проучавање миграције различитих варијанти вируса. Популарна база GISAID је до данас прикупила више од два милиона секвенци SARS CoV-2 вируса из више од 120 земаља (<https://www.gisaid.org/>).

Серолошки тестови детектују присуство антитела на SARS CoV-2 у серуму инфицираних особа и важно су помоћно дијагностичко средство за праћење тока болести и имунског одговора на вакцинацију [5]. Први серолошки тестови за детектовање инфекције SARS CoV-2 су били имунофлуоресцентни тестови и ензимима посредовани имуносорбентни тестови (ЕЛИСА) са ћелијама зараженим коронавирусом или са лизатима таквих ћелија. Иако је осетљивост таквих тестова била велика, велика мана им је била безбедност – висок ниво безбедности је неопходан како би се изводили тестови који користе целе вирусе способне за инфицирање ћелија. Осим тога, специфичност оваквих тестова није била висока. Различите протеинске компоненте вируса поседују различите степене хомологије са сличним вирусима што је узрок лажно позитивних резултата.

Боље познавање биологије вируса и проучавање протеинских секвенци битних за имунски одговор на вирус је брзо довело и до унапређења серолошких тестова, јер су исти могли да се дизајнирају употребом протеинских компоненти вируса (антигена), које је могуће производити хетерологом експресијом у различитим експресионим системима техником рекомбинантне производње протеина. Рекомбинантно произведени протеини нису инфективни и тестови на бази рекомбинантних протеина се лакше стандардизују. Важно питање је, међутим, који од вирусних протеина одабрати за развој серолошког теста. Правилним одабиром антигена, њихове комбинације, или фрагмената истих, могуће је постићи високу осетљивост и високу специфичност серолошких тестова. Први серолошки тестови на рекомбинантне протеине су били на бази протеина нуклеокапсида, најзаступљенијег протеина SARS CoV-2. Данас су више у употреби тестови на бази комбинације антигена, или на бази протеина шилка, уколико је праћење ефикасности вакцинације у фокусу.

Дијагностички тестови који детектују протеине вируса (*антигенски тестови*) су најзахтевнији за развој и представљају алтернативу PCR тесту. Одликује их много краће време постизања резултата у односу на PCR тест, не захтевају високо обучен кадар за извођење и економски су исплативији од PCR тестова. За развоје теста не само да је потребан стандардни протеин, антиген вируса, већ је потребно произвести и друге компонентне теста, специфична антитела која се користе у детекцији антигена. Специфична антитела се најједноставније добијају имунизацијом животиња, или технологијом производње моноклонских антитела у култури ћелија. Основни тест је на бази ензимима посредованог имуносорбентног теста (ЕЛИСА), а варијанте антигенског теста са латералним протоком су популарне за тзв. брзу, кућну дијагностику присуства протеина вируса у назофарингеалном брису. Нека основна решења таквих тестова су комерцијално доступна од ране јесени 2020, а неки постижу већ завидну тачност од преко 90%. Како је реакција препознавања антиген-антитело веома специфична, ове тестове карактерише висока специфичност, али и мала осетљивост, због чега имају ограничену употребу у дијагностици инфекције SARS CoV-2.

Табела 1. Упоредни преглед компоненти потребних за развој тестова за детекцију вируса и имунског одговора на бази ЕЛИСА

	Серолошки тестови	Антигенски тестови
Вирус-специфичне компоненте теста	Антиген	Антиген Антиген-специфична антитела
Стандардне компоненте теста	Специфична анти-хумана антитела за детекцију IgG или IgM и визуализацију сигнала	Секундарна обележена антитела за визуализацију сигнала

3. ПРОТЕИНИ ВИРУСА

Вирусни геном кодира структурне и неструктурне протеине вируса. Структурни протеини вируса су главни кандидати за антигене и важни протеини за инфекцију и улазак вируса у ћелије домаћина. Једноставна структура вируса је изграђена од 4 структурна протеина: протеин шиљка (S), протеин омотача (E), мембрански протеин (M) и протеин нуклеокапсида (N), који је и најзаступљенији протеин вируса [6].

S протеин је гликопротеин масе око 180 kDa и поседује 849 аминокиселина. Присутан на површини вируса као тример и поседује два домена, рецептор-везујући домен (S1) и домен за фузионисање вируса са ћелијом домаћина (S2) [7]. S1 домен се састоји од два дела од којих N-терминални субдомен везује сијалинску киселину, а део C-терминалног субдомена (RBD) се везује специфично за рецепторе на површини ћелија домаћина. Важна улога у процесу инфекције вирусом, чине га главним кандидатом за вакцину која генерише антитела за неутрализацију овог протеина, онемогућавајући га да интерагује са специфичним рецепторима на површини ћелија (ACE2 рецепторима) [8]. Протеин шиљка је и важан антиген вируса и често је компонента и серолошких тестова. Сложена структура и висок степен гликозилације овог протеина чине да се његово добијање

рекомбинантном технологијом углавном изводи у еукариотским експресионим системима [9, 10].

N протеин молекулске масе 50 kDa има високо конзервирану аминокиселинску секвенцу. Већи део структуре овог протеина је неуређен [11]. Садржи пет домена од којих сви учествују у везивању РНК [12, 13]. Поседује и домен за димеризацију. Протеини нуклеокапсида (N протеин) су високо очувани међу члановима фамилије коронавируса, укључујући и хумане коронавирусе, који су заступљени у људској популацији и изазивају симптоме сличне симптомима прехладе [15]. Због тога, иако су главни кандидати за антигене, и лако се производе у рекомбинантној форми, често могу да реагују неспецифично у серолошком тесту [16].

4. РЕКОМБИНАНТНА ПРОИЗВОДЊА ПРОТЕИНА

Рекомбинантна технологија омогућава производњу протеина у организмима који не производе дати протеин (хетеролога производња), пре свега ради пречишћавања протеина у циљу различитих апликација. Најважнији организми за експресију рекомбинантних протеина су бактерије, квасци, инсекти и еукариотске ћелије. За сваки организам технологија клонирања гена, производње протеина и узгајање организма за експресију имају своје специфичности. Технологија клонирања у сврху производње протеина може да олакша поступак пречишћавања протеина, захваљујући употреби наменски дизајнираних вектора који олакшавају процесовање производа увођењем секвенци које касније могу да се користе у поступку пречишћавања протеина.

Сисарски експресиони системи по правилу имају нижи ниво експресије од квасаца и бактерија. Квасце и бактерије је, међутим, немогуће користити за производњу гликопротеина због хипергликозилације у случају квасаца и одсуства гликозилације у бактеријама.

Основне фазе рекомбинанте производње протеина су:

- Избор антигена;
- Избор гена (варијанте гена, фрагмента гена);

- Избор домаћина;
- Синтеза гена и оптимизација кодона;
- Избор вектора (олакшано пречишћавање);
- Клонирање гена;
- Трансфекција;
- Узгајање ћелија (производња рекомбинантног протеина);
- Пречишћавање протеина и потврда примарне, секундарне и терцијарне структуре.

Релевантни антигени протеина новог корона вируса су са успехом добијени у циљу њихове производње за потребе развоја и производње домаћих тестова на бази антитела на COVID-19 током 2020. године. Фрагмент N протеина молекулске масе 40 kDa је добијен експресијом у бактеријским ћелијама [17]. Протеин шилка и његови фрагменти су добијени експресијом у сисарским ћелијама.

5. РАЗВОЈ ОДРЖИВИХ ТЕСТОВА ЗА COVID-19

5.1. Употреба рекомбинантних протеина за потребе развоја серолошког ЕЛИСА теста

Произведени антигени су се имунолошки тестирали у оквиру пројекта ”*Sustainable production of serological IgG test for SARS CoV-2*”, у ко-координацији са ИНЕП институтом, који је финансирао USAID УНДП. Резултат овог пројекта је регистрован домаћи одрживи ЕЛИСА кит за детекцију антитела на нови корона протеин, који је од јула 2021. године у употреби у специјализованим дијагностичким лабораторијама. Тест детектује оба антигена новог корона вируса и за потребе регистрације, екстерну валидацију је радио Торлак институт. Тест је базиран на два антигена, оба произведена у лабораторијама Хемијског факултета и први је домаћи тест који је регистрован од стране Агенције за лекове и медицинска средства Републике Србије на бази рекомбинантних протеина произведених у земљи.

5.2. Развој антигених тестова за детекцију протеина омотача вируса SARS CoV-2 у биолошким течностима COVID-19 пацијената

Пројекат „Развој антигених тестова за детекцију протеина омотача вируса SARS CoV-2 у биолошким течностима COVID-19 пацијената“ – CAPSIDO, је биомедицински пројекат којим координише Хемијски факултет Универзитета у Београду, а реализује се уз сарадњу са Пољопрвредним факултетом Универзитета у Београду и Институтом за примену нуклеарне енергије као спољним партнером пројекта. Финансиран је од стране Фонда за Науку Републике Србије из позива Специјалног програма истраживања COVID-19. Циљ пројекта је креирање антигених тестова који би били потпуно произведени у Србији али и унапређени у смислу осетљивости. Основа ових антигених тестова јесте у сендвич ЕЛИСА методи. Два специфична антитела су неопходна да би се антиген корона вируса заробио у „сендвичу“ између два антитела. Специфичан сигнал се умножава детекцијом уз секундарно антитело обележено ензимом и квантификује у односу на стандард, пречишћени протеин вируса. За потребе развоја основног теста, одабрани антиген је N протеин, и у првој фази пројекта је на већој скали произведен протеин у довољним количинама и високе чистоће да омогући имунизацију животиња и припрему стандарда за тест. У првој фази пројекта је добијено 16 милиграма протеина високе чистоће (више од 95%), чија тржишна вредности износи 2600 USD по милиграму протеина. Истраживачки тим је решио и проблеме који прате изоловање протеина, склоног агрегацији и деградацији током поступка пречишћавања [18]. Упоредно су произведени протеини у бактеријама и сисарским ћелијама и након провере стабилности и чистоће протеина, протеин за потребе развоја теста је произведен на великој скали само из солубилне фракције протеина добијених експресијом у бактеријским ћелијама. Масеном спектрометријом високе резолуције је валидирана структура произведеног протеина (Слика 1), а реактивност према IgG и IgM антителима је проверена техником имуноблота (Слика 2).

Слика 1

Слика 2

Добијена високо специфична поликлонска антитела на N протеин вируса из имунизованих животиња, биће употребљена за дизајн основног сендвич ЕЛИСА теста за детекцију SARS CoV-2 вируса на бази препознавања N-протеина вируса. У првом триместру друге године имплементације пројекта, очекује се даље унапређење осетљивости теста применом различитих техника, као што су имобилисана специфична антитела на принципу имуноафинитетне ЕЛИСА теста што ће омогућити хватање вирусних антигена у хуманим телесним течностима попут крви, урина и пљувачке, и њихово даље концентрисање, што са једне стране повећава могућност за тачан резултат а са друге стране шири репертоар врсте узорака.

6. Закључак

Применом рекомбинантне технологије произведени су SARS CoV-2 протеини одговарајућих особина за потребе развоја дијагностичких и серолошких тестова. Применом рекомбинантне технологије, уз оптимизацију и стандардизацију производног процеса, као и валидацију савременим аналитичким методама, могуће је развијати и даље унапређивати иновативне дијагностичких тестове, као предуслов њихове одрживе производње у земљи.

7. Захвалница

Аутори су захвални за финансијску подршку Министарству просвете, науке и технолошког развоја (уговор број 451-03-68/2020-14/200168) и Фонду за науку Републике Србије, пројекат #7542203, COVID-19-CAPSIDO.

8. Библиографија

1. Zhu N, Zhang D, Wang W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, Vol. No. 382, pp. 727–733, 2020.

2. Adhikari SP, Meng S, Wu YJ. Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infectious Diseases of Poverty*, Vol. 9, pp. 29, 2020.
3. <https://www.fda.gov/>
4. Ahn DG, Shin HJ, Kim MH. Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (COVID-19) *Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol.30, pp. 313–324, 2020.
5. Petherick A, Developing antibody tests for SARS-CoV-2, *The Lancet*, Vol. 395, No. 10230, pp. 1101-1102, 2020.
6. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, Prashar V, Gupta GD, Panicker L, Kumar M. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *Journal of Molecular Biology*, Vol. 433, No. 2, pp. 166725, 2021.
7. Xiuyuan Ou, Yan Liu, Xiaobo Lei, Pei Li, Dan Mi, Lili Ren, Li Guo, Ruixuan Guo, Ting Chen, Jiabin Hu, Zichun Xiang, Zhixia Mu, Xing Chen, Jieyong Chen, Keping Hu, Qi Jin, Jianwei Wang. Zhaohui Qian, Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV, *Nature Communications*, Vol. 11, No.1, pp.1620, 2020.
8. Wrapp D, Wang N, Corbett KS, Goldsmith JA, Hsieh CL, Abiona O, Graham BS, McLellan JS. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, Vol 367, pp. 1260–1263, 2020.
9. Walls AC, Park YJ, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. Vol. 181, No. 2, pp. 281-292.e6, 2020.
10. Cai Y., Zhang J., Xiao T., Peng H., Sterling S.M., Walsh R.M., Jr., Rawson S., Rits-Volloch S., Chen B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein. *Science*, Vol.369, No. 6511, pp. 1586-1592, 2020
11. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, Zhang Q, Shi X, Wang Q, Zhang L, Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, Vol. 581, pp. 215–220. 2020.
12. Ye Q, West AMV, Silletti S, Corbett KD. Architecture and self-assembly of the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. *Protein Science*, Vol. 29, pp. 1890–1901, 2020.

13. Lu S, Ye Q, Singh D, Cao Y, Diedrich JK, Yates JR 3rd, Villa E, Cleveland DW, Corbett KD. The SARS-CoV-2 nucleocapsid phosphoprotein forms mutually exclusive condensates with RNA and the membrane-associated M protein. *Nature Communications*, 2021, Vol. 12, No. 1, pp. 502.
14. Zhao H, Wu D, Nguyen A, Li Y, Adão RC, Valkov E, Patterson GH, Piszczek G, Schuck P. Energetic and structural features of SARS-CoV-2 N-protein co-assemblies with nucleic acids. *iScience*. Vol. 24, No. 6, pp. 102523. 2021.
15. Yu I.M., Oldham M.L., Zhang J.Q., Chen J. Crystal structure of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus nucleocapsid protein dimerization domain reveals evolutionary linkage between Corona- and Arteriviridae. *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 281, pp. 17134–17139, 2006.
16. Espejo AP, Akgun Y, Al Mana AF, Tjendra Y, Millan NC, Gomez-Fernandez C, Cray C. Review of Current Advances in Serologic Testing for COVID-19. *American Journal of Clinical Pathology*. Vo. 154, No. 3, pp. 293-304, 2020.
17. Djukic T, Mladenovic M, Stanic-Vucinic D, Radosavljevic J, Smiljanic K, Sabljic L, Devic M, Cujic D, Vasovic T, Simovic A, Radomirovic M, Cirkovic Velickovic T. Expression, purification and immunological characterization of recombinant nucleocapsid protein fragment from SARS-CoV-2. *Virology*, Vol. 557, pp. 15-22, 2021.
18. Tarczewska A, Kolonko-Adamska M, Zarębski M, Dobrucki J, Ożyhar A, Greb-Markiewicz B. The method utilized to purify the SARS-CoV-2 N protein can affect its molecular properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 188, pp. 391-403, 2021.

Recombinant protein production and development of sustainable tests to Covid-19

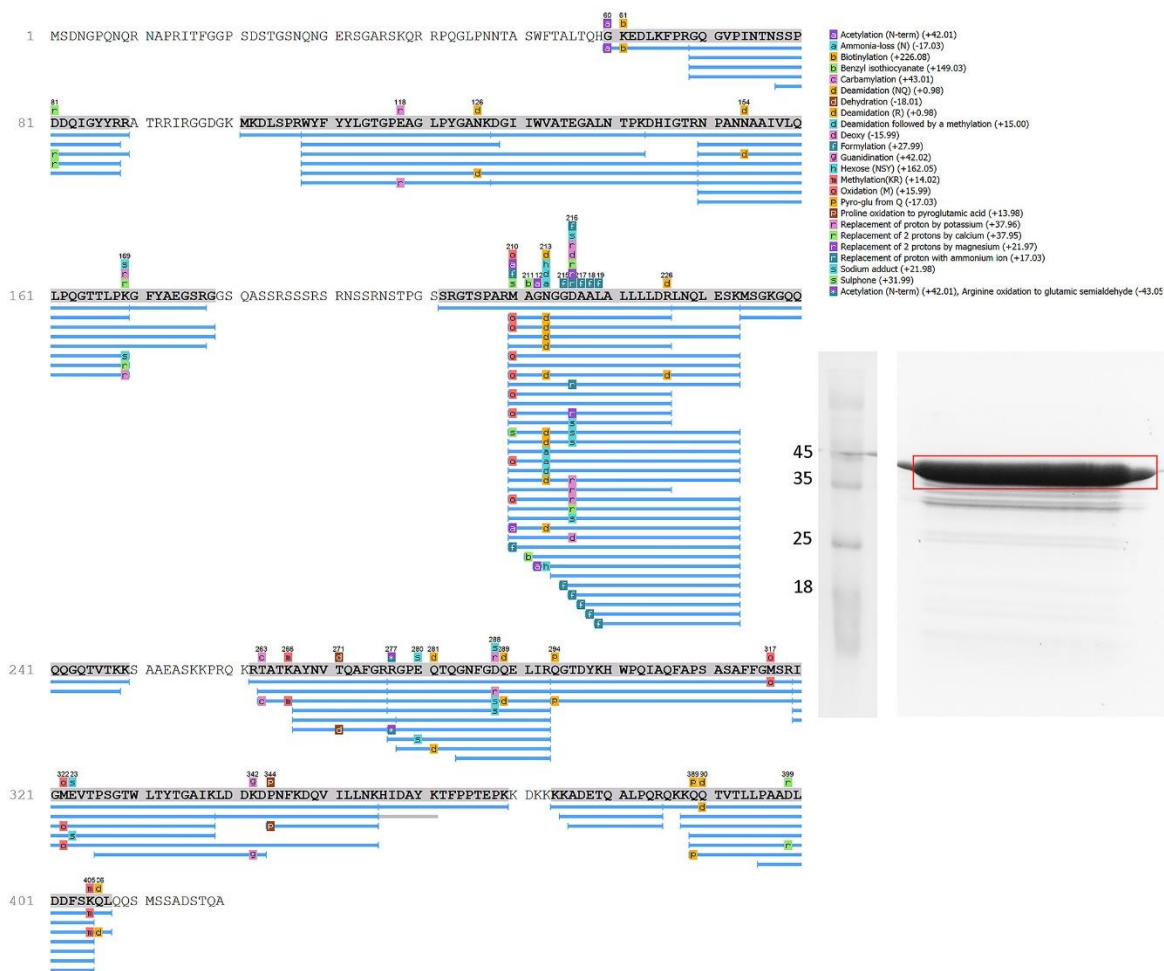
Tanja Cirkovic Velickovic

Summary

The new corona virus (SARS CoV-2) is a new infectious agent for the human population and has been detected very quickly in a large number of countries. The rapid spread, lack of immunity to this virus and the absence of reliable tests to detect the virus at the time of the pandemic outbreak have quickly turned the disease caused by this virus into a health and social problem of the highest priority globally. Although the largest biotechnology companies have rapidly begun to develop and mass-produce diagnostic tests and vaccines, their availability in times of greatest demand is still insufficient, and their prices are a limiting factor for better disease control and pandemic spread. Tests also have their limitations, especially when it comes to antigen tests, and more work is needed in order to improve their sensitivity. The focus of our research is the development of diagnostic and serological tests for COVID-19. Diagnostic tests detect parts of the virus: the genetic material of the virus, or the protein component of the virus. Serological tests detect the presence of antibodies to virus proteins. An important component of these tests is recombinantly produced protein (antigen). The research team of the Faculty of Chemistry has so far produced recombinant spike proteins and nucleocapsids for the development of a serological test and high-purity N protein on a large scale for the purpose of obtaining specific antibodies and antigen tests development. The obtained highly specific polyclonal antibodies to the N protein of the virus from immunized animals will be used to design a basic sandwich ELISA test for the detection of SARS CoV-2 virus based on the recognition of the N-protein of the virus. It is expected to further improve the sensitivity of the test using various techniques, such as immobilized specific antibodies on the principle of immunoaffinity ELISA test which will allow the capture of viral antigens in human body fluids such as blood, urine and saliva, and their further concentration, which on the one hand increases the possibility of accurate result and on the other hand expands the repertoire of sample types.

Легенде уз слике:

Слика 1. Карактеризација добијеног протеина масеном спектрометријом. Преузето, уз дозволу издавача Elsevier из [17]



Слика 2. Имунореактивност рекомбинантног протеина тестирана у имуноблоту, уз 3 негативна узорка (1-3) и пет позитивних узорака (4-8). Преузето, уз дозволу издавача Elsevier из [17]

