

TEST NEUTRALIZACIJE SARS-COV-2 KAO KLJUČ ZA UVOĐENJE SEROTERAPIJE U LIJEČENJU COVID-19 U HRVATSKOJ

Beata Halassy



Sveučilište u
Zagrebu

Centar za istraživanje i prijenos znanja u biotehnologiji

Centar izvrsnosti za virusnu imunologiju i cjepiva



Center of excellence
[for]
Virus Immunology and Vaccines

Pasivna imunoterapija

... primjena antitijela specifičnih za patogen u profilaksi ili terapiji bolesti koju uzrokuje taj patogen; poznata više od 100 godina (od 1890-ih)

Izraz **SEROTERAPIJA**

... bilo kompletni serum, koji sadrži i antitijela, ili pročišćena antitijela porijeklom iz seruma

Jedino sredstvo za liječenje određenih infektivnih bolesti prije otkrića/razvoja antimikrobne terapije u 1940-tima.

Prva sustavno učinkovita **antimikrobna strategija**.

5 Nobelovih nagrada podijeljenih za otkrića vezana uz liječenje infektivnih bolesti antitijelima:

1901 Emil **von Behring** i Shibasaburo **Kitasato**

za otkriće serumske terapije

serum kunića imuniziranih toksinom tetanusa može spriječiti tetanus u kunića

1908 Paul **Erlich**

za uspostavu područja humoralne imunosti i koncepata aktivne i pasivne imunizacije; radio na stvaranju imunosti na toksine u životinja

1972 Gerald M **Edelman** i Rodney R **Porter**

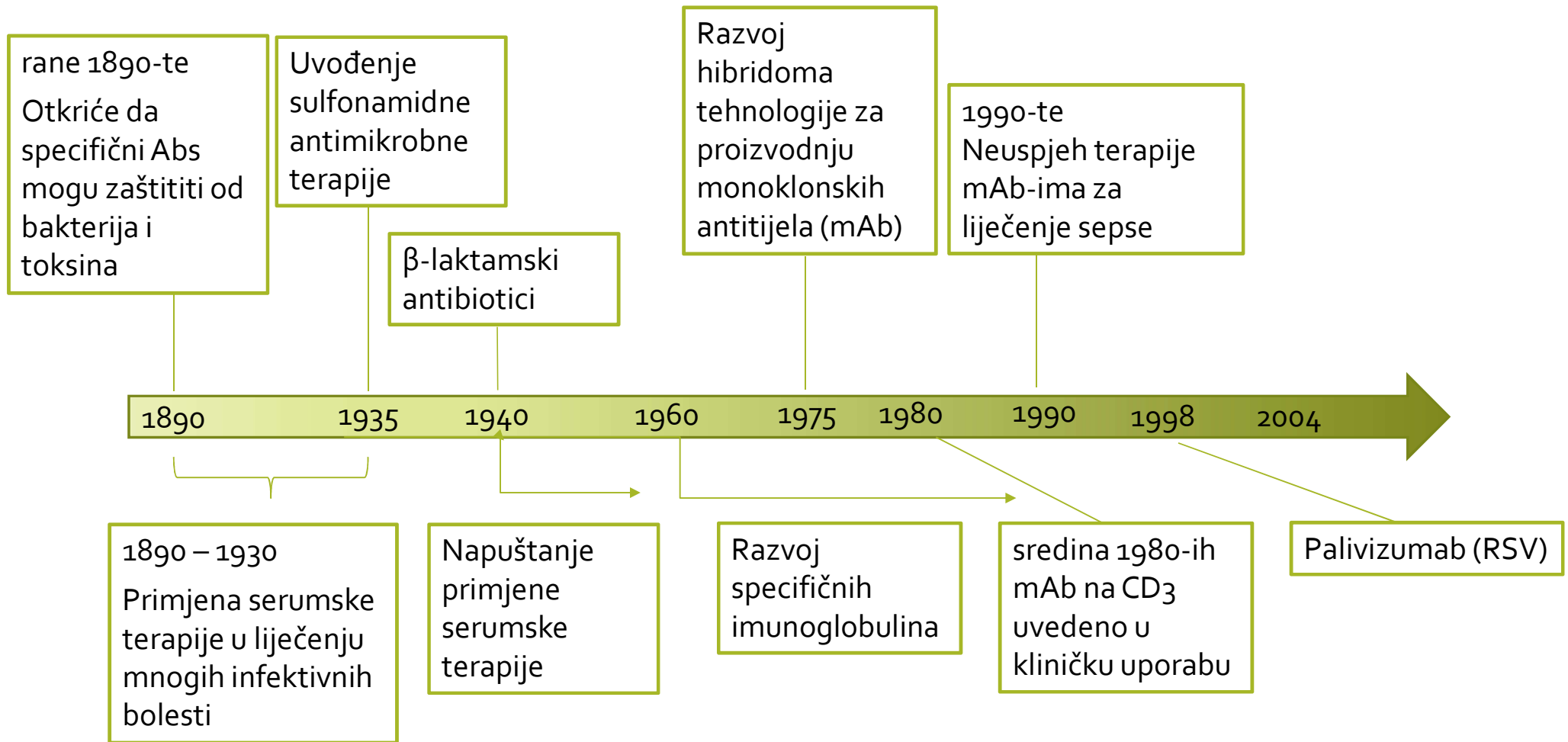
za otkrića koja su razjasnila kemijsku strukturu antitijela

1984 Georges JF **Köhler** i Cesar **Milstein**

za otkriće principa proizvodnje monoklonskih antitijela

1987 Susumu **Tonegawa**

za otkriće genetskog principa u podlozi generiranja raznolikosti antitijela



Vremenska crta preuzeta iz Casadevall *et al.* NatRev2004

Generalni principi pasivne terapije antitijelima (na osnovu iskustva u njezinoj stoljeće dugoj primjeni u borbi s infektivnim bolestima):

- učinkovitija je u profilaksi nego u liječenju;
- kad se koristi u liječenju, antitijela su najučinkovitija kad su primijenjena neposredno nakon pojave simptoma
- mora se primijeniti dovoljna (visoka) količina antitijela.

Farmaceutski oblici u normalnim, redovnim okolnostima:

specifični poliklonski imunoglobulini (pročišćeni iz krvi cijepljenih davatelja)
monoklonska antitijela (rjeđe)

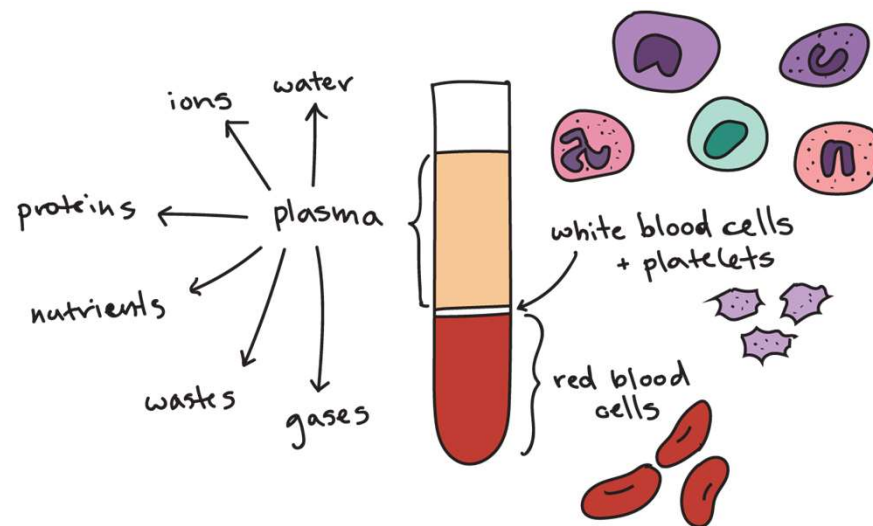
Interes za uporabom antitijela u borbi s infektivnim bolestima danas postoji u sljedećim okolnostima:

~~široka rasprostranjenost mikroba otpornih na lijekove,~~
pojava novih mikroorganizama,
relativna neučinkovitost antimikrobnih lijekova u imunokompromitiranih terapije bazirane na antitijelima su jedini način za uspostavu trenutne imunosti protiv biološkog oružja

U vremenima iznenadnih zaraznih bolesti i pandemija (gripa, SARS-CoV-1, MERS, Ebola)

nema dovoljno vremena ili resursa da bi se proizveli imunoglobulinski pripravci

plazma rekonvalescenata je oblik lijeka koji se koristi za pasivnu terapiju Abs-ima
(Bloch *et al.*, 2020).



Iskustva iz prijašnjih epidemija s drugim koronavirusima (SARS-CoV-1, MERS) rekonvalescentni serumi sadrže antitijela sposobna neutralizirati relevantni virus primjena takvih seruma je donijela dobrobit liječenim pacijentima.

Casadevall & Pirofski. JCI 2020;130:1545

Cheng et al. EJCMID 2005;24:44

Prve nerandomizirane studije

sigurnost i moguća učinkovitost CCP tretmana u COVID-19 hospitaliziranih pacijenata.

Duan et al. PNAS 2020;117:9490;

Shen et al. JAMA 2020; 323:1582-9;

Joyner et al. JCI2020;130:4791;

Liu et al. NatMed2020;26:1708)

Terapija serumima punim antitijelima prikupljenim od onih koji su bolest preboljeli je istraživana u protekloj godini u cijelom svijetu.

Barreira et al. FrontMed 2021;8:1

Cohn et al. Transfus 2021;61:44

Katz. NEJM 2021;384:666

Libster et al. NEJM 2021;384:610

Terapija plazmom rekonvalescenata se generalno smatra blagotvornom temeljem mnogobrojnih primjera njene primjene u liječenju, kako povijesnih tako i recentnih.

Casadevall & Scharff, CID 1995;21:150

Graham & Ambrosino, CurrOppHIV 2015;10:129

Luke et al. AnnalsIntMed 2006;145:599

Definitivan dokaz njene učinkovitosti dobiven u brižno planiranim randomiziranim kliničkim studijama **nedostaje.**

Bloch et al. JCI 2020;130:2757

Subbarao et al. EJI 2020;50:1447

Kad su i provedene, obično nisu uspjele pokazati benefit primjene plazme u odnosu na placebo.

Razlozi se nalaze u specifičnim okolnostima u kojima se CP primjenjuje:

vremenski period CP primjene je kratak (u vrijeme epidemija; dok ne postoje patogen-specifične terapije i patogen-specifična cjepiva)

patogen je nov i nedovoljno poznat

metode za procjenu sposobnosti plazme da neutralizira virus se tek razvijaju, nisu standardizirane, još manje validirane

njihovi rezultati variraju unutar jedne studije,

nisu usporedivi između različitih kliničkih slučajeva, serija slučajeva, studija.

CP je kompleksan, nestandardiziran lijek

količine neutralizirajućih antitijela,

količine nespecifičnih imunomodulatora

variraju među dozama plazme prikupljenim od različitih davatelja

Hurt & Wheatley, Viruses 2021;13:1

Joyner et al. NEJM 2021;384:1015

Cilj:

uspostaviti karakterizaciju COVID-19 rekonvalescentne plasme (CCP) na način koji omogućuje

pouzdanu probir plazma doza za terapiju
usporedbu hrvatskog s međunarodnim pristupom

u okolnostima kad ne postoje jasne smjernice i metodologija nije dostupna

Strategija:

razvoj testa neutralizacije divljeg tipa SARS-CoV-2

BSL₃ patogen

Test neutralizacije redukcijom plakova (PRNT)
(bazira se na tzv. Plaque testu)

Test neutralizacije virusa – ED₅₀ test
(baziran na CCID₅₀ testu)

Niži biosigurnosni rizik
Bolja rezolucija



Nema CPE
Glatki, čisti stanični sloj



Izražen CPE
Manifestiran u obliku rupa, nakupina,
vakuola u staničnom sloju

SARS-CoV-2 /
Vero E6
stanice

I Binarna serija razrjeđenja seruma

Faktor razrjeđenja

- 2 4 8 16 32 64 128 256 512 1024 2048

Volumen originalnog seruma($\mu\text{L}/\text{well}$)

25 12.5 6.25 3.13 1.56 0.78 0.39 0.2 0.1 0.05 0.03

II challenge virus cca 20
CCID₅₀/well



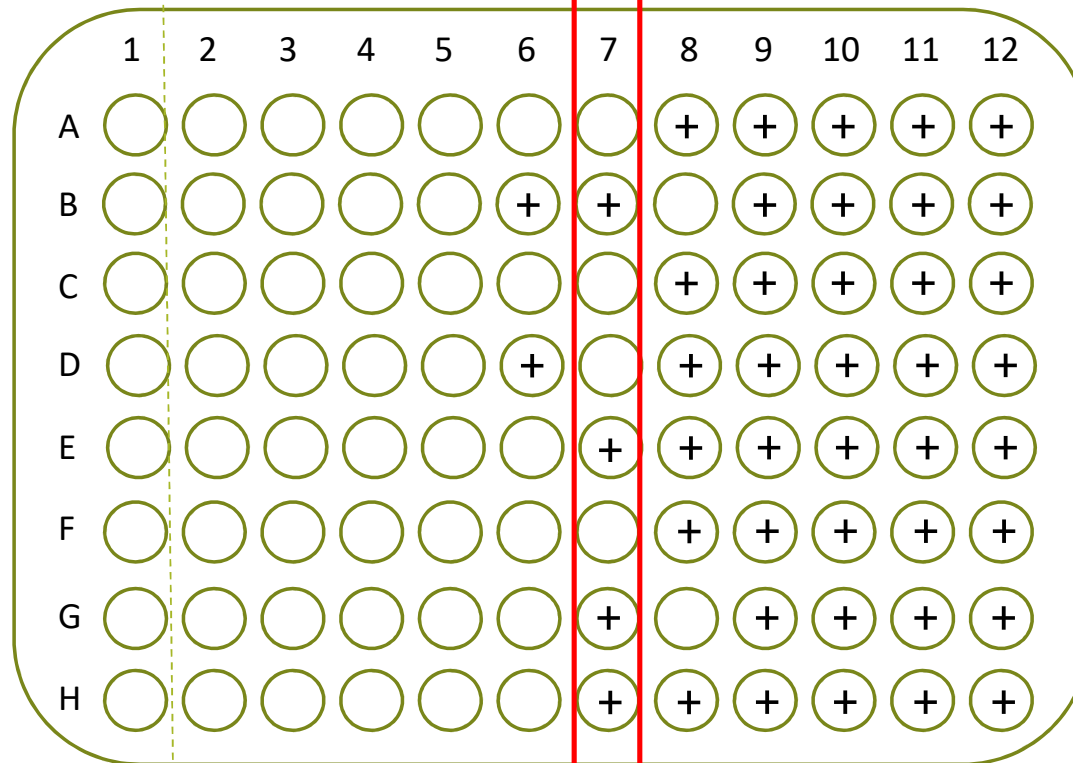
inkubacija 1.5 hr at 37 °C

III st. suspenzija (100 μL)



inkubacija 4 dana pri 37 °C

IV CPE pregled i brojanje



$$ED_{50} = 0.78 \mu\text{L}$$

$$NT = \frac{1000 \mu\text{L} / \text{mL}}{0.78 \mu\text{L}}$$

$$NT = 1280 ED_{50} / \text{mL}$$

$$NT = 3,1 \log ED_{50} / \text{mL}$$

+ CPE

100 75 50 25 0 % neutralizacije

Kvantalni testovi



Rezultati na diskontinuiranoj skali

Rezolucija

korak razrjeđenja

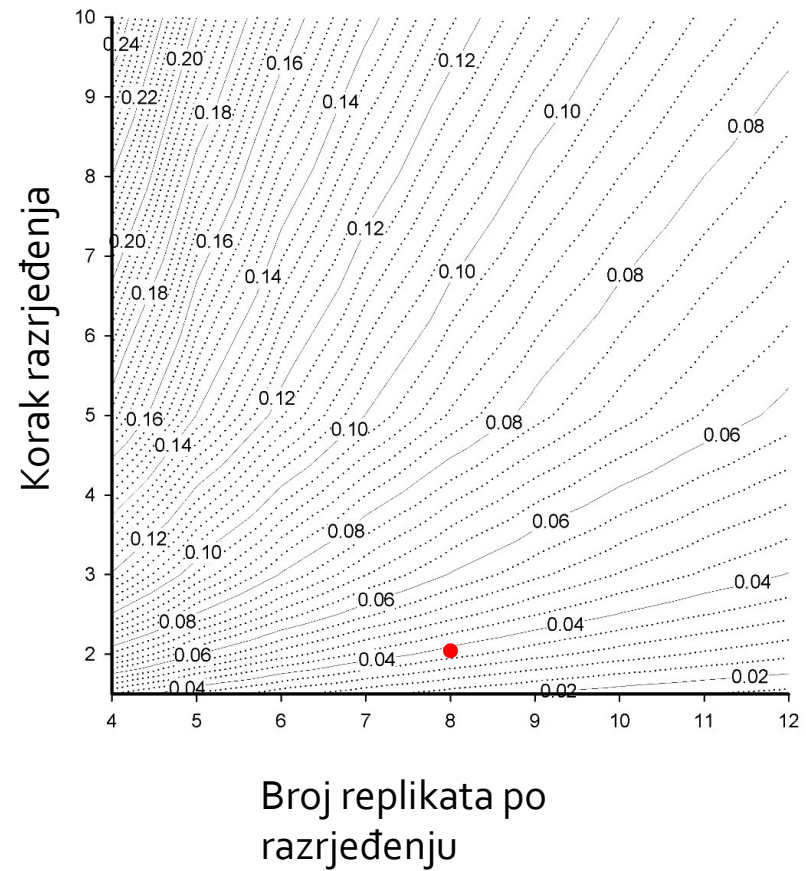
broj ponavljanja u svakom razrjeđenju

Rezolucija:

ED₅₀ 0.040

PRNT 0.301

Klasični kvantitativni test



U svrhu ponovljivog i pouzdanog testa, uspostavili smo

jedinstvenu laboratorijsku radnu banku **Vero E6 stanica** (pohrana u tekućem dušiku)

jedinstvenu laboratorijsku banku **SARS-CoV-2** (pohranjenu na $\leq -60^{\circ}\text{C}$)

jedinstvenu banku **anti-SARS-CoV-2 antitijela** (kućni standard) (pohranjen na $\leq -16^{\circ}\text{C}$)

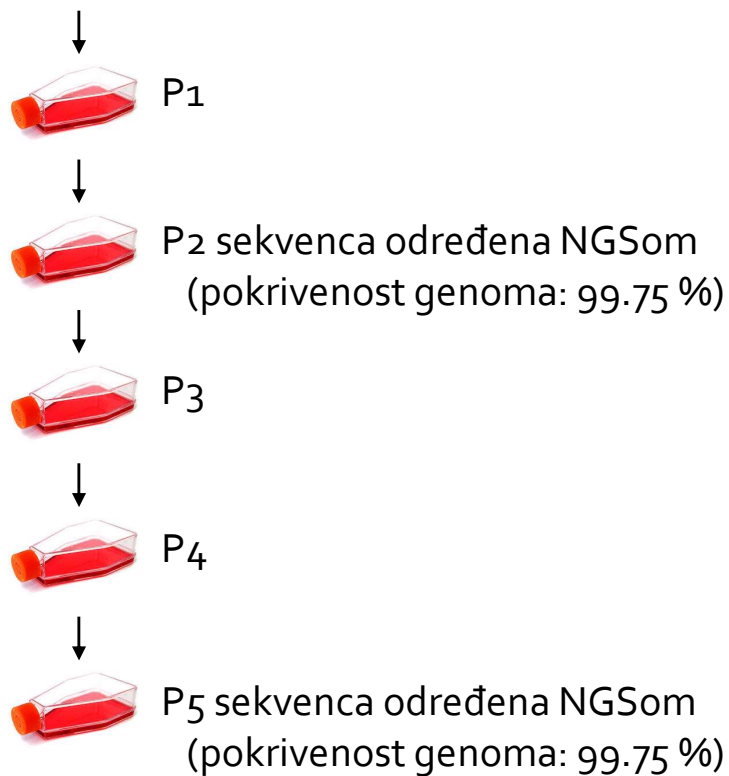
I u svakom testu smo kontrolirali:

titar laboratorijske banke virusa

neutralizacijski titar kućnog standarda anti-SARS-CoV-2 antitijela

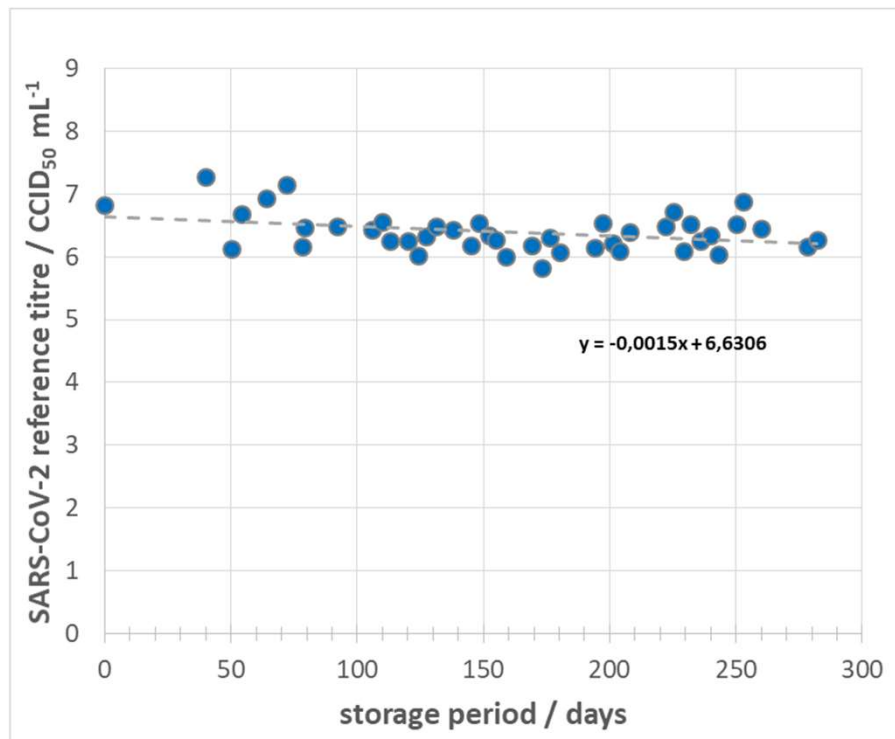
Priprava laboratorijske radne banke SARS-CoV-2 i karakterizacija

Uzorak pacijenta 297/20



Virusna linija: B.1.1.1

Pozicija u genomu (gen)	Nukleotidna promjena (P ₂ →P ₅)	Protein	Aminokiselinska promjena
4 402 (ORF1ab)	C→Y	Nsp3	nema
23 607 (S)	G→R	Spike	Arg682Arg/Gln



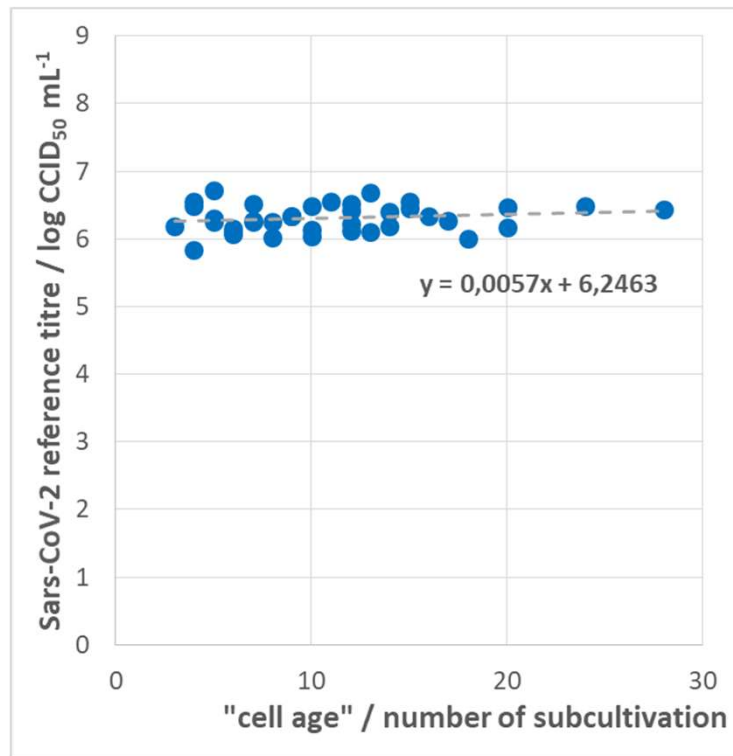
Kontrola titra **Laboratorijske radne banke SARS-CoV-2** Pad titra tokom pohrane

sa 6.83 log CCID₅₀ mL⁻¹ na 6.21 log CCID₅₀ mL⁻¹,

cca 0,61 log CCID₅₀ mL⁻¹ u 9.3 mjeseca pohrane

0,09 log CCID₅₀ mL⁻¹ mjesečno

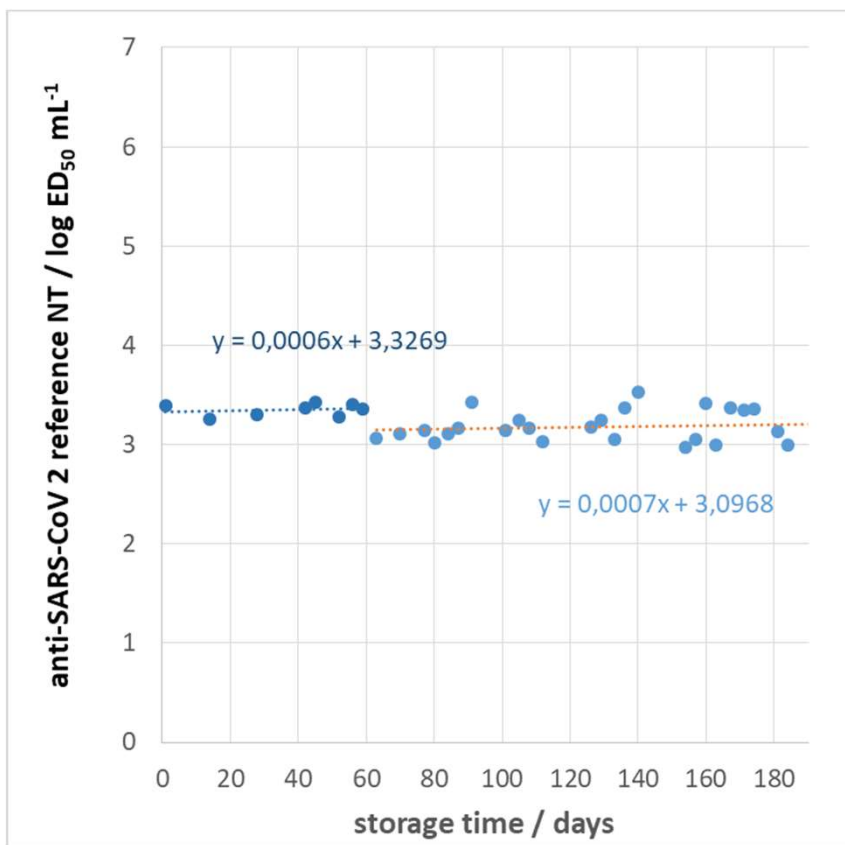
virusni titar nakon naznačenog perioda pohrane na -60 °C ili niže



Kontrola Vero E6 stanica

“Stanična starost”

(3 do 28 subkultivacija nakon odmrzavanja)
ne utječe na rezultate titracije.



Stabilnost anti-SARS-CoV-2 kućnog standarda kroz 6 mjeseci pohrane. Prijelom linije ukazuje na početak uporabe dvostruko veće koncentracije SARS-CoV-2 virusa u testu (dvaput manje razrijeđenog) zbog pada njegovog titra.

Anti-SARS CoV-2 in-house standard

nominal titar $3,50 \pm 0,04 \log \text{ED}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ($n=14$).

Stabilan kroz 6 mjeseci

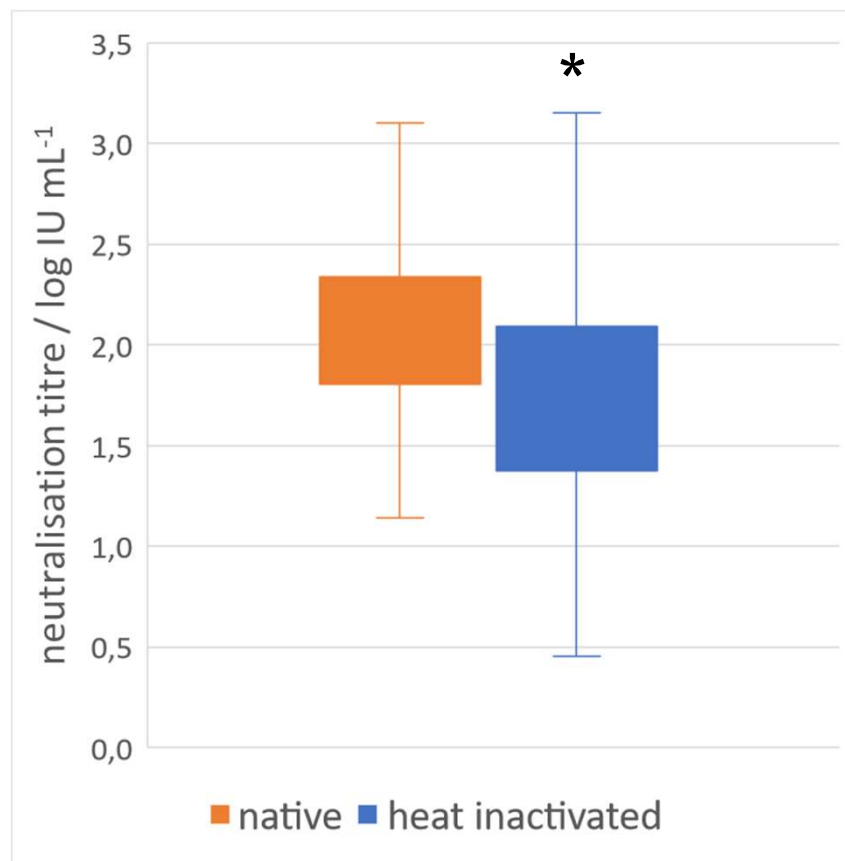
1st WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 (NIBSC, UK) je postao dostupan u proljeće 2021. s nominalnim neutralizirajućim titrom u iznosu od 1000 IU mL^{-1} ($4,32 \pm 0,11 \log \text{ED}_{50} \text{ mL}^{-1}$ ($n=11$) u našem testu)

Kućni standard je kalibracijom prema međunarodnom dobio vrijednosti **152 IU mL^{-1} ($2,18 \log \text{IU mL}^{-1}$)**

To je omogućilo preračun svih do tada prikupljenih rezultata u IU/mL^{-1} , jedinice prvog WHO međunarodnog standarda.

Uloga komplementa u neutralizaciji SARS-CoV-2

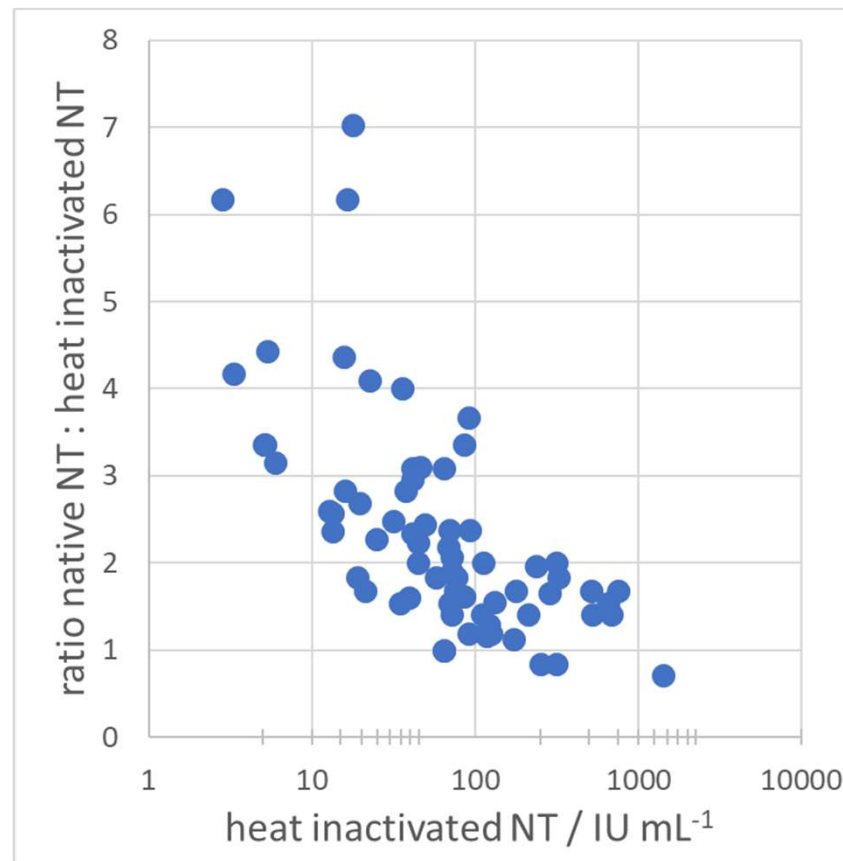
A

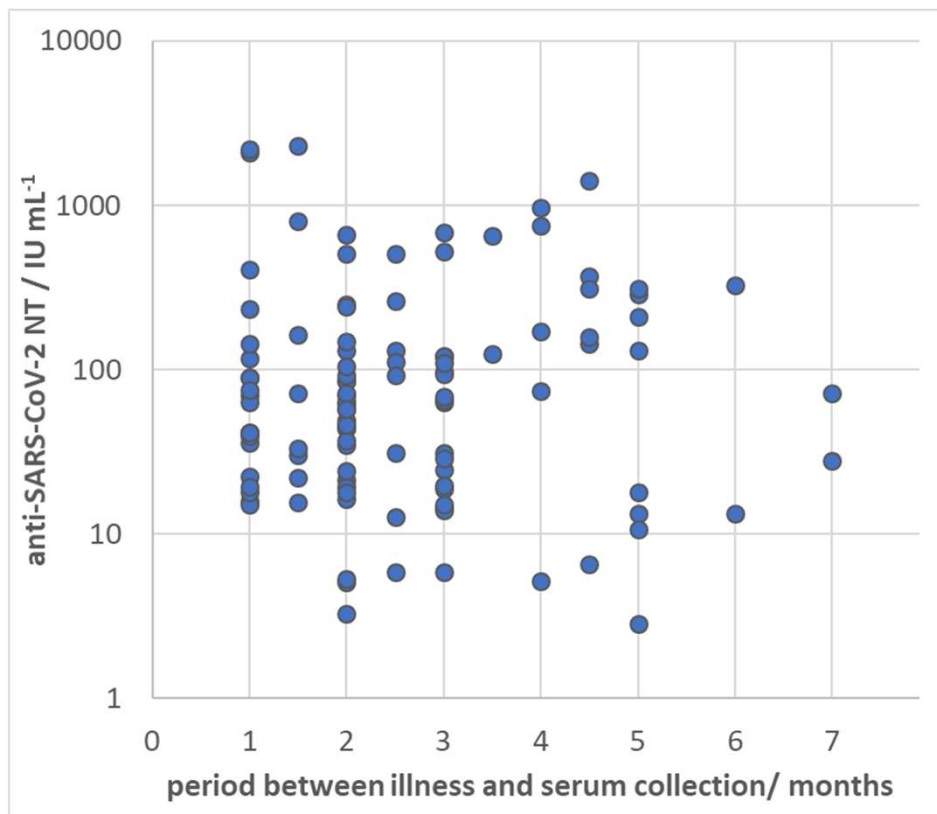


* $p < 0.0001$, $n = 69$.

Native : HI NT 2.37 ± 0.30

B



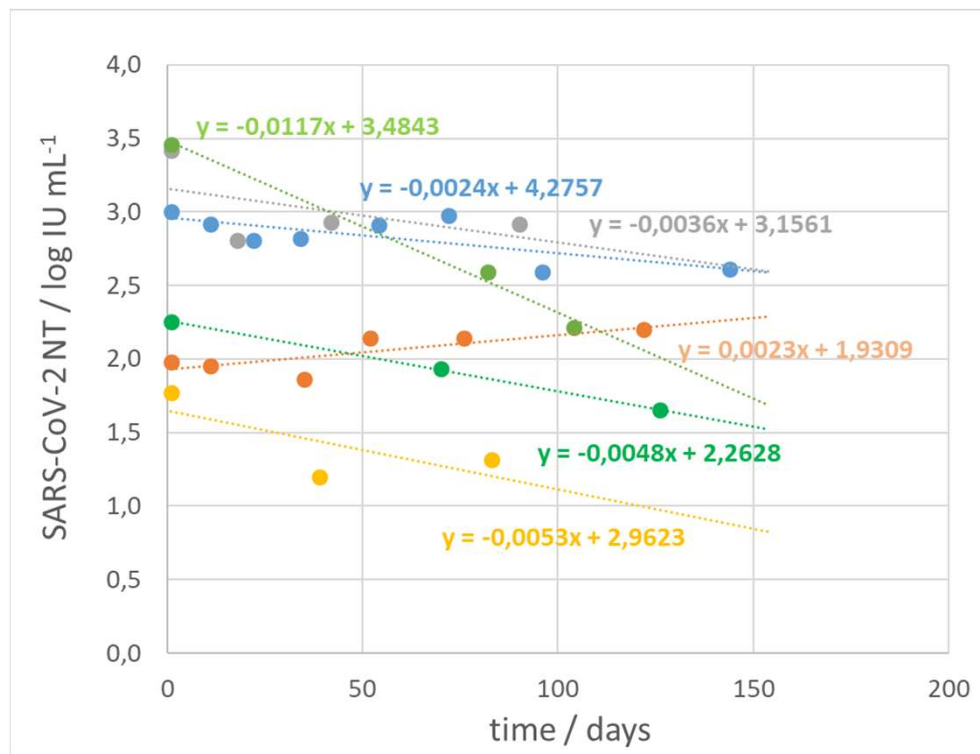


$n=124$

NT raspon = 3 - 2287 IU mL⁻¹ (0.45 to 3.36 log IU mL⁻¹)

median NT = 63 IU mL⁻¹ (1.80 log IU mL⁻¹).

Titar neutralizirajućih anti-SARS-CoV-2 antitijela u serumima rekonvalescenata u odnosu na vremenski razmak između bolesti i prikupljanja seruma



Nagibi pravaca
u rasponu -0.0117 to 0.0023,

Prosječno

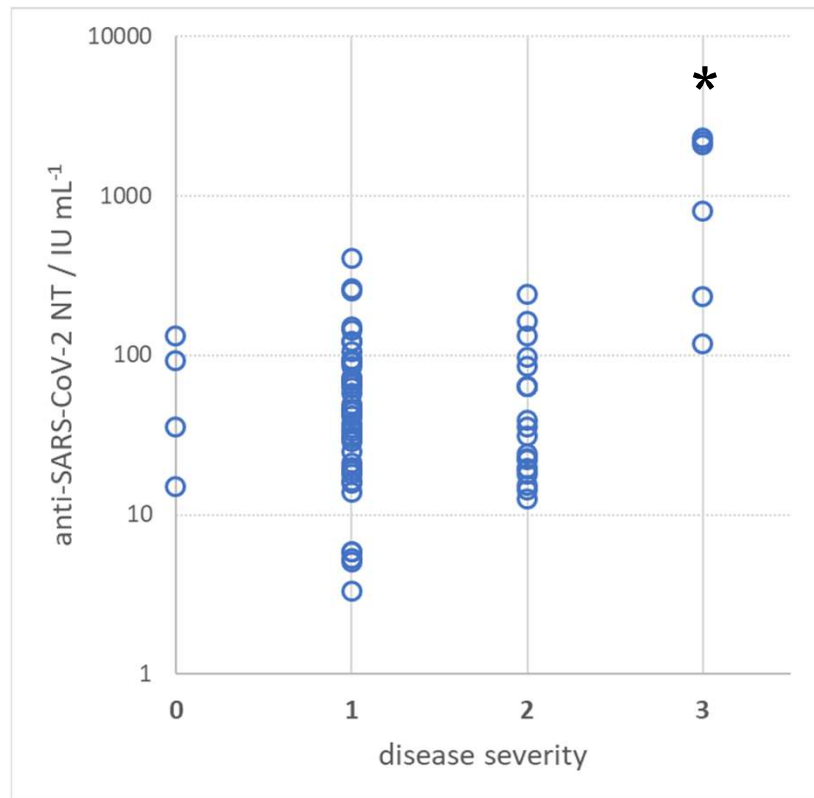
-0,0042 log IU mL⁻¹ / day

ili

1.4x mjesečno

Trajnost neutralizirajućih anti-SARS-CoV-2 antitijela u 6 rekonvalescenata

SARS-CoV-2 NT u serumima rekonvalescentata u odnosu na težinu kliničke slike



* $p < 0.002$ u usporedbi s ostalim grupama.

Kategorije težine COVID-19 kliničke slike

Category	Designation	Symptoms
ASYMPTOMATIC	0	pozitivni PCR test, bez simptoma
MILD	1	kratkotrajna T do 38.5 °C, anosmia, ageusia, curenje iz nosa, kašalj
MODERATE	2	kratkotrajna T to 38.5 °C, uz neki ili sve simptome: glavobolja, mialgia, opća slabost, vrtoglavica i anosmia, ageusia, runny nose, cough
SEVERE	3	dugotrajna T preko 38.5 °C, uz većinu simptoma iz 2, uključujući i pneumoniju in nekim slučajevima; pacijenti su tražili medicinsku pomoć, ali nije bilo potrebe za hospitalizacijom

Test neutralizacije je **zahtjevan** za izvođenje

potreban je BSL3 laboratorij

osoblje obučeno (i voljno!) raditi u BSL3 uvjetima

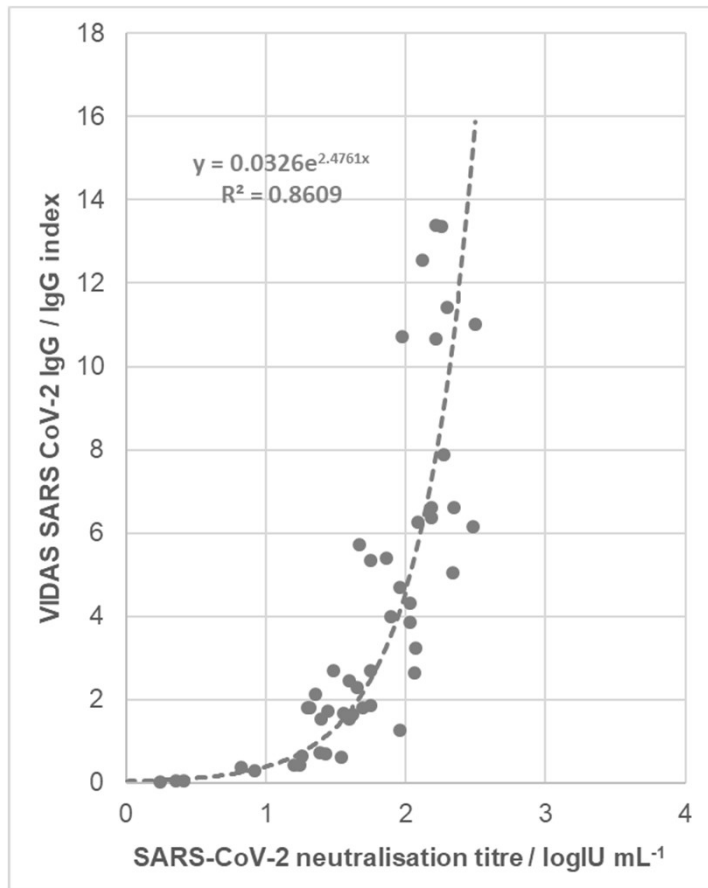
vremenski zahtjevan

nekoliko koraka pipetiranja u 96 bazena, za analizu 1 uzorka

traje 4 dana

analiza svake pločice pod mikroskopom zahtijeva vještinu i vrijeme

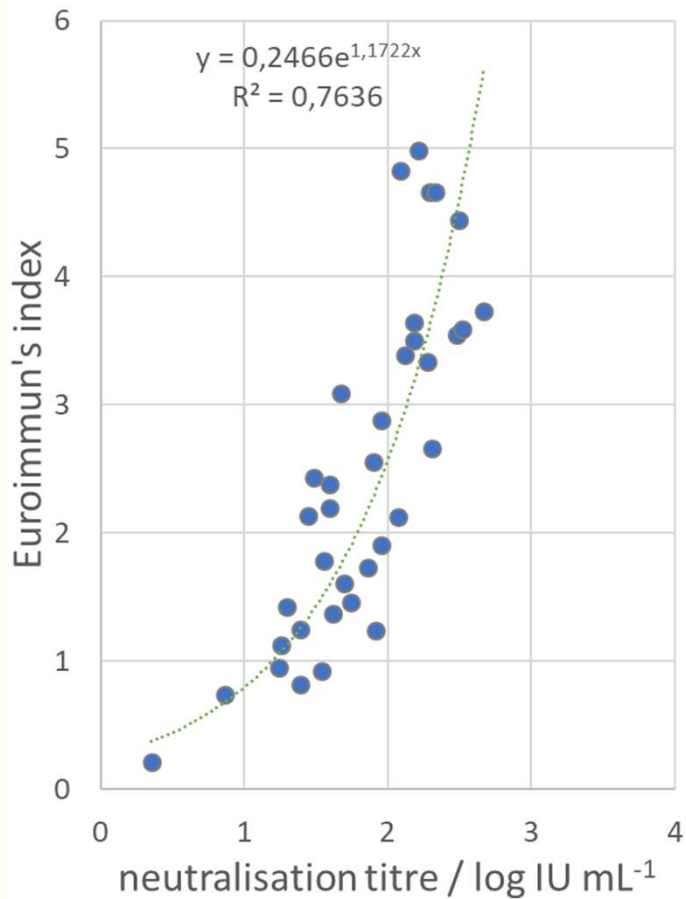
NISKA PROPUSNOST!



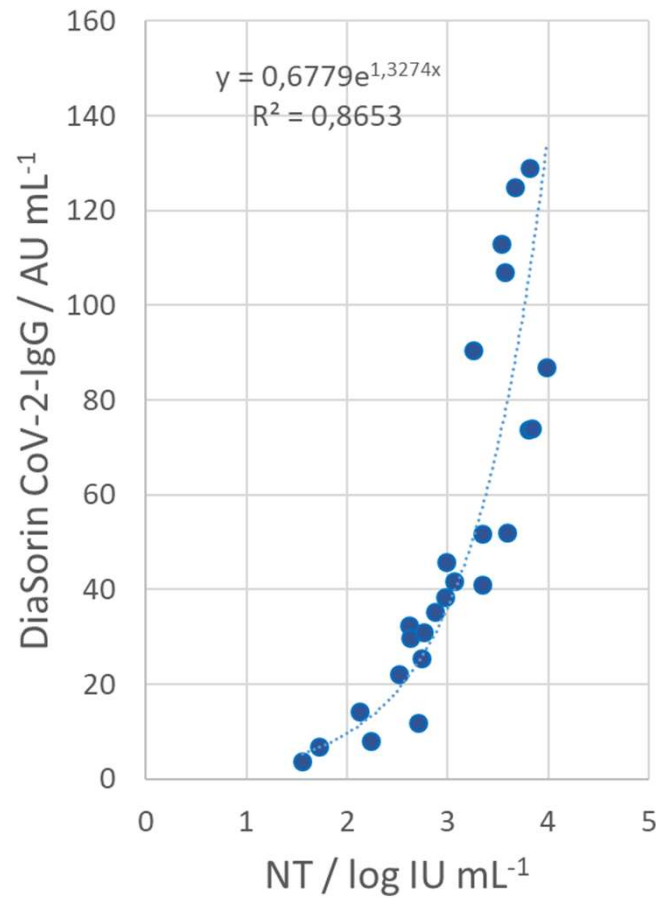
VIDAS SARS CoV₂ IgG (Biomerieux, France) mjeri antitijela specifična za "spike" protein automatizirani Enzyme linked fluorescent assay

Značajna korelacija ($p < 0,0001$)

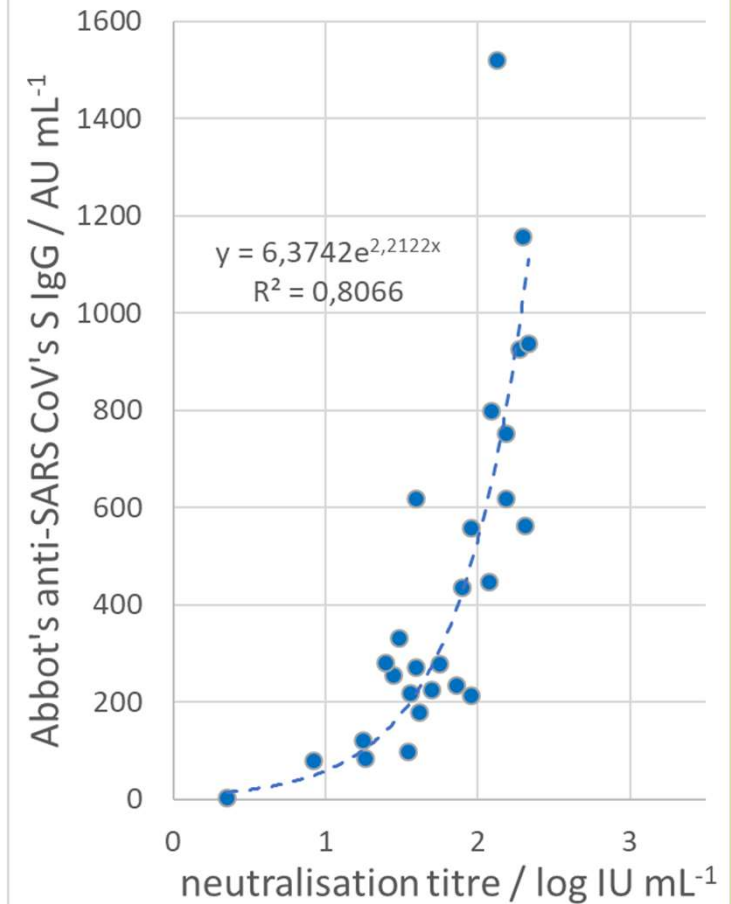
Pearsons's $r = 0.93$ ($n=49$)



Rekombinantna S1 domena
UHID



Rekombinantne S1 + S2 domene, CLIA
Osijek, Rijeka



RBD od S1, CLIA
UHID

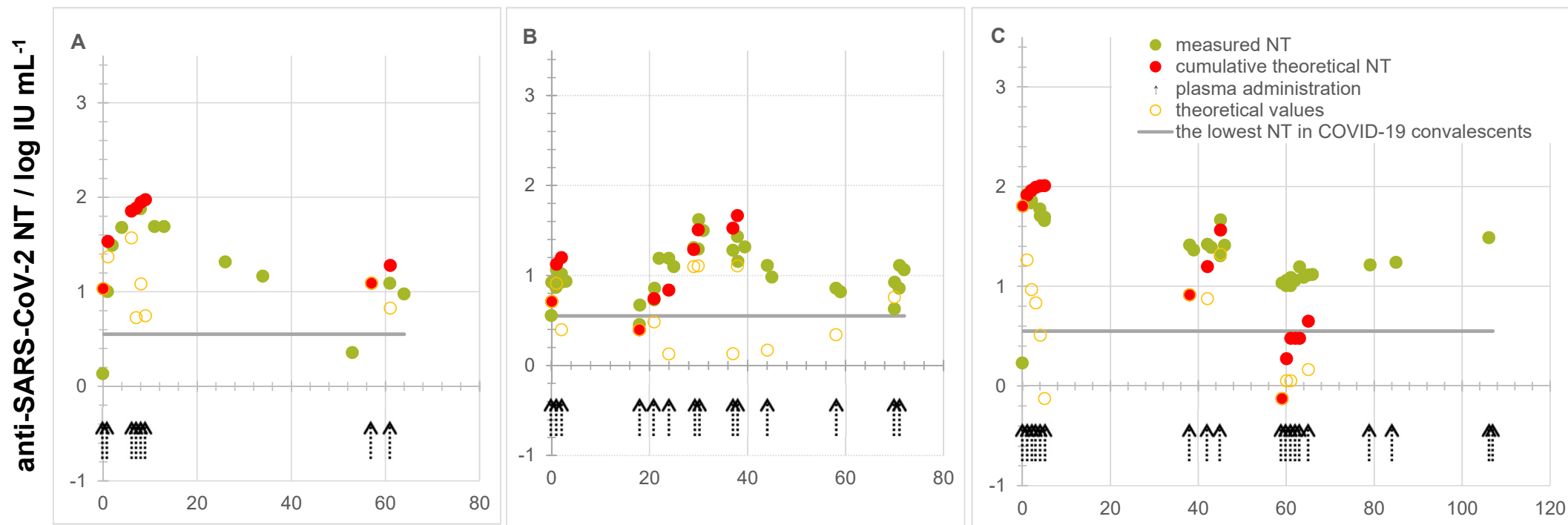
Odluka o graničnoj vrijednosti za primjenu u liječenju COVID-19

najniže vrijednosti NT u serumima COVID-19 rekonvalescenata su iznosile 3 IU mL^{-1}
standardni volumen jedne doze plazme je 200 mL, antitijela će biti 25 - 30 puta razrijeđena
prikupljanje plazme od rekonvalescenata je bilo sporo
plazma se može donirati samo ABO kompatibilnim pacijentima

35 IU mL^{-1} i više – pogodno za transfuziju,

s preporukom da se za liječenje uvijek daje ABO kompatibilna plazma s najvišim titrom u tom trenutku, a ako se radi o plazmi s nižim titrom, da se daje i po nekoliko doza.

Provjera učinkovitosti transfuzijskog postupka plazmama rekonvalescenata primjenjenim sukladno preporukama



Rnjak, Ravlić et al. Transfus Clin Biol 2021; 28:264

Trajanje CCP terapije / dani

Trenutni stav o uporabi CCP za terapiju

Prati et al. Blood Transfus 2021; 19:277

2020-2021 ekstenzivno istraživanje CCP uporabe

7 randomiziranih kliničkih studija je ili dovršeno ili su objavljeni privremeni rezultati

Sve ukazuju da primjena CCP ne pokazuje nikakvu prednost u odnosu na placebo u liječenju imunokompetentnih hospitaliziranih pacijenata.

Trenutno nije moguće usporediti količine uporabljenih antitijela u tim studijama.

Međutim, jako je puno opisano pojedinačnih slučajeva ili nizova slučajeva u kojima je **CCP s uspjehom korištena u liječenju imunokompromitiranih pacijenata**; rezultati kliničkih studija se očekuju

CCP terapija u Hrvatskoj

prikupljanje je započelo u HZTMu u srpnju 2020.

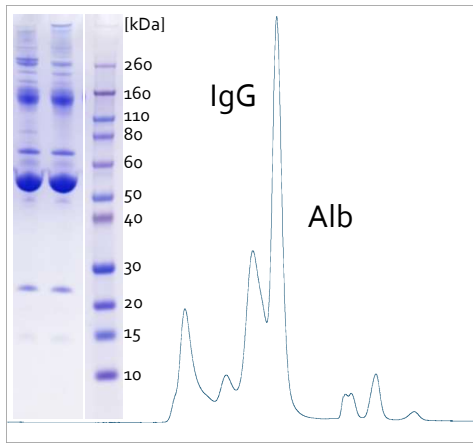
razvoj testa neutralizacije SARS-CoV-2 započeli smo u rujnu 2020.

prva doza primijenjena je za liječenje u prosincu 2020.

99% plazmi korišteno je za liječenje COVID-19 pacijenata s hematološkim malignitetima

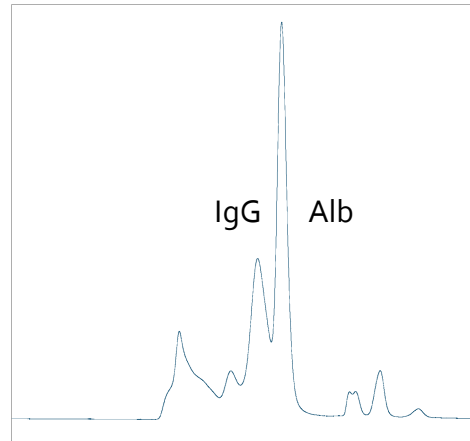
do rujna 2021 je izdano oko 700 doza plazmi i liječeno je oko 130 pacijenata

CCP



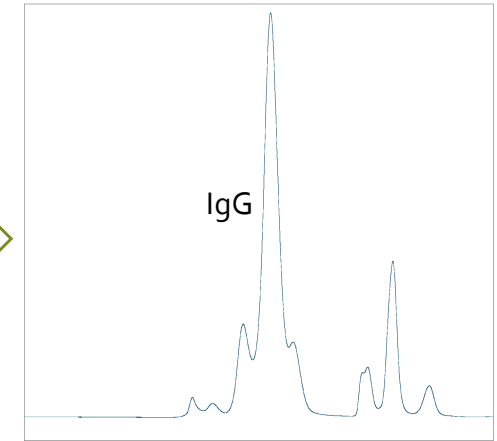
Coagulation
(56 °C / 1 h),
precipitate
removal (3200
× g / 45')

Fibrinogen-depleted CCP



Caprylic acid (5%)
precipitation
(23°C / 1 h),
precipitate
removal (3200 × g
/ 45')

Crude IgG fraction

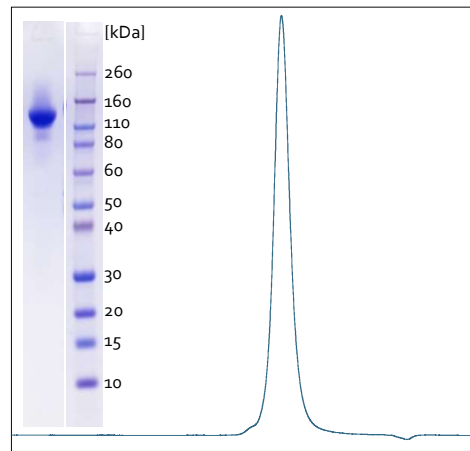


Diafiltration
(MWCO = 100 kDa)

IgG-BASED FINAL PRODUCT'S PROPERTIES

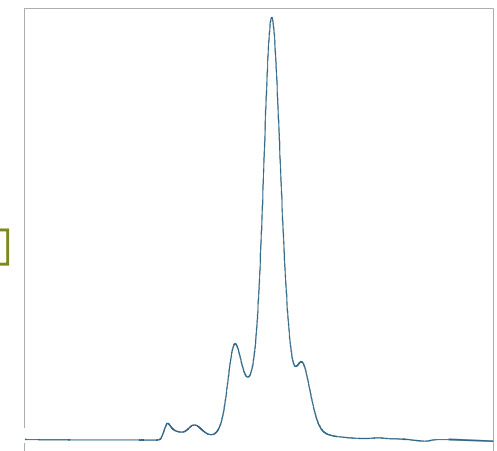
Total IgG recovery [%]	75.3 ± 2.0 (n = 8)
Purity [%]	100 (n = 8)
Aggregate content [%]	0 (n = 8)
Residual IgM [%]	0.3 ± 0.2 (n = 8)
Residual IgA [%]	3.9 ± 2.4 (n = 8)
NT activity recovery	
Protein S-specific IgG recovery [%]	102.3 ± 0.5 (n = 8)

Ultrapure IgG fraction (final product)



Anion-exchange
HPLC in flow-
through mode
at pH = 5.0

Pure IgG fraction



n denotes the number of independently performed processing procedures on CCP from three donors

Zaključci I

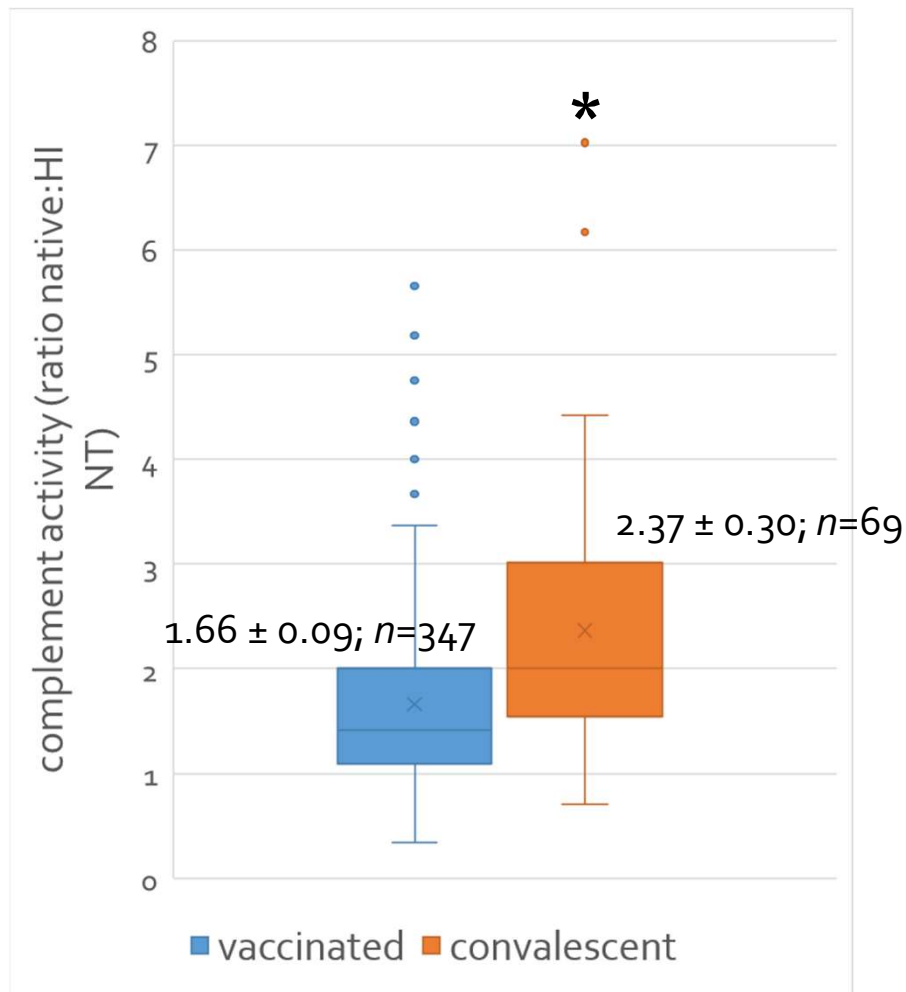
Pouzdan i ponovljiv test neutralizacije SARS-CoV-2, kalibriran prema važećem međunarodnom standardu je uspostavljen u Hrvatskoj.

omogućio je brzi početak CCP terapije u COVID-19 pandemiji u Hrvatskoj

NT u rekonvalescenata korelira s težinom kliničke slike, postojan je i polagano opada

SARS-CoV-2 – specifična antitijela aktiviraju komplement, najvjerojatnije klasičnim putem aktivacije

Neutralizirajuća antitijela nakon cijepljenja



Aktivacija komplementa antitijelima (klasični put) značajno je jača u rekonvalescenata, nego u cijepljenih osoba

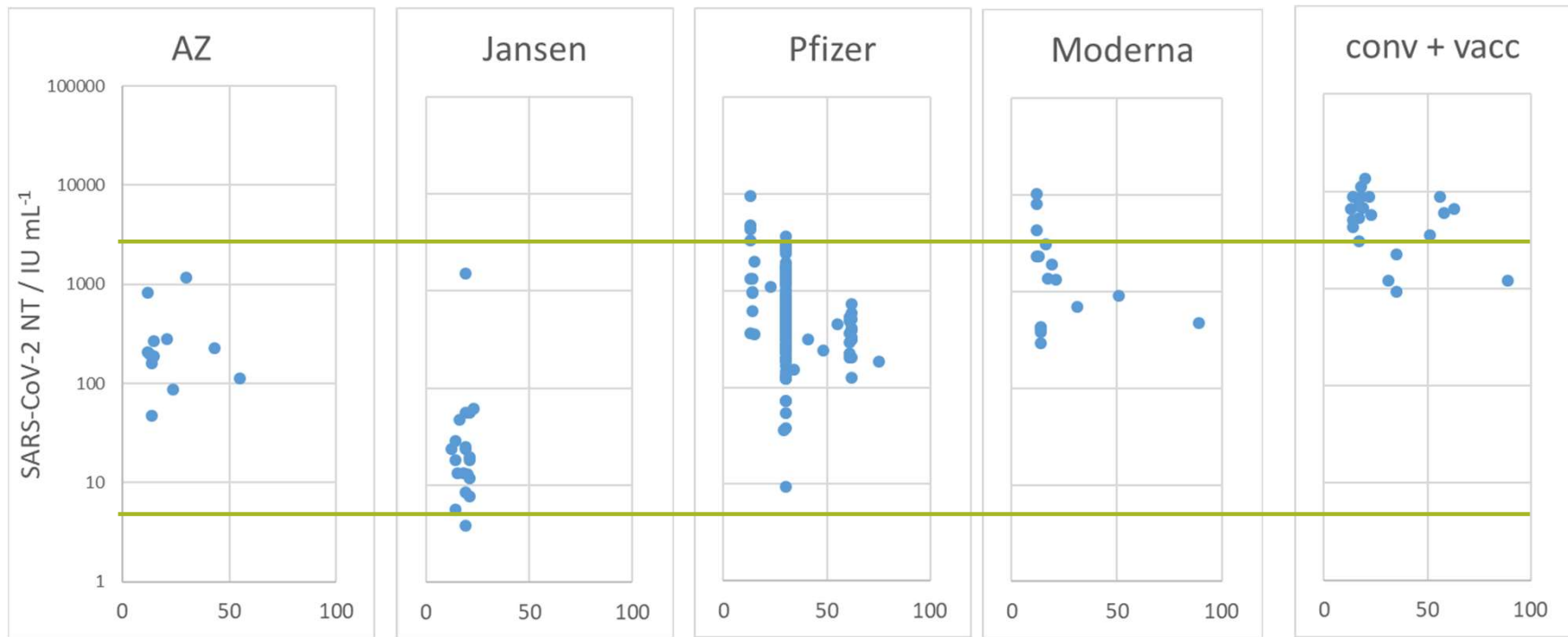
* $p < 0,001$

76%

72%

90%

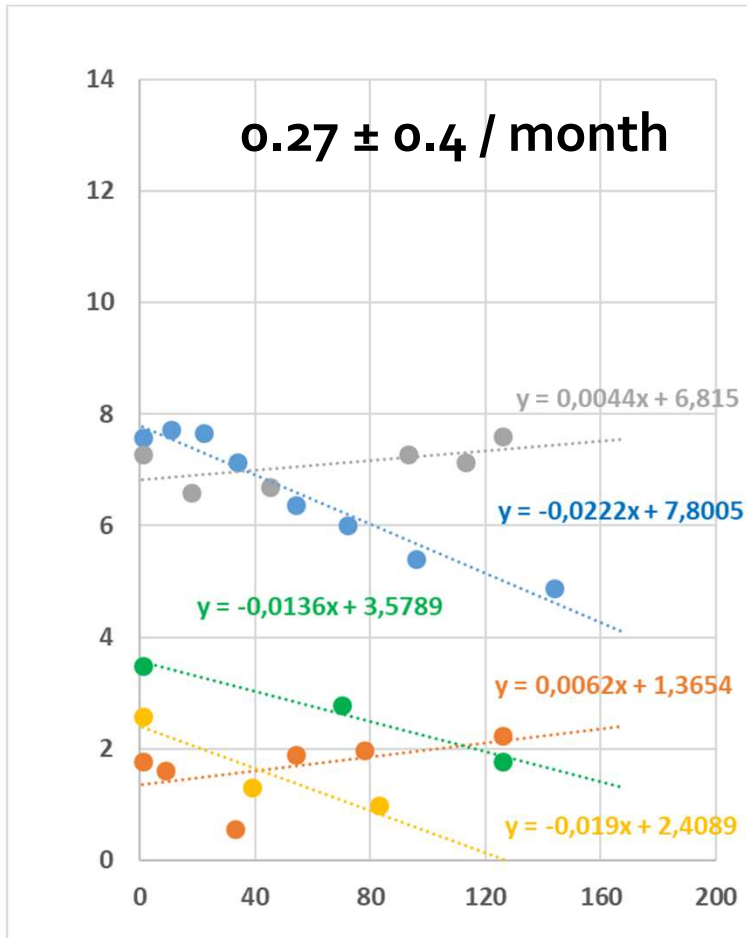
91%



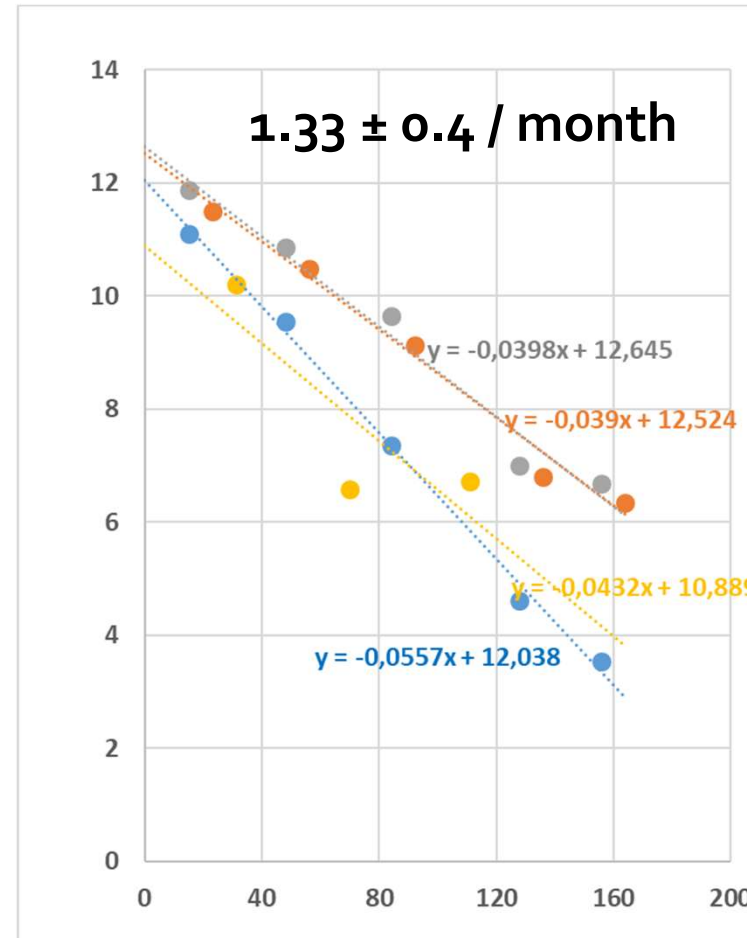
Time after vaccination completion / days

anti-S IgG / Eurimmun's index

convalescents



vaccinees



time after first sampling / days

Zaključci II

Antitijela inducirana cijepljenjem imaju slabiju moć aktivacije komplementa od onih koja nastaju preboljenjem.

Test neutralizacije bi mogao služiti kao indikator kvalitete razvijene imunosti nakon cijepljenja

Odgovor neutralizirajućim antitijelima na cjepiva Moderne, Pfizera, AZ-a i Jansena korelirao je s njihovim opisanim učinkovitostima.

Ovaj test bi mogao biti vrijedno komplementarni alat u procjeni nečijeg imunološkog odgovora nakon bolesti ili nakon cijepljenja, i mogao bi pomoći koga bi i kada trebalo ili ne bi trebalo docjepljivati.

ACKNOWLEDGEMENTS



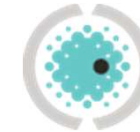
Sveučilište u
Zagrebu
CRKTB



Croatian
Institute for
Transfusion
Medicine



University
Hospital for
Infectious
Diseases



Institute of
Immunology

Sanda Ravlić

Tihana Kurtović

Jelena Ivančić Jelečki

Anamarija Slović

Dubravko Forčić

Adela Štimac

Renata Jug

Tanja Košutić Gulija

Maja Lang Balija

Sanja Mateljak Lukačević

Irena Jukić

Ana Hećimović

Tomislav Vuk

Tatjana Mušlin

Kristina Kujevac Šljivac (Os)

Nataša Lukežić (Ri)

Jela Mratinović Mikulandra (St)

Alemka Markotić

Ivan Christian Kurolt

Oktavija Rode

Željka Mačak Šafranko

Lidija Cvetko Krajinović

Stjepan Mitrović

Marijana Lukša

Marina Mikulek

Dominka Kordić Brđenović

Dina Rnjak (KBC Zagreb)

Ozren Jakšić (KBD)

Ema Sorić (KBD)

Gorana Džepina (KBD)

CROATIAN SCIENCE FOUNDATION PROJECT



IP-CORONA-04-2053

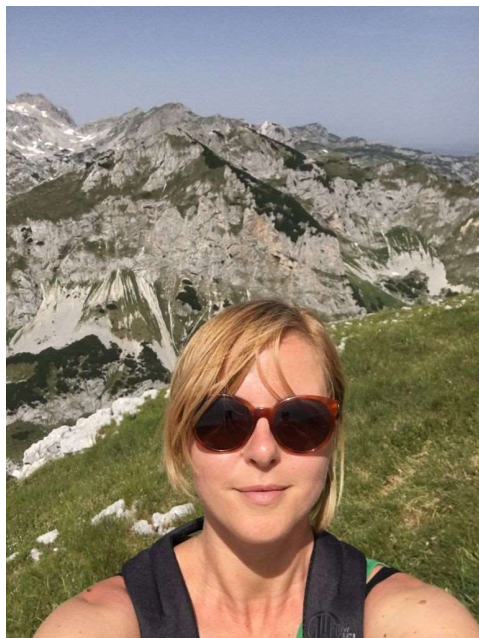
EUROPEAN REGIONAL DEVELOPMENT FUND



grant "Strengthening the capacity of CerVirVac for research in virus immunology and vaccinology", KK.01.1.1.01.0006, awarded to the CERVirVac.

Any opinions, findings and conclusions or recommendations expressed in this material are those of the authors and do not necessarily reflect the views of grant providers

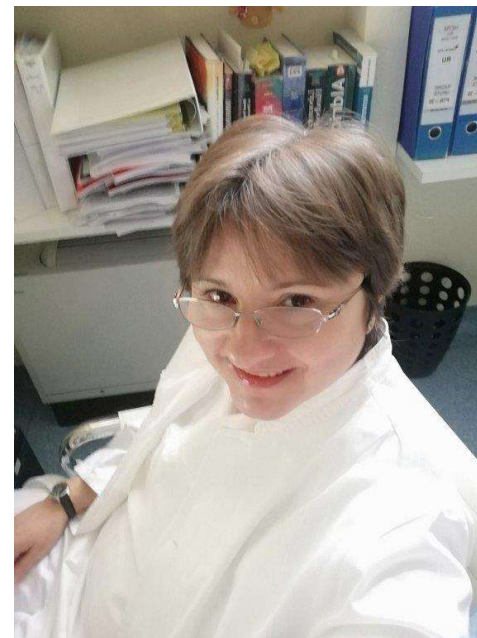




Sanda Ravlić



Tihana Kurtović



Ana Hećimović

**Dobrovoljnim davateljima koji su preboljeli COVID-19 ili se
cijepili protiv COVID-19**

hvala