



FUNKČNÍ VZOREK

**Porfyriny jako nové inaktivační agens pro
inaktivaci obalených virů při přípravě vakcín**

**Luděk Eyer
Jiří Holoubek
Jiří Salát
Petr Bednář
Daniel Růžek
Daniel Renčiuk**

6880
2024

Funkční vzorek

VÚVeL 6758/2024

Porfyriny jako nové inaktivační agens pro inaktivaci obalených virů při přípravě vakcín

doc. RNDr. Luděk Eyer, Ph.D.

Mgr. Jiří Holoubek, Ph.D.

RNDr. Jiří Salát, Ph.D.

Mgr. Petr Bednář

prof. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.

Mgr. Daniel Renčiuk, Ph.D.

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Biofyzikální ústav AV ČR, v.v.i., Brno

2024

ISBN: 978-80-7672-067-5

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu 20-20229S Grantové agentury České republiky a za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0523.

OBSAH

1. Úvod	3
2. Cíl metodiky funkčního vzorku	4
3. Popis funkčního vzorku.....	4
3.1. Použitá metodika.....	4
3.1.1. Viry, buněčné linie, laboratorní zvířata a testované látky.....	4
3.1.2. Inaktivace VKE pomocí porfyrinu NMM	4
3.1.3. Test virulence VKE inaktivovaného porfyrinem NMM v myším modelu.....	4
3.1.4. Ověření, zda jsou myši imunizované inaktivovaným VKE imunní vůči živému (infekčnímu) VKE.....	5
3.1.5. Stanovení protilátek proti VKE u myši imunizovaných inaktivovaným virem	5
3.1.6. ELISA s neutralizujícími lidskými antiséry proti VKE	5
3.1.7. Zvýšení virus-inaktivační aktivity porfyrinů po ozáření excitačním světlem	6
3.2. Výsledky.....	6
3.2.1. Porfyrin NMM kompletně inaktivuje VKE a činí jej neinfekční pro laboratorní myši.....	6
3.2.2. Myši imunizované inaktivovaným VKE jsou imunní vůči živému (infekčnímu) VKE a tvoří VKE-neutralizující protilátky	6
3.2.3. VKE inaktivovaný pomocí NMM interaguje s VKE-neutralizujícím lidským antisérem	7
3.2.4. Virus-inaktivační efekt některých porfyrinů může být dále zesílen ozářením excitačním světlem	8
3.2.3. Výsledky - shrnutí	8
4. Srovnání novosti postupů.....	9
5. Uplatnění funkčního vzorku	9
6. Ekonomické aspekty	9
7. Použitá literatura	9

1. Úvod

Obalené viry jsou patogeny s velkým medicínským významem, které způsobují závažné a často život ohrožující infekce u lidí. Zástupci čeledi *Flaviviridae* jsou v současné době intenzivně zkoumány jako původci infekčních onemocnění s celosvětovým výskytem (Růžek et al., 2019).

Virus klíšťové encefalitidy (VKE) je medicínsky významným flavivirem, přenášeným klíšťaty *Ixodes ricinus* a *Ixodes persulcatus*. Geografické rozšíření VKE zahrnuje eurasijskou oblast s každoroční incidencí přesahující 12 000 klinických případů (Růžek et al., 2019). Klíšťová encefalitida byla v poslední době potvrzena i v dříve nepostižených oblastech v důsledku klimatických změn a šíření infikovaných klíšťat do vyšších nadmořských výšek a regionů, kde se klíšťata původně nevyskytovala.

Závažnost symptomů klíšťové encefalitidy kolísá od relativně mírných příznaků podobných chřipce až po závažnou encefalitidu, meningoencefalitidu nebo encefalomyelitidu. Ačkoli úmrtnost na klíšťovou encefalitidu v Evropě je nižší než 2 %, pacienti po prodělaném onemocnění mohou trpět celoživotními následky, které významně zhoršují kvalitu života (Růžek et al., 2019). V Evropě (mimo Rusko) jsou v současné době dostupné dvě účinné vakcíny pro prevenci tohoto onemocnění; specifická terapie klíšťové encefalitidy není dosud k dispozici (Eyer et al., 2018; Eyer et al., 2023).

Porfyriny jsou přirozeně se vyskytující heterocyklické makrocyclické sloučeniny složené z planárního tetrapyrolového kruhu, který může koordinovat kationt kovu (v takovém případě se nazývají metaloporfyriny) (obr. 1) (Senge et al., 2021). V živých systémech se porfyriny a příbuzné sloučeniny podílejí na fotosyntéze a přeměně energie světla na chemickou energii, dále na aerobním metabolismu a metabolických drahách spojených s přenosem elektronů a na respiračních procesech a transportu kyslíku (Romero a Möbius, 2002).

V poslední době bylo vyvinuto velké množství syntetických derivátů porfyrinů s jedinečnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi, které mají široký potenciál uplatnění v oblastech sahajících od materiálové chemie až po biomedicínské vědy (Romero a Möbius, 2002). Související lékařský výzkum se zaměřil především na fotosenzitizační aktivitu porfyrinů a jejich využití při fotodynamické terapii různých typů rakoviny (Batlle, 1993). Aktivace porfyrinů světelným stimulem byla také popsána v souvislosti s antimikrobiální terapií (Amos-Tautua et al., 2019; Neris et al., 2018). Mechanismus tohoto účinku závisí především na produkci reaktivních forem kyslíku (ROS), které mají přímou mikrobicidní aktivitu (Heffron et al., 2021).

U virů vede tento mechanismus k narušení celých virových částic (Guo et al., 2011), degradaci a cross-linkování virových povrchových proteinů (Neris et al., 2018), (per)oxidaci virových lipidových obalů a narušení reologie virových membrán (Lu et al., 2021). Někteří autoři navíc popsali antivirové účinky porfyrinů nezávislé na fotosenzitizaci (Neris et al., 2018; Assunção-Miranda et al., 2016) a jejich interakci s virovými nukleovými kyselinami (Heffron et al., 2021), zejména guaninovými kvadruplexy (G4) (Holoubek et al., 2022; Artusi et al., 2021). Antivirové aktivity velkého množství strukturálně rozmanitých porfyrinů proti mnoha virovým patogenům byly popsány různými autory (Neris et al., 2018; Assunção-Miranda et al., 2016; Holoubek et al., 2024), což činí tyto zajímavé sloučeniny vhodnými kandidáty pro vývoj širokospektrých antivirotik.

Navíc, virucidní aktivita porfyrinů spojená s poškozením virových částic a úplnou ztrátou jejich infekčnosti při zachování imunogenicity takto ošetřených virionů vede k možnosti využít porfyriny a příbuzné sloučeniny jako vysoce účinné virus-inaktivační agens pro přípravu nových typů inaktivovaných celovirionových vakcín.

2. Cíl metodiky funkčního vzorku

Cílem funkčního vzorku je zavedení metody inaktivace obalených virů pomocí porfyrinů pro přípravu inaktivovaných celovirionových vakcín. Dalším cílem je ověření, že virus inaktivovaný pomocí porfyrinů je (1) kompletně neinfekční pro laboratorní myš a (2) schopný vyvolat tvorbu virus-neutralizačních protilátek v laboratorní myši.

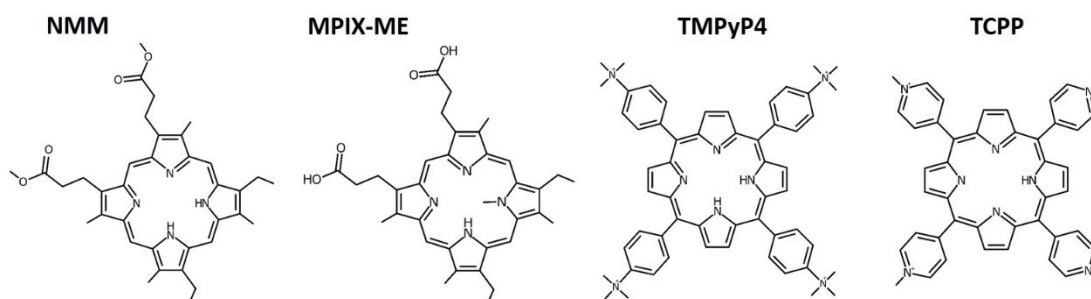
3. Popis funkčního vzorku

3.1. Použitá metodika

3.1.1. Viry, buněčné linie, laboratorní zvířata a testované látky

Pro studii vedoucí k tomuto funkčnímu vzorku by využit virus klíšťové encefalitidy (VKE, kmen Hypr, čeleď *Flaviviridae* získaný ze Sbírký arbovirů (Parazitologický ústav, Biologické centrum AVČR, České Budějovice, <http://www.arboviruscollection.cz/index.php?lang=en>). VKE byl použit jako modelový zástupce obalených virů. Pomnožení viru a plakové titrace byly provedeny na immortalizované buněčné linii PS (stabilní linie odvozená z prasečího ledvinového epitelu). Pro *in vivo* studie byly použity laboratorní myši kmene Balb/c získané od společnosti AnLab, Praha.

Většina experimentů byla provedena s modelovou sloučeninou *N*-methyl-mesoporphyrin IX (NMM), což je zástupce β -alkyl-substituovaných porfyrinů. Pro některé další *in vitro* studie byl použit strukturně blízký derivát mesoporphyrin IX methyl ester (MPIX-ME) a dále dva zástupci *meso*-(het)aryl-substituovaných porfyrinů, jako jsou 5,10,15,20-tetrakis(1-methyl-4-pyridyl)-porfyrin (TMPyP4) a 5,10,15,20-tetrakis(4-carboxyphenyl)porfyrin (TCPP). Jejich struktury jsou zřejmé z obr. 1.



Obrázek 1. Struktury porfyrinů používaných v tomto funkčním vzorku.

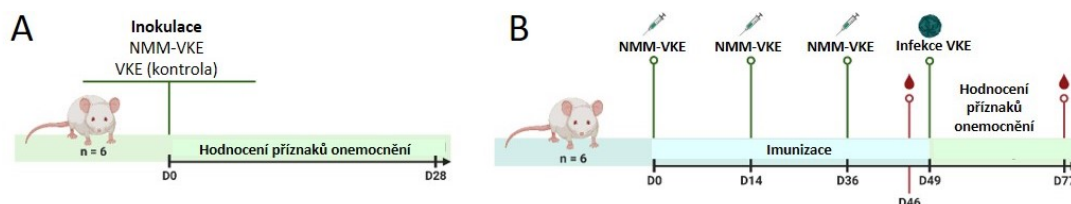
3.1.2. Inaktivace VKE pomocí porfyrinu NMM

Zásobní inokulum VKE (kmen Hypr, titr 10^5 PFU/mL) bylo smícháno s porfyrinem NMM tak, aby bylo dosaženo výsledné koncentrace 25 μ M. Směs byla inkubována po dobu 120 minut při 37 °C. Jako kontrola byl použit VKE ošetřený 0,5 % (v/v) DMSO v PBS inkubovaný za stejných podmínek.

3.1.3. Test virulence VKE inaktivovaného porfyrinem NMM v myším modelu

Tři skupiny myši kmene Balb/c ($n = 6$, samice, stáří 6–8 týdnů) byly subkutánně (s.c.) infikovány: (1) VKE předem ošetřeným NMM a (2) kontrolním VKE ošetřeným 0,5 % (v/v) DMSO (viz bod 3.1.2.) v infekční dávce 1000 PFU/myš, vše v objemu 200 μ L. Klinické skóre a přežití infikovaných myši byly denně monitorovány po dobu 28 dnů během celého experimentu. Příznaky onemocnění byly hodnoceny následovně: (0) žádné příznaky, (1) naježená srst, (2) snížená aktivita nebo shrbený postoj,

(3) slabost nebo mírná paralýza, (4) letargie, třes nebo úplná paralýza končetin, (5) úhyn. Všechny myši, u nichž byly zjištěny příznaky odpovídající klinickému skóre 4, byly humánně utraceny (cervikální dislokace) ihned po zjištění. Schéma experimentu je znázorněno na obr. 2A.



Obrázek 2. Schémata *in vivo* experimentů. (A) Test virulence VKE inaktivovaného porfyrinem NMM v myším modelu. VKE ošetřený porfyrinem NMM a kontrolní VKE (ošetřený PBS) byl injikován myším kmene BALB/c, klinická skóre a mortalita byly monitorovány až do 28. dne po infekci. (B) Ověření ochranného účinku VKE inaktivovaného porfyrinem NMM u myši. VKE inaktivovaný porfyrinem NMM byl použit k imunizaci myši kmene BALB/c. Myši byly následně vystaveny letální infekční dávce VKE, přičemž bylo sledováno klinické skóre a mortalita. Ve stanovených dnech byly odebrány vzorky krve a stanovováno množství protilátek proti VKE (symboly červených kapek) (upraveno dle Holoubek et al., 2024).

3.1.4. Ověření, zda jsou myši imunizované inaktivovaným VKE imunní vůči živému (infekčnímu) VKE

Dále bylo nutno ověřit, zda VKE inaktivovaný porfyrinem NMM ochrání laboratorní myši před infekcí živým (infekčním) virem a zabráni tak u myši rozvoji onemocnění. Pro tento experiment byla jedna skupina myši ($n = 6$) subkutánně (s.c.) injikována (tj. imunizována) VKE ošetřeným porfyrinem NMM (10^5 PFU/myš, 200 μ L). Druhé (kontrolní) skupině myši ($n = 6$) byl injikován pouze PBS (200 μ L). Následně byly dvě posilující (booster) injekce podány 14 a 36 dní po první aplikaci. V den 49 byl myším inokulován živý (infekční) VKE (infekční dávka 10^3 PFU/myš). Klinické příznaky (viz výše) byly sledovány denně během následujících 28 dní.

Všechny myši vykazující příznaky odpovídající klinickému skóre 4 byly humánně utraceny (cervikální dislokací) ihned po zjištění. Krevní vzorky byly odebrány od všech experimentálních zvířat ve dnech 46 (vzorky krve I a II, viz obr. 5A) a 77 (vzorky III a IV, viz obr. 5A) pro monitorování protilátek specifických proti VKE pomocí ELISA a virus-neutralizačního testu. Schématické znázornění experimentu je uvedeno na obr. 2B.

3.1.5. Stanovení protilátek proti VKE u myši imunizovaných inaktivovaným virem

Koncentrace specifických protilátek proti VKE (vyjádřená v jednotkách VIEU/mL) byla měřena v séru myši pomocí testu ELISA za použití komerční diagnostické sady IMMUNOZYME FSME (TBE) IgG All Species Kit (PROGEN Biotechnik GmbH, Heidelberg, Německo) v souladu s pokyny výrobce. Neutralizační protilátky proti TBEV byly detekovány v séru myši pomocí virus-neutralizačního testu (Salát et al., 2022).

3.1.6. ELISA s neutralizujícími lidskými antiséry proti VKE

Dále jsme ověřovali, zda séra myši, které byly imunizovány NMM-inaktivovaným VKE, interagují s VKE-neutralizujícími lidskými antiséry. Celkem 50 μ L zásobní suspenze VKE (titr 10^8 PFU/ml, pomnožený v podmínkách bezsérového média), naředěného v uhličitanovém vazném pufru (pH 9,6), bylo přidáno do každé jamky destiček Maxisorp (NUNC, Dánsko) a inkubováno při 4 °C přes noc. Byly použity tři vzorky viru pro potahování destiček: (1) virus inaktivovaný porfyrinem NMM (25 μ M, inaktivace 60 min), (2) virus inaktivovaný β -propiolaktonem (0,1 % (v/v), inaktivace 60 min) a (3) autentický (neinaktivovaný) virus. Poté byl odstraněn uhličitanový vazný pufr, destička byla fixována studeným acetonem-metanolem (1:1) a blokována 10 % fetálním bovinním sérem. Destička byla třikrát promyta pomocí PBS s 0,1 % (v/v) Tween-20 (promývací pufr) a do jamky potažené virem bylo přidáno 100 μ L VKE-neutralizujícího lidského séra (naředěného 1:1000). Jako kontrola bylo použito naivní lidské sérum

(neobsahující protilátky proti VKE) (naředěné 1:1000). Destička byla inkubována po dobu 60 minut při pokojové teplotě (RT) a třikrát promyta. Poté bylo do jamky přidáno 100 μ L detekčního konjugátu (protein G-křenová peroxidáza) v PBS-Tween-20. Po 1 hodině inkubace při RT a následném promytí byl přidán 100 μ L substrátového roztoku TMB a H_2O_2 (poznámka: v našem ELISA systému jsme použili detekční konjugát a substrátový roztok z komerční sady Immunozyg FSME IgG All Species (Progen, Německo); reagentie byly naředěny dle pokynů výrobce). Kolorimetrická reakce byla zastavena po 15 minutách přidáním 50 μ L H_2SO_4 (2 mol/L). Absorbance byla měřena při 450 nm.

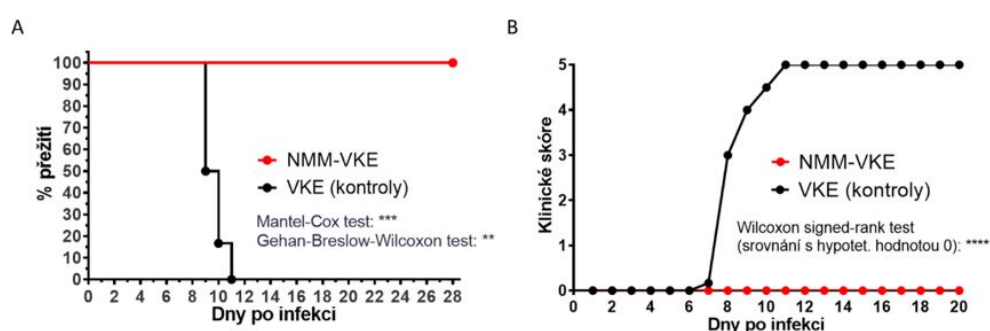
3.1.7. Zvýšení virus-inaktivační aktivity porfyrinů po ozáření excitačním světlem

Virus v médiu L-15 (titer 10^5 PFU/mL) byl smíchán s vybranými porfyriny (v koncentračním rozmezí 0–50 μ M) v samostatné mikrotitrační destičce v triplicátu a ozářen po dobu 10 minut při RT pomocí LED (405 ± 20 nm) s přibližným výkonem 30 mW/cm². Virus inkubovaný s porfyriny ve tmě po dobu 10 minut sloužil jako negativní kontrola. Následně byly oba vzorky viru (ozářený a neozářený) inkubovány po dobu 60 minut při 37 °C ve tmě. Titry viru byly stanoveny pomocí plakové titrace a vyjádřeny jako PFU/mL. Tento test byl tedy proveden pouze *in vitro*.

3.2. Výsledky

3.2.1. Porfyrin NMM kompletně inaktivuje VKE a činí jej neinfekční pro laboratorní myši

Pro veškeré *in vivo* studie jsme použili modelový zástupce β -alkyl-substituovaných porfyrinů NMM. Myši BALB/c, které byly subkutánně (s.c.) inokulovány letální dávkou VKE (10^3 PFU/myš, obr. 2A), vykazovaly charakteristické klinické příznaky infekce, jako jsou naježená srst, shrbený postoj, třes, a paralýza končetin během 8 až 10 dnů po infekci, přičemž většina myší musela být usmrcena. Mortalita byla 100 % s průměrnou délkou přežití $9,7 \pm 0,8$ dní po infekci (obr. 3, černé křivky). Avšak u myší inokulovaných VKE (10^3 PFU/myš) inaktivovaným porfyrinem NMM (25 μ M) nebyly pozorovány žádné příznaky infekce, což ukazuje, že NMM plně inaktivoval VKE (obr. 3, červené křivky).

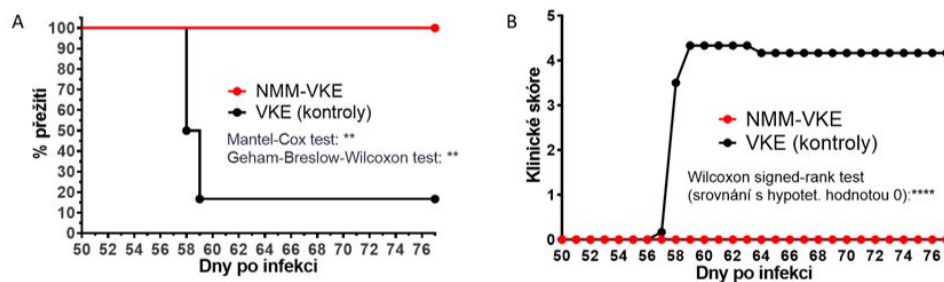


Obrázek 3. Hodnocení míry přežití (A) a klinického skóre (B) u myší (n=6) inokulovaných VKE (infekční dávka 10^3 PFU/myš) inaktivovaným porfyrinem NMM (25 μ M, červené křivky) a kontrolním VKE (infekční dávka 10^3 PFU/myš) (černé křivky). **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$ (upraveno dle Holoubek et al., 2024).

3.2.2. Myši imunizované inaktivovaným VKE jsou imunní vůči živému (infekčnímu) VKE a tvoří VKE-neutralizující protilátky

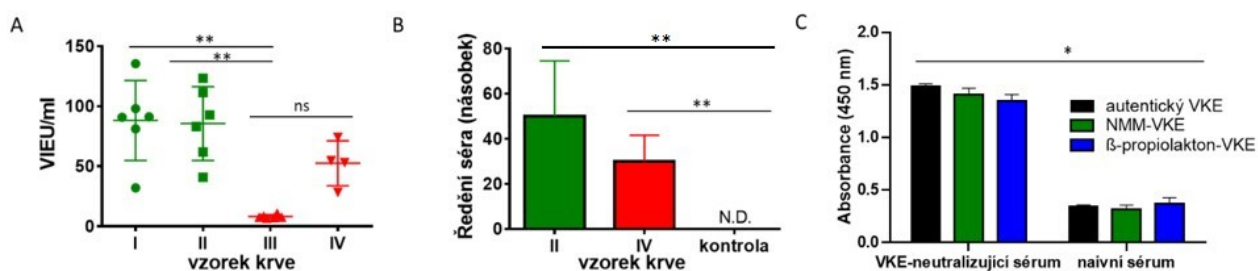
V dalším experimentu byly myši BALB/c inokulovány VKE (10^5 PFU/myš) inaktivovaným pomocí NMM (25 μ M), po té následovaly dvě posilující (booster) injekce. Kontrolní zvířata byla inokulována PBS. Následně byly obě skupiny myší inokulovány infekčním VKE (10^3 PFU/myš) (obr. 2B). Zatímco kontrolní myši vykazovaly typické příznaky infekce VKE, úmrtnost byla 83 % a průměrná délka přežití $10 \pm 0,6$ dnů po infekci (obr. 4, černé křivky), zvířata imunizovaná NMM-inaktivovaným virem neprojevovala žádné

klinické příznaky neuroinfekce a po vystavení letální dávce infekčního VKE vykazovala 0% mortalitu (obr. 4, červené křivky).



Obrázek 4. Dvě skupiny myši (n=6) byly imunizovány VKE, který byl inaktivován porfyrinem NMM (červené křivky). Kontrolním myším byl injikován PBS (černé křivky). Obě skupiny myši byly následně inokulovány letální dávkou infekčního VKE a bylo hodnoceno procento přežití (A) a klinické skóre (B). **, P<0.01; ****, P<0.0001 (upraveno dle Holoubek et al., 2024).

Jak bylo dále očekáváno, v sérech odebraných od myši imunizovaných NMM-inaktivovaným virem byly detekovány neutralizující protilátky proti VKE (obr. 5A,B). Výsledky ukazují, že porfyrin NMM je silný inaktivátor VKE, který zachovává imunitní potenciál inaktivovaného viru.



Obrázek 5. (A) Množství protilátek proti VKE (ve VIEU/ml) určené pomocí testu ELISA ve vzorcích krve myši. Byly analyzovány následující skupiny myši: (I) myši imunizované VKE inaktivovaným porfyrinem NMM, u nichž byly vzorky krve odebrány před inokulací latentní dávkou VKE (den 46); (II) myši imunizované VKE inaktivovaným porfyrinem NMM, u nichž byly vzorky krve odebrány po inokulaci latentní dávkou VKE (den 77); (III) kontrolní myši injikované PBS, u nichž byly vzorky krve odebrány před inokulací latentní dávkou VKE (den 46); (IV) kontrolní myši injikované PBS, u nichž byly vzorky krve odebrány po inokulaci latentní dávkou VKE (den 77). (B) Neutralizační protilátky proti VKE (ze vzorků krve II a IV) byly určovány pomocí virus-neutralizačního testu; u kontrolního séra nebyly protilátky proti TBEV detekovány (N.D.). (C) Reaktivita autentického (neinaktivovaného) VKE, VKE inaktivovaného porfyrinem NMM a VKE inaktivovaného β -propiolaktone s lidskými VKE-neutralizujícími antisérem a s naivním antisérem v systému ELISA. Statistická analýza byla provedena pomocí neparametrického nepárového Mann-Whitney testu. ns, nesignifikantní, P>0.05; *, P<0.05; **, P<0.01 (upraveno dle Holoubek et al., 2024).

3.2.3. VKE inaktivovaný pomocí NMM interaguje s VKE-neutralizujícím lidským antisérem

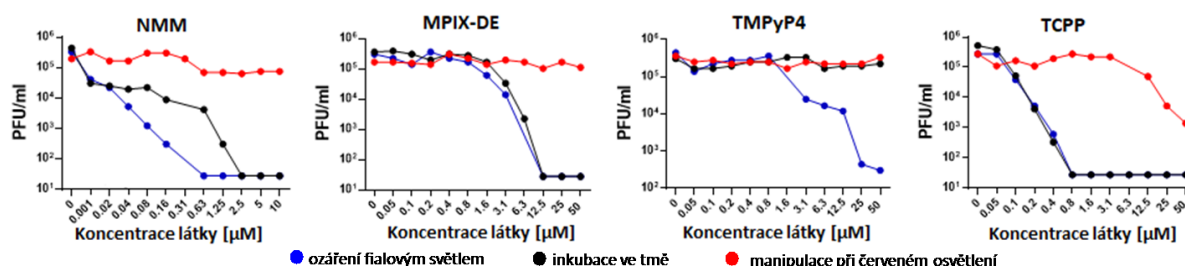
Dále jsme zkoumali schopnost VKE inaktivovaného pomocí NMM (25 μ M) interagovat s VKE-neutralizujícím lidským antisérem v systému ELISA. Reakce NMM-inaktivovaného viru s neutralizujícími protilátkami proti VKE byla srovnatelná s reakcí viru inaktivovaného β -propiolaktone, což je běžně používané činidlo pro přípravu inaktivovaných celovirionových vakcín. Vazebná kapacita protilátek u vzorků viru inaktivovaného porfyrinem NMM a β -propiolaktone byla mírně nižší než u autentického (neinaktivovaného, kontrolního) viru. Naopak vazebná kapacita vzorků viru testovaných s naivním lidským sérem (neobsahujícím protilátky proti VKE) byla významně nižší (obr. 5C). Naše výsledky jasně ukazují, že virus ošetřený porfyrinem si zachovává svou antigenní/imunogenní aktivitu a interaguje s neutralizujícími protilátkami proti VKE v systému ELISA.

3.2.4 Virus-inaktivační efekt některých porfyrinů může být dále zesílen ozářením excitačním světlem

Studium fotodynamické inaktivace viru fialovým světlem (405 ± 20 nm, 30 mW/cm^2 , pozn. tato vlnová délka odpovídá absorpčnímu maximu většiny porfyrinů) byla v rámci tohoto funkčního vzorku provedena v podmínkách *in vitro*. Ozařování vzorku VKE fialovým světlem po dobu 10 minut významně zvýšilo virus-inaktivační aktivitu porfyrinu NMM ve srovnání s jeho aktivitou na vzorcích viru inkubovaných s porfyrinem ve tmě (hodnota EC_{50} po ozařování klesla 3,5krát; obr. 6-NMM, modrá vs. černá křivka). Navíc virus-inaktivační aktivita NMM zcela zmizela, když byl experiment proveden bez denního světla (v tmavé místnosti pod červeným světlem), což naznačuje, že fotodynamická inaktivace viru za účasti tvorby ROS je hlavním mechanismem antivirové aktivity porfyrinů (obr. 6-NMM, červená křivka). Ztráta virus-inaktivační aktivity za červeného osvětlení byla pozorována i u ostatních studovaných porfyrinů (obr. 6, červené křivky).

Dále jsme zkoumali, zda by ozařování fialovým světlem mohlo vyvolat virus-inaktivační aktivitu těch porfyrinů, které neprokázaly virus-inaktivační účinek ve tmě. Pro tento experiment jsme vybrali sloučeninu TMPyP4. Jak bylo očekáváno, ozařování vedlo k dramatickému zvýšení virus-inaktivační aktivity této látky *in vitro*, což podporuje naši hypotézu, že většina virus-inaktivační aktivity porfyrinů je indukována světlem (obr. 6-TMPyP4, černá vs. modrá křivka).

Zajímavé je, že ozáření nevedlo k téměř žádnému zvýšení virus-inaktivační aktivity u porfyrinů TCPP a MPIX-DE, což naznačuje, že fotosenzitizace obou látek byla pravděpodobně indukována již denním světlem během přípravy vzorku, a další ozařování této látky fialovým světlem nemělo na jejich aktivitu žádný posilující efekt (obr. 6-MPIX-DE a TCPP, černé vs. modré křivky).



Obrázek 6. Světlem indukovaná virus-inaktivační aktivita vybraných porfyrinů. U NMM byla zjištěna EC_{50} při inkubaci ve tmě $0.173 \mu\text{M}$ (černá křivka), zatímco po ozáření fialovým světlem $0.049 \mu\text{M}$ (modrá křivka, vzrůst aktivity 3.5krát). Pro srovnání u TCPP byly zjištěny EC_{50} ve tmě $0.202 \mu\text{M}$ (černá křivka) a po ozáření $0.233 \mu\text{M}$ (modrá křivka, tj. téměř žádný rozdíl v aktivitě) (upraveno dle Holoubek et al., 2024).

3.2.5. Výsledky - shrnutí

Porfyriny, zejména NMM a jiné β -alkyl-substituované deriváty, jsou vysoce účinné virus-inaktivační agens. Inkubací viru s porfyrinem NMM získáme virus, který je zcela neinfekční pro laboratorní myši. Zachovává si však svoji imunogenicitu a myši imunizované takto inaktivovaným virem produkují virus-neutralizační protilátky, které je chrání proti infekci při inokulaci infekčním (životaschopným) virem. Mechanismus účinku porfyrinů (i jiných fotosenzitizerů) je založen na fotochemickém poškození obalu virových částic, což zahrnuje peroxidaci lipidů ve virových membránách a cross-linkování a jiné oxidativní poškození virových povrchových proteinů prostřednictvím ROS, zejména vysoce reaktivního singletového kyslíku. Aktivitu porfyrinů lze proto dále modulovat excitačním světlem (absorpční maximum tetrapyrrolového kruhu je 405 nm) a tím snížit koncentraci porfyrinu potřebnou k účinné inaktivaci virů na minimum (u NMM se hodnota EC_{50} po excitaci fialovým světlem pohybuje v řádech desítek nanomolů, měřeno *in vitro*). Vzhledem k možnosti používat velmi nízké koncentrace mohou porfyriny představovat účinnější a bezpečnější inaktivační činidla než běžná chemická agens tradičně

používané pro přípravu inaktivovaných celovirionových vakcín (např. formaldehyd nebo β -propiolakton).

4. Srovnání novosti postupů

NMM není dle našich informací v současné době používán jako inaktivační agens pro přípravu celovirionových vakcín. Jiné fotosenzitizační inaktivační agens jsou používány spíše ojediněle.

5. Uplatnění funkčního vzorku

Funkční vzorek je na pracovišti autorů zaveden a je využíván k inaktivaci obalených virů pro výzkumné účely. Další potenciální využití funkčního vzorku spočívá v uplatnění v humánní nebo veterinární medicíně pro přípravu nových inaktivovaných celovirionových vakcín pro prevenci virových infekcí u člověka nebo domácích či hospodářských zvířat.

6. Ekonomické aspekty

V současné době nelze ekonomické aspekty odhadnout.

7. Použitá literatura

Amos-Tautua, B.M., Songca, S.P., Oluwafemi, O.S., 2019. Application of Porphyrins in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Molecules*. 24 (13), 2456. doi: 10.3390/molecules24132456.

Artusi, S., Ruggiero, E., Nadai, M., Tosoni, B., Perrone, R., Ferino, A., Zanin, I., Xodo, L., Flamand, L., Richter, S.N., 2021. Antiviral Activity of the G-Quadruplex Ligand TMPyP4 against Herpes Simplex Virus-1. *Viruses*. 13 (2), 196. doi: 10.3390/v13020196.

Assunção-Miranda, I., Cruz-Oliveira, C., Neris, R.L.S., Figueiredo, C.M., Pereira, L.P.S., Rodrigues, D., Araujo, D.F.F., Da Poian, A.T., Bozza, M.T., 2016. Inactivation of Dengue and Yellow Fever viruses by heme, cobalt-protoporphyrin IX and tin-protoporphyrin IX, *Journal of Applied Microbiology*, 120 (3), Issue 3, 790–804. <https://doi.org/10.1111/jam.13038>.

Batlle, A.M., 1993. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol. B*. 20 (1), 5-22. doi: 10.1016/1011-1344(93)80127-u.

Eyer, L., Nencka, R., de Clercq, E., Seley-Radtke, K., Růžek, D. 2018. Nucleoside analogs as a rich source of antiviral agents active against arthropod-borne flaviviruses. *Antivir. Chem. Chemother.* 26, 2040206618761299. doi: 10.1177/2040206618761299.

Eyer, L., Seley-Radtke, K., Ruzek, D. 2023. New directions in the experimental therapy of tick-borne encephalitis. *Antiviral. Res.* 210, 105504. doi: 10.1016/j.antiviral.2022.105504.

Guo, H., Pan, X., Mao, R., Zhang, X., Wang, L., Lu, X., Chang, J., Guo, J.T., Passic, S., Krebs, F.C., Wigdahl, B., Warren, T.K., Retterer, C.J., Bavari, S., Xu, X., Cuconati, A., Block, T.M., 2011. Alkylated porphyrins have broad antiviral activity against hepadnaviruses, flaviviruses, filoviruses, and arenaviruses. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 55 (2), 478-86. doi: 10.1128/AAC.00989-10. Epub 2010 Dec 6.

Heffron, J., Bork, M., Mayer, B.K., Skwor, T., 2021. A Comparison of Porphyrin Photosensitizers in Photodynamic Inactivation of RNA and DNA Bacteriophages. *Viruses*. 13 (3), 530. doi: 10.3390/v13030530.

Holoubek, J., Bednářová, K., Havierník, J., Huvarová, I., Dvořáková, Z., Černý, J., Outlál, M., Salát, J., Konkol'ová, E., Boura, E., Růžek, D., Vorlíčková, M., Eyer, L., Renčiuk, D., 2022. Guanine quadruplexes

in the RNA genome of the tick-borne encephalitis virus: their role as a new antiviral target and in virus biology. *Nucleic Acids Res.* 50 (8), 4574-4600. doi: 10.1093/nar/gkac225.

Holoubek, J., Salát, J., Kotouček, J., Kastl, T., Vancová, M., Huvarová, I., Bednář, P., Bednářová, K., Růžek, D., Renčiuk, D., Eyer, L. 2024. Antiviral activity of porphyrins and porphyrin-like compounds against tick-borne encephalitis virus: Blockage of the viral entry/fusion machinery by photosensitization-mediated destruction of the viral envelope. *Antiviral Res.* 221: 105767. doi: 10.1016/j.antiviral.2023.105767.

Lu, S., Pan, X., Chen, D., Xie, X., Wu, Y., Shang, W., Jiang, X., Sun, Y., Fan, S., He, J., 2021. Broad-spectrum antivirals of protoporphyrins inhibit the entry of highly pathogenic emerging

Neris, R.L.S., Figueiredo, C.M., Higa, L.M., Araujo, D.F., Carvalho, C.A.M., Verçoza, B.R.F., Silva, M.O.L., Carneiro, F.A., Tanuri, A., Gomes, A.M.O., Bozza, M.T., Da Poian, A.T., Cruz-Oliveira, C., Assunção-Miranda, I., 2018. Co-protoporphyrin IX and Sn-protoporphyrin IX inactivate Zika, Chikungunya and other arboviruses by targeting the viral envelope. *Sci Rep.* 8 (1), 9805. doi: 10.1038/s41598-018-27855-7.

Romero, M.T.M., Möbius, D., 2002. Chapter 4 - Organisation of Porphyrins in Monolayers and Monolayer Assemblies, Editor(s): D. Möbius, R. Miller, *Studies in Interface Science*, Elsevier, Volume 16, Pages 161-205, ISSN 1383-7303, ISBN 9780444512567, [https://doi.org/10.1016/S1383-7303\(02\)80005-9](https://doi.org/10.1016/S1383-7303(02)80005-9).

Růžek, D., Avšič Županc, T., Borde, J., Chrdle, A., Eyer, L., Karganova, G., Kholodilov, I., Knap, N., Kozlovskaya, L., Matveev, A., Miller, A.D., Osolodkin, D.I., Överby, A.K., Tikunova, N., Tkachev, S., Zajkowska, J., 2019. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* 164, 23-51. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.01.014.

Salát, J., Strakova P., Stefanik M., Slosarkova S., Ruzek D. 2022. Sero-epidemiology of tick-borne encephalitis in small ruminants in the Czech Republic. *Ticks and tick-borne Diseases* 13, 101996. DOI10.1016/j.ttbdis.2022.101996.

Senge, M.O., Sergeeva, N.N., Hale, K.J., 2021. Classic highlights in porphyrin and porphyrinoid total synthesis and biosynthesis. *Chem. Soc. Rev.* 50 (7), 4730-4789. doi: 10.1039/c7cs00719a.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz