



Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Rozprawa doktorska

Mgr Anna Czarnota

**„Chimeryczne, wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV
jako potencjalna szczepionka**

przeciwno wirusowemu zapaleniu wątroby typu C”

**„Chimeric HBV-HCV virus-like particles
as a potential vaccine against Hepatitis C”**

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego

celem uzyskania stopnia doktora

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie nauki biologiczne

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk

Promotor pomocniczy: dr Katarzyna Grzyb

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

GDAŃSK 2023

Podziękowania

Dr Katarzynie Grzyb dziękuję za motywację i szansę realizacji kariery naukowej, za wiedzę i umiejętności, a także za codzienną opiekę nad przebiegiem mojej pracy.

Prof. dr hab. Krystynie Bienkowskiej-Szewczyk dziękuję za poświęcony czas, opiekę podczas realizacji grantów oraz cenne uwagi do publikowanych prac.

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów oraz Zakładu Szczepionek Rekombinowanych dziękuję za wspaniałą atmosferę w pracy i wsparcie w realizacji eksperymentów. Eli i Oli dziękuję za cierpliwość w opiece administracyjnej.

Gabrysi, Marcie, Klaudii i wszystkim osobom z pokoju 367 za humor i codzienną pomoc.

Moim przyjaciółkom Basi i Szwedowi dziękuję serdecznie za nieocenioną wiarę we mnie, motywację oraz rozmowy podtrzymujące na duchu.

Dziękuję mojej siostrze Idze za wsparcie i słowa otuchy na każdym etapie pracy.

Mojej mamie Ewie i babci Zofii za nieograniczone wsparcie, motywację oraz entuzjazm.

Z całego serca dziękuję!

Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu ze środków projektów:

„Nowe rekombinowane glikoproteiny E1E2 oraz cząstki wirusopodobne jako szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV)” realizowanego pod kierownictwem dr Katarzyny Grzyb, w ramach konkursu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju (LIDER/12/151/L-3/11/NCBR/2012).



Narodowe Centrum Badań i Rozwoju

„Właściwości immunogenne epitopów białka NS3 wirusa zapalenia wątroby typu C w fuzji z małym białkiem powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B” realizowanego pod kierownictwem dr Katarzyny Grzyb, w ramach grantu Opus 14 Narodowego Centrum Nauki (2017/27/B/NZ6/01403).

„Ocena immunogenności silnie konserwowanych epitopów glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C eksponowanych na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych opartych na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B” realizowanego pod kierownictwem mgr Anny Czarnoty, w ramach grantu Preludium 12 Narodowego Centrum Nauki (2016/23/N/NZ6/02503).



N A R O D O W E C E N T R U M N A U K I

Spis treści

1. Wykaz skrótów	6
2. Streszczenie.....	8
3. Abstract (streszczenie w języku angielskim).....	10
4. Wstęp	11
4.1 Systematyka wirusa zapalenia wątroby typu C	11
4.2 Budowa wirusa zapalenia wątroby typu C oraz proces wejścia do komórek gospodarza	12
4.3 Białka strukturalne	14
4.3.1 Heterodimer glikoprotein powierzchniowych – E1E2.....	14
4.4 Białka niestrukturalne	16
4.5 Epidemiologia zakażeń HCV	18
4.5.1 Drogi zakażenia, dotknięte populacje	18
4.5.2 Terapie zakażeń HCV	19
4.6 Czy szczepionki przeciwko HCV są potrzebne?	20
4.6.1 Koszt terapii	20
4.6.2 Diagnostyka osób zakażonych	20
4.6.3 Reinfekcje.....	21
4.6.4 Rak wątrobowokomórkowy	21
4.6.5 Selekcja wariantów HCV opornych na leczenie DAA	21
4.6.6 Zmienność genetyczna HCV	22
4.7 Odpowiedź komórkowa	23
4.7.1 Limfocyty CD4+	24
4.7.2 Limfocyty CD8+	24
4.8 Odpowiedź humoralna	25
4.9 Mechanizmy ucieczki przed przeciwciałami neutralizującymi	27
4.9.1 Zmiana konformacji w obrębie epitopów	27
4.9.2 Ucieczka poprzez wprowadzanie zmian poza epitopem	28
4.9.3 Mechanizm „przynęty dla przeciwciał”	29
4.9.4 Glikozylacja heterodimeru E1E2	29
4.9.5 „Oddychanie” glikoprotein E1E2.....	30
4.9.6 Inne mechanizmy	30
4.10 Modele zwierzęce w badaniach nad szczepionką	31
4.11 Badania nad szczepionką HCV	32
4.12 Cząsteczki wirusopodobne.....	34
5. Literatura:.....	36

6. Cele badań.....	44
7. Omówienie uzyskanych wyników badań.....	45
7.1 Praca 1.....	45
7.1.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:	45
7.1.2 Wyniki:.....	46
7.1.3 Wnioski:	49
7.2 Praca 2.....	50
7.2.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:	50
7.2.2 Wyniki:.....	51
7.2.3 Wnioski:	55
7.3 Praca 3.....	56
7.3.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:	56
7.3.2 Wyniki:.....	57
7.3.3 Wnioski:	59
8. Wnioski końcowe:	61
9. Osiągnięcia naukowe	61
9.1 Publikacje naukowe	61
9.1.1 Publikacje stanowiące część doktoratu	61
9.1.2 Publikacje dodatkowe	62
9.2 Konferencje naukowe	63
9.2.1 Wystąpienia ustne	63
9.2.2 Postery	63
9.3 Zgłoszenia patentowe.....	64
9.3.1 Zgłoszenia patentowe do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej	64
9.3.2 Zgłoszenia do Europejskiego Urzędu Patentowego	65
9.4 Granty naukowe	65
10. Załącznik 1.....	66
11. Załącznik 2.....	119

1. Wykaz skrótów

(+)ssRNA - jednoniciowy kwas rybonukleinowy o dodatniej polarności (*positive-sense single-stranded ribonucleic acid*)

APC - komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells*)

AR - region antygenowy (*antigenic region*)

C - białko rdzenia (*core*)

CD - (*cluster of differentiation*)

CD81 – antygen różnicowania 81 (*cluster of differentiation 81*)

ChAd3 – szympansi adenowirus 3 (*chimpanzee adenovirus 3*)

CLDN1 – kładyna 1 (*claudin 1*)

CTLA-4 - antygen 4 cytotoksycznych limfocytów T (*cytotoxic T cell antigen 4*)

DAAs - leki działające bezpośrednio na białka zaangażowane w cykl replikacyjny wirusa (*direct acting antivirals*)

E - glikoproteina powierzchniowa (*envelope glycoprotein*)

EMA – Europejska Agencja Leków (*European Medicines Agency*)

HAV - wirus zapalenia wątroby typu A (*Hepatitis A virus*)

HBV - wirus zapalenia wątroby typu B (*Hepatitis B virus*)

HCC - rak wątrobowokomórkowy (*hepatocellular carcinoma*)

HCV - wirus zapalenia wątroby typu C (*Hepatitis C virus*)

HCVcc - infekcyjny HCV pochodzący z hodowli komórkowych (*cell culture HCV*)

HIV - ludzki wirus upośledzenia odporności (*Human Immunodeficiency virus*)

HPV - wirus brodawczaka ludzkiego (*Human papillomavirus*)

HVR - region hiperzmienny (*hypervariable region*)

IFITM - białka transbłonowe indukowane przez interferon (*Interferon-induced transmembrane proteins*)

IFN- γ – interferon gamma (*interferon gamma*)

IgG – Immunoglobulina G (*immunoglobulin G*)

igVR - między genotypowy region zmienny (*intergenotypic variable region*)

IL-10 – interleukina 10 (*interleukin 10*)

IRES - struktura odpowiedzialna za wiązanie rybosomu (*internal ribosomal entry site - IRES*)

KLRG1 – lektynopodobny receptor komórek zabójców 1 z podrodziny G (*killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1*)

LDLR - receptor dla lipoprotein o małej gęstości (*low density lipoprotein receptor*)

mAb – przeciwciało monoklonalne (*monoclonal antibody*)

MVA – modyfikowany wirus krowianki szczepu Ankara (*modified vaccinia virus Ankara*)

nAb – przeciwciało neutralizujące (*neutralizing antibody*)

NANBH - zapalenie wątroby nie-A, nie-B (*non-A, non-B hepatitis*)

NPHV - hepacivirus innych niż naczelnne (*non-primates hepacivirus*)

NS - białko niestrukturalne (*nonstructural protein*)

NTR – rejon nieulegający translacji (*non-translated region*)

OCLN - okludyna (*occludin*)

ORF - otwarta ramka odczytu (*open reading frame*)

PAMP - motyw wzorców molekularnych powiązany z patogenami (*pathogen-associated molecular pattern*)

PD-1 - receptor programowanej śmierci 1 (*programmed death receptor 1*)

PRR - receptor rozpoznający wzorce (*pattern recognition receptors*)

RAVs - warianty wirusa posiadające mutacje skutkujące opornością na lek (*resistance associated variants*)

RHV - hepacivirus gryzoni (*rodent hepacivirus*)

sHBsAg - małe białko powierzchniowe wirusa zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus small surface antigen*)

SRB1 - receptor zmiatający klasy B typu 1 (*scavenger receptor class B type 1*)

TIM-3 – transbłonowa immunoglobulina i mucyna 3 (*T-cell immunoglobulin mucin-3*)

TLR - receptor Toll-podobny (*Toll-like receptors*)

VLDL - lipoproteina o bardzo małej gęstości (*very low density lipoprotein*)

VLP – cząsteczka wirusopodobna (*virus-like particle*)

WHO - Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)

2. Streszczenie

Obecnie na świecie żyje 58 milionów ludzi zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (z ang. hepatitis C virus - HCV). Intensywne badania prowadzone w ostatnich latach pozwoliły na opracowanie nowych, wysoce skutecznych leków działających bezpośrednio na cząsteczki wirusowe. Jednak ze względu na braki w powszechnej diagnostyce osób zakażonych, wysokie koszty leków, a także pojawianie się wariantów opornych na leczenie, opracowanie skutecznej i powszechnie dostępnej szczepionki chroniącej przed zakażeniem jest ważnym celem aktualnych badań nad HCV.

Powszechnie uważa się, że wysoka zmienność genetyczna wirusa HCV stanowi największą przeszkodę w opracowaniu skutecznej szczepionki profilaktycznej. Obecnie możemy wyróżnić co najmniej sześć głównych genotypów i dziewięćdziesiąt podtypów wirusa HCV o znaczeniu epidemiologicznym.

Głównym celem dla przeciwciał neutralizujących są glikoproteiny powierzchniowe E1 i E2 wirusa HCV zlokalizowane na powierzchni cząsteczki wirusowej w postaci heterodimeru E1E2. Ze względu na dużą zmienność genetyczną E1E2, skuteczna szczepionka profilaktyczna powinna być nakierowana na regiony heterodimeru E1E2 o konserwowanej sekwencji aminokwasowej, tak aby wzbudzone przez szczepienie przeciwciała były zdolne do neutralizacji różnych szczepów wirusa HCV.

Jedną z metod wzbudzania odpowiedzi immunologicznej przeciwko pojedynczym epitopom jest ich ekspozycja na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych (z ang. virus-like particles – VLPs). Jednym z najlepiej poznanych białek tworzących VLPs jest małe białko powierzchniowe wirusa zapalenia wątroby typu B (z ang. hepatitis B virus small surface antigen – sHBsAg), które ze względu na swoją zdolność do wzbudzania silnej odpowiedzi immunologicznej, może być wykorzystywane jako nośnik eksponujący sekwencje białkowe obcego pochodzenia.

W tym projekcie zaprojektowałam panel chimerycznych cząstek sHBsAg, w których silnie konserwowane epitopy glikoproteiny E2 HCV zostały wstawione do hydrofilowej pętli białka sHBsAg pojedynczo lub w kombinacjach wieloepitopowych. Ekspresja chimerycznych VLPs została przeprowadzona w systemie opartym na pierwotniaku *Leishmania tarentolae*, który produkuje białka posiadające ssaczy wzór N-glikozylacji. Oczyszczone, chimeryczne VLP zastosowano następnie do immunizacji myszy. Surowice myszy zostały dokładnie scharakteryzowane i przetestowane pod kątem reaktywności krzyżowej i właściwości neutralizujących wirusa HCV *in vitro*.

Badania pozwoliły na wskazanie chimerycznej cząsteczki wirusopodobnej HBV-HCV, która w przyszłości mogłaby być wykorzystana jako racjonalnie zaprojektowana szczepionka przeciwko HCV i HBV.

3. Abstract (streszczenie w języku angielskim)

Hepatitis C virus (HCV) infection affects an estimated 58 million people worldwide. Extensive research performed in the last couple of years led to a better understanding of the virus biology, resulting in the discovery of the highly effective direct acting antivirals (DAAs). Unfortunately, because of the high cost of the therapy, majority of the patients is still untreated. Therefore, development of an effective and commonly available vaccine is a major goal of the current HCV research.

The major obstacle in the development of protective immunity against HCV is the high genetic diversity of the virus, manifested primarily in the sequence of HCV envelope glycoproteins – E1E2. E1E2 glycoproteins heterodimer plays an important role in the virus-host interaction and is the main target for the neutralizing antibodies. For that reason, the ideal prophylactic vaccine should induce strong humoral response from the neutralizing antibodies against the highly conserved epitopes accessible on the surface of the HCV E1E2 glycoproteins.

One method to elicit immunogenic response against single epitope is to expose it on the surface of the virus like particles (VLPs). One of the best-known protein assembling into VLPs is the small surface protein (sHBsAg) of hepatitis B virus (HBV), which is widely used as a commercial prophylactic vaccine against hepatitis B virus. sHBsAg tertiary structure forms a hydrophilic loop containing the major B-cell epitopes also known as the “a”- determinant. Because of its immunogenic potential and ability to tolerate insertions, sHBsAg can be applied as an antigen carrier to deliver foreign sequences.

In this study I designed the panel of chimeric sHBsAg particles, in which multiple highly conserved epitopes of HCV E2 glycoprotein were inserted into the hydrophilic loop of the sHBsAg protein, individually or in multi-epitope combinations. The expression of the chimeric proteins was performed in the *Leishmania tarentolae* expression system, which has the potential to produce high-yields of proteins, characterized by the mammalian-like N-glycosylation pattern. Purified, chimeric VLPs were used for mice immunization. Mouse sera were thoroughly characterized and evaluated for their cross-reactivity and neutralizing activity.

The research indicated the chimeric HBV-HCV VLP that in the future could be used as a rationally designed HCV and HBV vaccine.

4. Wstęp

W 1975 roku podczas badań nad krwią przeznaczoną do transfuzji, prowadzonych w laboratorium Harvey'ego Altera, stwierdzono że istnieje pula przypadków zapalenia wątroby, która nie jest wywołana wirusem zapalenia wątroby typu A (z ang. Hepatitis A Virus – HAV) ani wirusem zapalenia wątroby typu B (z ang. Hepatitis B Virus – HBV)¹. Nowa choroba o nieznanym podłożu etiologicznym została nazwana zapaleniem wątroby nie-A, nie-B (z ang. non-A, non-B hepatitis - NANBH). Późniejsze badania, podczas których krew pacjentów zakażonych NANBH podawano szympancom, wykazały, że czynnikiem zakaźnym jest najprawdopodobniej wirus osłonkowy, który został nazwany wirusem zapalenia wątroby typu C (z ang. Hepatitis C Virus – HCV)². W roku 1989 podczas badań prowadzonych przez Michaela Houghtona na szympankach zakażonych HCV udało się sklonować i zsekwencjonować pierwszy genom wirusa i opracować testy diagnostyczne, które pozwoliły na praktycznie całkowitą eliminację HCV z krwi przeznaczonej do transfuzji^{2,3}. Późniejsze badania nad wirusową replikacją, białkami oraz mechanizmami wejścia doprowadziły do opracowania klonów HCV zdolnych do namnażania się w hodowlach komórkowych i w efekcie do opracowania skutecznych leków zwalczających infekcję HCV^{4,5}. Do dzisiaj jednak nie opracowano szczepionki mogącej zapobiegać zakażeniom HCV. W 2020 roku Harvey Alter, Michael Houghton oraz Charles Rice zostali nagrodzeni nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny za odkrycie wirusa HCV⁶.

4.1 Systematyka wirusa zapalenia wątroby typu C

Według klasyfikacji Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów, HCV należy do rodziny *Flaviviridae*, do której należą też takie wirusy jak wirus Dengi, wirus Zika czy wirus odkleszczowego zapalenia mózgu, oraz do rodzaju *Hepacivirus*, wśród którego jest jedynym wirusem zakażającym ludzi⁷.

Systematyka gatunku według Międzynarodowego Komitetu Taksonomii Wirusów

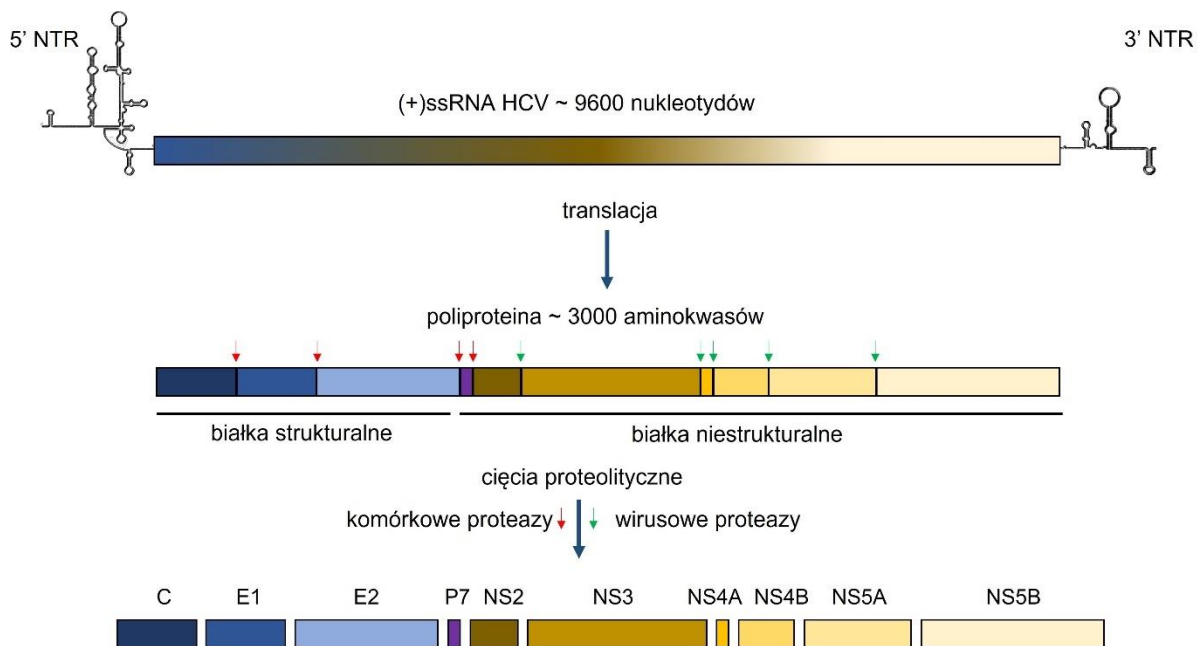
Rodzina -*Flaviviridae*

Rodzaj - *Hepacivirus*

Gatunek – *Hepacivirus C*

Podobnie jak reszta wirusów z rodziny *Flaviviridae* HCV posiada genom w postaci dodatnio spolaryzowanego jednoniciowego kwasu rybonukleinowego (z ang. positive-sense single-stranded ribonucleic acid - (+)ssRNA) a w cyklu replikacji w komórkach gospodarza genom

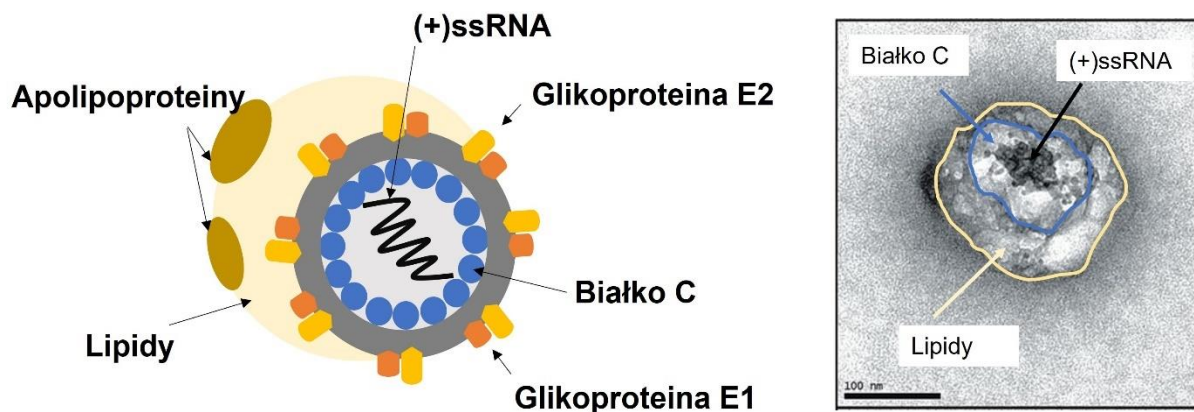
wirusa służy jako matrycowe RNA. Genom HCV ma długość ok. 9600 nukleotydów i zawiera pojedynczą otwartą ramkę odczytu (z ang. open reading frame – ORF), oflankowaną przez silnie konserwowane rejony nieulegające translacji (z ang. non-translated regions - NTRs) 5' i 3'. Rejony te zawierają fragmenty RNA o złożonej strukturze, niezbędne w prawidłowym przebiegu translacji oraz replikacji genomu HCV (Ryc. 1). Rejon 5'NTR zawiera strukturę odpowiedzialną za wiązanie rybosomu (z ang. internal ribosomal entry site - IRES), która rozpoczyna proces translacji ORF do wirusowej poliproteiny. Poliproteina HCV posiada około trzy tysiące aminokwasów i jest cięta przez proteazy komórkowe oraz wirusowe na dziesięć białek – trzy białka strukturalne oraz siedem białek niestrukturalnych (z ang. nonstructural proteins – NS). Proteazy gospodarza pośredniczą w odcinaniu białka rdzenia, glikoprotein E1 oraz E2 a także cięciu pomiędzy białkami p7 i NS2. Białko NS2 posiada aktywność autoproteazy i katalizuje cięcie pomiędzy sobą a proteazą wirusową - NS3, która odcina swój kofaktor - NS4A a następnie bierze udział w uwalnianiu reszty białek niestrukturalnych – NS4B, NS5A oraz NS5B⁸ (Ryc. 1).



Rycina 1. Białka kodowane przez genom HCV. Strzałkami zaznaczono miejsca cięcia przez komórkowe (czerwone strzałki) oraz wirusowe proteazy (zielone strzałki). W wyniku cięcia poliproteiny HCV powstają trzy białka strukturalne oraz siedem białek niestrukturalnych (NS).

4.2 Budowa wirusa zapalenia wątroby typu C oraz proces wejścia do komórek gospodarza

Cząsteczki HCV mają około 50-80 nm średnicy, zbudowane są z białka rdzenia związanego z wirusowym materiałem genetycznym tworzącym kapsyd wirusa, który otoczony jest błoną lipidową z zakotwiczonymi w niej glikoproteinami powierzchniowymi E1 i E2 tworzącymi kowalencyjnie związany heterodimer. W zakażonym organizmie cząsteczki HCV dodatkowo łączą się z pochodzącymi z komórek gospodarza apolipoproteinami, tworząc cząsteczki lipowirusowe⁸ (Ryc. 2).



Rycina 2. Schemat przedstawiający budowę cząsteczki HCV krążącej w organizmie zakażonego pacjenta (po lewej). Mikrografia cząsteczki HCV krążącej w organizmie zakażonego pacjenta (po prawej).

Źródło mikrografii: Piver E, Boyer A, Gaillard J, et al *Ultrastructural organization of HCV from the bloodstream of infected patients revealed by electron microscopy after specific immunocapture* Gut 2017;66:1487-1495.

Obecność lipidów na powierzchni cząsteczek wirusowych jest kluczowa w procesie wejścia HCV do komórek gospodarza. Początkowo cząsteczki są zagęszczane na powierzchni komórek poprzez oddziaływanie z glikozaminoglikanami, receptorami wiążącymi lipoproteiny o małej gęstości (z ang. low density lipoprotein receptor – LDLR) oraz z receptorem zmiatającym klasy B typu 1 (z ang. scavenger receptor class B type 1 – SRB1). Następnie wirus oddziałuje ze swoistymi dla siebie komórkowymi receptorami wejścia, m.in. tetraspaniną CD81 (z ang. cluster of differentiation 81), oraz białkami tworzącymi ścisłe połączenia międzykomórkowe – kładyną 1 (z ang. claudin 1 – CLDN1) oraz okludyną (z ang. occludin – OCLN). Po związaniu receptorów cząsteczki wirusowe HCV wnikają do komórek gospodarza poprzez klatryno-zależną endocytozę, a fuzja błon zachodzi we wczesnych endosomach. Podczas fuzji następuje odsłonięcie kapsydu oraz uwolnienie wirusowego RNA do cytosolu w celu translacji i

replikacji. Proces translacji rozpoczyna się poprzez związanie podjednostek rybosomu z wirusowym RNA, a następnie kompleks przyłącza się do błony szorstkiego retikulum endoplazmatycznego. W procesie translacji powstaje pojedyncza poliproteina, która jest cięta przez komórkowe i wirusowe proteazy. Białka wirusowe w połączeniu z białkami gospodarza indukują przegrupowanie błon komórkowych, tworząc złożony kompleks błon (z ang. membranous web), w którym zależna od RNA polimeraza RNA – NS5B katalizuje syntezę RNA o ujemnej polarności, który jest używany jako matryca do tworzenia potomnych kopii RNA o polarności dodatniej ((+)ssRNA). Nowo zsyntetyzowane (+)ssRNA może być włączane do cząstek nukleokapsydu, albo wykorzystywane w procesie translacji i replikacji w obrębie kompleksu replikacyjnego. Nowo powstałe cząsteczki wirusa gromadzą się w pobliżu komórkowych kropeł lipidowych zawierających m.in. apolipoproteiny, a następnie przechodzą przez sieć aparatu Golgiego, gdzie łączą się z lipoproteinami o bardzo małej gęstości (z ang. very low density lipoprotein - VLDL). Takie dojrzałe cząsteczki lipowirusowe HCV są transportowane na powierzchnię komórki, gdzie łączą się z błoną komórkową hepatocytów i są uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej⁸⁻¹⁰.

4.3 Białka strukturalne

HCV posiada trzy białka strukturalne – białko rdzenia (z ang. core – C) oraz glikoproteiny powierzchniowe (z ang. envelope glycoproteins – E) E1 i E2.

Białko C jest pierwszym białkiem uwalnianym z wirusowej poliproteiny i charakteryzuje się wysokim stopniem konserwacji sekwencji aminokwasowej. Region N-terminalny białka C wiąże się z (+)ssRNA HCV, tworząc nukleokapsyd. Białko C oddziałuje również z retikulum endoplazmatycznym, błonami komórek gospodarza oraz kroplami lipidowymi, pośrednicząc w składaniu dojrzałych cząstek HCV. Białko to pełni rolę w modulacji szlaków sygnałowych komórek gospodarza m. in. w szlakach odpowiedzialnych za apoptozę, metabolizm lipidów, regulację transkrypcji czy stres oksydacyjny¹¹. W związku z wpływem białka C na szlaki komórkowe uważa się, że jest ono jednym z ważniejszych czynników w patologii zakażenia HCV.

4.3.1 Heterodimer glikoprotein powierzchniowych – E1E2

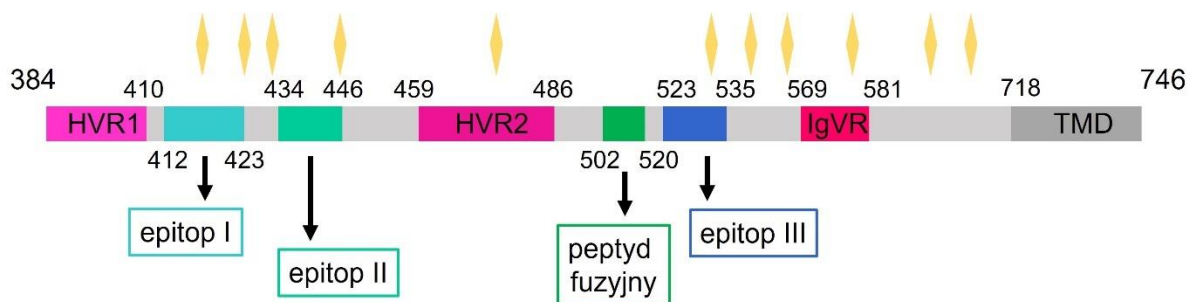
E1 oraz E2 są białkami transbłonowymi typu I z N-końcową ektodomeną i C-końcową domeną hydrofobową zakotwiczoną w błonie tworzącej osłonkę wirusa. Na powierzchni cząsteczki wirusowej E1 i E2 tworzą heterodimer E1E2, który pełni kluczową rolę w procesie wejścia wirusa do komórki poprzez oddziaływanie z receptorami wejścia dla HCV¹². Ponadto

heterodimer bierze udział w fuzji błony wirusowej z endosomem. Ze względu na swoją lokalizację na powierzchni cząstek wirusowych heterodimer E1E2 jest głównym celem dla przeciwciał neutralizujących wirusa, badania nad szczepionkami opartymi na odpowiedzi humoralnej są więc skoncentrowane na tych białkach^{13,14}.

Białko E1 (aminokwasy 192-383 wirusowej poliproteiny) posiada od 4 do 5 N-glikanów, w zależności od genotypu wirusa. E1 pełni ważną rolę w fałdowaniu glikoproteiny E2, formowaniu heterodimeru E1E2 oraz podczas oddziaływania wirusa z receptorami komórkowymi¹⁵. Białko E1 jest mniejszym z białek tworzących heterodimer E1E2 i charakteryzuje się niższą zmiennością sekwencji aminokwasowej w porównaniu z E2. Nie jest znana pełna struktura E1, jak dotąd otrzymano struktury krystalograficzne dla dwóch odrębnych fragmentów glikoproteiny znajdujące się w rejonach 192–271 i 314–324^{16,17}, co sprawia, że wiemy o tym białku mniej niż o E2. E1 charakteryzuje się mniejszą immunogennością niż E2 i niewiele wiadomo o jego immunodominujących rejonach, ale znane są nieliczne przeciwciała neutralizujące wiążące E1, m. in. przeciwciało H-111 wiążące rejon 192-202 oraz przeciwciała IGH526 and IGH505 wiążące rejon 313-328^{18,19}.

Główną rolą glikoproteiny E2 (aminokwasy 384-746 wirusowej poliproteiny) jest oddziaływanie z receptorami na powierzchni komórki gospodarza. E2 posiada 9 silnie konserwowanych wiązań dwusiarczkowych oraz 9-11 miejsc glikozylacji²⁰⁻²². E2 jest białkiem charakteryzującym się wysoką zmiennością sekwencji, przy czym większość zmian jest zlokalizowana w trzech regionach hiperzmiennych (z ang. hypervariable region – HVR): regionie hiperzmiennym 1 (HVR1, pozycje aminokwasów 384–409), regionie hiperzmiennym 2 (HVR2, 460–485) oraz między genotypowym regionie zmiennym (igVR, 570–580) (Ryc. 3). Rejony zmienne stanowią około 25% sekwencji E2. HVR1 jest domeną immunodominującą w obrębie glikoproteiny E2 a wskutek zmian wprowadzanych w jej obrębie powstają warianty HCV umożliwiające ucieczkę wirusa przed przeciwciałami neutralizującymi²³. Z drugiej strony, glikoproteina E2 zawiera także regiony o umiarkowanej lub silnej konserwacji sekwencji aminokwasowej - w tym domeny pośredniczące w interakcji wirusa z receptorami komórkowymi, głównie CD81. Takie rejony stanowią cel dla przeciwciał neutralizujących o szerokim spektrum działania i są dobrym celem dla racjonalnie zaprojektowanych szczepionek przeciwko HCV. Trzy epitopy o silnie konserwowanej sekwencji, będące celami dla przeciwciał neutralizujących, to: epitop I znajdujący się w regionie N-terminalnym glikoproteiny E2 (pozycje aminokwasów 412–423); epitop II znajduje się w warstwie przedniej (434–446); i epitop III zlokalizowany w pętli wiążącej CD81 (523–535) (Ryc. 3). Dodatkowo

można wyróżnić rejon potencjalnego peptydu fuzyjnego (502-520)²⁴. Zamiennie z określeniem „epitopy” stosuje się czasami określenie regionów antygenowych, których wyróżnia się pięć (z ang. antigenic regions 1-5, AR 1-5) lub domen oznaczanych literami alfabetu A-E^{25,26}. Epitop I dzieli kluczowe aminokwasy z domeną E; epitop II z domenami B, D i AR3; a epitop III z domeną B i AR3. Co więcej, dla niektórych przeciwciał wykazujących aktywność neutralizującą, wymagana jest obecność pełnego heterodimeru E1E2, takie przeciwciała wiążą rejon AR4 i AR5²⁵.



Rycina 3. Budowa glikoproteiny E2 (384-746). W obrębie sekwencji można wyróżnić rejony charakteryzujące się wysoką zmiennością (HVR1, HVR2 oraz IgVR) oraz rejony silnie konserwowane będące celem dla przeciwciał neutralizujących wirusa (epitop I, II i III oraz peptyd fuzyjny). 11 miejsc N-glikozylacji zostało oznaczone żółtymi rąbami.

Struktura glikoproteiny E2 jest dobrze poznana, w ostatnich latach dwóm grupom udało się skryzalizować ektodomenę glikoproteiny E2, a otrzymane struktury pokazują, że zawiera ona położoną centralnie strukturę β -kanapki, stabilizowaną przez wiązania dwusiarczkowe. Ten centralny region jest otoczony przez N-kończową „warstwę przednią” oraz C-kończową „warstwę tylną”^{21,22}. Badania struktury stanowią istotny postęp w identyfikacji istotnych domen antygenowych i regionów glikoproteiny E2, co może przełożyć się na bardziej racjonalne projektowanie szczepionek zdolnych do indukowania przeciwciał neutralizujących. Jednak skryzalizowane struktury E2 różnią się między sobą m. in. położeniem mostków dwusiarczkowych oraz brakuje w nich kluczowych rejonów E2 m. in. epitopu I oraz rejonu hiperzmiennego 1. Dodatkowo E2 użyty do badań nie był w pełni glikozylowany, a krystalizacja E2 została przeprowadzona bez tworzącej heterodimer glikoproteiny E1.

4.4 Białka niestrukturalne

Białka niestrukturalne wirusa zapalenia wątroby typu C to p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B (Ryc.1).

Białko p7 jest małym hydrofobowym białkiem transbłonowym, tworzącym kanały jonowe w błonach komórek gospodarza. Podczas składania cząstek wirusowych białko p7 lokalizuje się w retikulum endoplazmatycznym i bierze udział w uwalnianiu białka C z kropeł lipidowych. Dodatkowo aktywność białka p7 jako kanału jonowego podnosi niskie pH w komórkowym układzie wydzielniczym chroniąc glikoproteiny powierzchniowe E1E2 przed inaktywacją²⁷.

Białko NS2 jest białkiem transbłonowym posiadającym aktywność proteazy cysteinowej uwalniającej w cięciu autokatalitycznym proteazę NS3. NS2 połączeniu z innymi białkami wirusowymi odgrywa kluczową rolę w indukcji zmian błonowych w procesie tworzenia cząstek wirusowych²⁸.

Białko NS3 pełni podwójną funkcję proteazy serynowej oraz helikazy. Domena proteazy serynowej NS3 katalizuje proteolizę wirusowej poliproteiny i jest odpowiedzialna za większość cięć uwalniających białka niestrukturalne HCV. Ponadto NS3 odgrywa rolę w osłabianiu wrodzonej odpowiedzi immunologicznej gospodarza poprzez proteolityczną inaktywację czynników komórkowych mogących hamować replikację HCV. Domena helikazy NS3 rozwija wirusowe RNA i wspiera proces replikacji wirusa. Proteaza NS3 jest jednym z najważniejszych celów w terapii zakażeń HCV, w której wykorzystuje się swoiste inhibitory hamujące aktywność proteazy NS3/4A. Dodatkowo, białko NS3 ma zdolność do wzbudzania silnej odpowiedzi immunologicznej opartej na limfocytach cytotoksycznych i jest ważnym celem dla szczepionek o działaniu profilaktycznym i terapeutycznym.^{29,30}

Białko NS4 jest prekursorem dwóch białek: NS4A i NS4B. Białko NS4A tworzy kompleks z białkiem NS3, jest kofaktorem proteazy NS3 i zakotwicza kompleks NS3/4A w błonie retikulum endoplazmatycznego oraz zwiększa aktywność helikazy NS3. Białko NS4B lokalizuje się w retikulum endoplazmatycznym i jest odpowiedzialne za zmiany w błonie cytoplazmatycznej komórki, indukując rearanżację błon i tworząc wraz z innymi białkami niestrukturalnymi kompleks replikacyjny^{31,32}.

Białko NS5A pełni funkcję metaloproteiny cynkowej i reguluje replikację i składanie cząstek wirusa. Ponadto, NS5A oddziałuje z innymi białkami wirusowymi (NS4B, NS5B), wirusowym RNA i białkami komórek gospodarza, biorąc udział w patogenezie HCV, modulacji szlaków sygnalizacji komórkowej, rozprzestrzeleniu się wirusa i regulacji wrodzonej odpowiedzi immunologicznej. W terapii zakażeń HCV wykorzystuje się swoiste inhibitory białka NS5A^{33,34}.

Białko NS5B posiada funkcję RNA-zależnej polimerazy RNA, enzymu, który odgrywa kluczową rolę w replikacji HCV. Białko NS5B jest ważnym celem dla terapii antywirusowej. Istnieją dwie główne podklasy inhibitorów polimerazy NS5B: analogi nukleotydów, które po

włączeniu do nowo syntetyzowanej nici RNA indukują zakończenie łańcucha oraz inhibitory nienukleotydowe, które poprzez wiązanie z miejscami aktywnymi hamują aktywność polimerazy^{35,36}.

4.5 Epidemiologia zakażeń HCV

Na świecie żyje około 58 milionów osób zakażonych wirusem HCV, co stanowi około 0,7% populacji ludzkiej³⁷. W Polsce liczbę zakażonych szacuje się na około 150 tys. osób, około 0,4-0,5% populacji kraju³⁸. Według szacunków Światowej Organizacji Zdrowia (World Health Organization – WHO) co roku odnotowuje się 1,5 miliona nowych infekcji HCV³⁹.

Około 70% infekcji HCV przechodzi w fazę chroniczną, która przez lata może nie dawać żadnych swoistych objawów, dlatego też zakażenia HCV często nazywa się „cichą epidemią”. Przewlekła postać choroby może prowadzić do ciężkiego uszkodzenia wątroby, marskości wątroby i w efekcie do rozwinięcia się raka wątrobowokomórkowego. Przebieg infekcji wirusem HCV może zakończyć się śmiercią, w 2019 roku na świecie około 300 000 osób zmarło w następstwie zakażenia, głównie z powodu marskości i raka wątrobowokomórkowego³⁹. Według szacunków Polaris Observatory Study, z powodu HCV w Polsce umiera ok. 670 osób rocznie⁴⁰.

4.5.1 Drogi zakażenia, dotknięte populacje

Ze względu na późne rozpoznanie zakażeń HCV, ustalenie drogi którą doszło do zakażenia pacjenta, często jest utrudnione. Do zakażenia dochodzi najczęściej poprzez ponowne użycie lub nieodpowiednią sterylizację sprzętu medycznego, zwłaszcza strzykawek i igieł w placówkach służby zdrowia; przetaczanie krwi i produktów krwiopochodnych niepoddawanych badaniom przesiewowym oraz wstrzykiwanie narkotyków przy wspólnym korzystaniu ze sprzętu do iniekcji. Dodatkowo, do mniej powszechnych metod transmisji wirusa można zaliczyć przeniesienie HCV z zakażonej matki na dziecko, praktyki seksualne, które prowadzą do kontaktu z krwią oraz wewnątrzrodzinną transmisję wirusa. Co istotne, grupy podwyższonego ryzyka zakażeniem HCV są ściśle związane z rejonem, w którym prowadzi się badanie epidemiologiczne. W krajach o wysokim i średnim dochodzie zażywanie narkotyków drogą iniekcyjną jest główną przyczyną przenoszenia HCV. Natomiast w krajach o niskim dochodzie głównym czynnikiem ryzyka nowych infekcji są zabiegi medyczne przeprowadzane w ośrodkach ochrony zdrowia³⁹.

4.5.2 Terapie zakażeń HCV

Intensywne badania nad HCV pozwoliły na dokładniejsze poznanie biologii wirusa i w efekcie doprowadziły do odkrycia nowych leków działających bezpośrednio na białka zaangażowane w cykl replikacyjny HCV (ang. Direct acting antivirals - DAAs) (Tab. 1). Terapia DAA jest skuteczna w przypadku zakażeń wszystkimi genotypami wirusa, prowadzi do eliminacji zakażenia u ponad 90% pacjentów, trwa zazwyczaj 8-12 tygodni, a leczenie za pomocą doustnych leków jest obciążone znacząco mniejszą ilością skutków ubocznych w porównaniu z wcześniej używanymi terapiami opartymi na interferonie i ribawirynie¹⁰. Co więcej, terapia DAA może być prowadzona nawet u osób z zaawansowaną chorobą wątroby, biorców przeszczepu, pacjentów z niewydolnością nerek czy współzakażonych wirusem HBV i/lub HIV.

Tabela 1.

Nazwa <i>Nazwa handlowa</i>	Mechanizm działania	Genotypy HCV
Elbasvir-grazoprevir (<i>Zepatier</i>)	Elbasvir: inhibitor NS5A Grazoprevir: inhibitor NS3/4A	1 oraz 4
Glecaprevir-pibrentasvir (<i>Mavyret</i>)	Glecaprevir: inhibitor NS3/4A Pibrentasvir: inhibitor NS5A	1- 6
Sofosbuvir (<i>Sovaldi</i>)	Sofosbuvir: inhibitor NS5B	1,2,3 oraz 4 (1-6)
Sofosbuvir-ledipasvir (<i>Harvoni</i>)	Sofosbuvir: inhibitor NS5B Ledipasvir: inhibitor NS5A	1, 4, 5 oraz 6 (1-6)
Sofosbuvir-velpatasvir (<i>Epclusa</i>)	Sofosbuvir: inhibitor NS5B Velpatasvir: inhibitor NS5A	1-6
Sofosbuvir-velpatasvir- voxilaprevir (<i>Vosevi</i>)	Sofosbuvir: inhibitor NS5B Velpatasvir: inhibitor NS5A Voxilaprevir: inhibitor NS3/4A	1-6

Tabela 1. Bezinterferonowe terapie zakażeń HCV. Źródła:

EMA - <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human>

Hepatitis C online - <https://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment>

4.6 Czy szczepionki przeciwko HCV są potrzebne?

Leki DAA okazały się tak skuteczne, że niektórzy zadają sobie pytanie, czy możliwa jest kontrola zakażeń lub nawet eliminacja HCV za pomocą samych terapeutyków i czy dalsze badania nad biologią wirusa i szczepionkami profilaktycznymi mają w obecnej sytuacji znaczenie medyczne.

4.6.1 Koszt terapii

Jedną z największych przeszkód w powszechnym dostępie do terapii opartej na DAA jest znaczący koszt. Początkowo, gdy leki były wprowadzane na rynek w Stanach Zjednoczonych, cena leczenia wynosiła około 50-100 tysięcy dolarów za pełen cykl podawania leków⁴¹. Od tego czasu koszty leczenia stale spadają i obecnie wynoszą poniżej 25 tysięcy dolarów w Stanach Zjednoczonych i około 35-60 tysięcy złotych w Polsce⁴¹⁻⁴³. Firmy farmaceutyczne produkujące DAA stale obniżają ceny terapii w krajach o niskich dochodach, jednocześnie negocjując znacząco wyższe ceny w krajach o wysokich dochodach. W Pakistanie wprowadzenie leków generycznych na licencji producenta obniżyło koszt pełnej terapii jednego pacjenta do 60 dolarów⁴⁴. Choć w przyszłości ceny DAA będą spadać, to obecnie koszt jest jednym z czynników uniemożliwiających wprowadzenie np. proponowanych terapii prewencyjnych w grupach wysokiego ryzyka zakażenia HCV.

4.6.2 Diagnostyka osób zakażonych

Osoby przewlekle zakażone HCV pozostają bezobjawowe przez kilka lat przed pojawieniem się objawów swoistych dla infekcji. Do końca 2019 roku na świecie ze zdiagnozowaną infekcją HCV żyło około 15,2 milionów ludzi, co szacunkowo stanowiło około 21% wszystkich zakażonych³⁹. W tym samym roku około 9,4 milionów zdiagnozowanych pacjentów było leczonych DAA³⁹. W Unii Europejskiej aktualne wytyczne zalecają badania przesiewowe w okresie ciąży i wśród osób z grup wysokiego ryzyka wykonywane podczas rutynowych badań lekarskich. Ta strategia odniosła sukces we Francji, gdzie odsetek osób przewlekle zakażonych HCV znających swój status znacząco się zwiększył i wynosi około 75%⁴⁵. Dla porównania w Polsce poziom wykrywalności zakażenia HCV wynosi około 10%^{40,46}. Podstawowy algorytm diagnostyczny opiera na dwóch badaniach. Pierwszym z nich jest określenie obecności przeciwciał anti-HCV, w przypadku pozytywnego wyniku konieczne jest wykonanie badania na obecność materiału genetycznego wirusa w celu potwierdzenia aktywnego zakażenia. Jednym z największych wyzwań w kontroli zakażeń HCV jest rozpowszechnienie dostępu do testów oraz obniżenie kosztów diagnostyki, szczególnie testów molekularnych opartych na metodzie RT-PCR. Takie badania są kosztowne, wymagają specjalistycznego sprzętu i

przeszkolonej kadry, a ich cena w krajach o niskich dochodach może przekraczać cenę terapii opartej na DAA^{44,47}.

4.6.3 Reinfekcje

DAA bardzo skutecznie eliminują wirusa, ale nie zapobiegają ponownym zakażeniom i przejściu w fazę chroniczną. Badania wykazały, że ryzyko reinfekcji HCV wynosi 10-15% w okresie 5 lat po ukończeniu terapii DAA⁴⁸. Ryzyko reinfekcji jest szczególnie duże w grupach podwyższonego ryzyka np. osób przyjmujących narkotyki drogą dożylną, wśród których wskaźnik rozpowszechnienia HCV może sięgać nawet 65%⁴⁹. Sytuacja wygląda podobnie w krajach o niskich dochodach, gdzie HCV przenosi się przez ryzykowne praktyki medyczne lub przez transmisję wewnątrz społeczności. W tych populacjach ryzyka reinfekcji prawdopodobnie można uniknąć jedynie poprzez wprowadzenie szczepień profilaktycznych.

4.6.4 Rak wątrobowokomórkowy

Chroniczna infekcja HCV jest jednym z czynników predestynującym wystąpienie raka wątrobowokomórkowego (z ang. hepatocellular carcinoma – HCC), który jest trzecią najczęstszą przyczyną zgonów spowodowanych nowotworami⁵⁰⁻⁵². Zmniejszenie ryzyka wystąpienia HCC po skutecznej terapii bazującej na interferonie zostało odnotowane w wielu retrospektywnych badaniach^{53,54}. Podobną zależność zaobserwowano dla terapii przy użyciu DAA⁵⁵⁻⁵⁷. Jednak, zachorowalność na HCC po terapii HCV zależy od stopnia zaawansowania uszkodzeń wątroby w momencie rozpoczęcia leczenia i utrzymuje się na wyższym poziomie zwłaszcza wśród pacjentów z zaawansowanym zwłóknieniem, marskością wątroby lub z chorobami współistniejącymi⁵⁶.

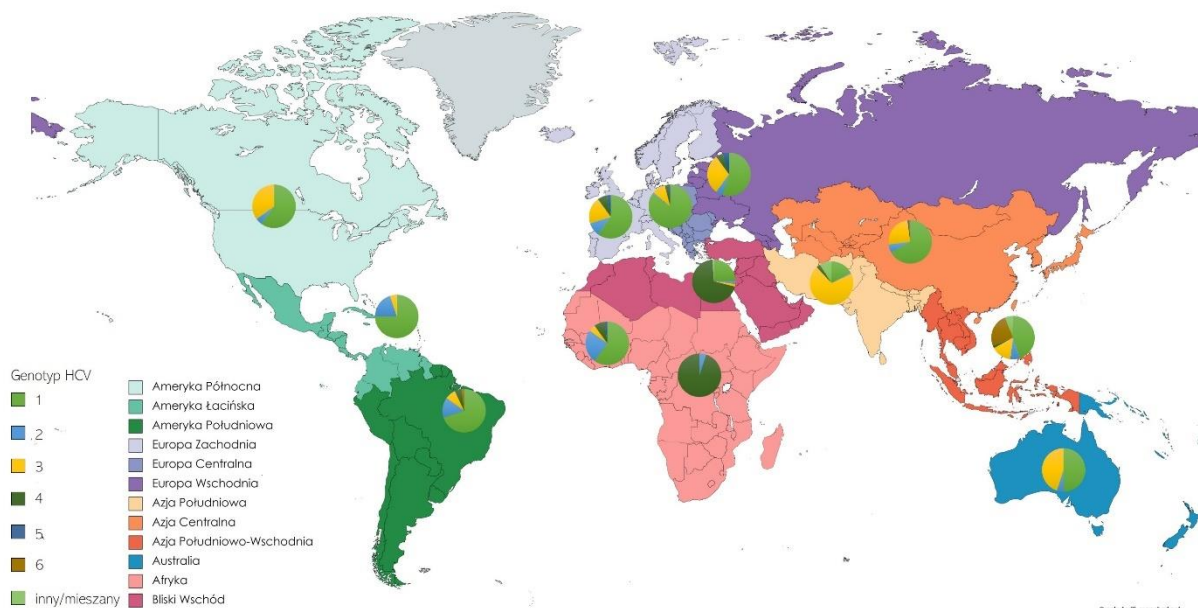
4.6.5 Selekcja wariantów HCV opornych na leczenie DAA

Niepowodzenie terapii za pomocą DAA jest właściwie zawsze związane z pojawieniem się wariantów HCV posiadających mutacje związane z opornością na lek (z ang. resistance associated variants – RAVs). Takie warianty mogą krążyć w organizmie pacjenta przed rozpoczęciem leczenia lub też zostać wyselekcjonowane podczas terapii DAA⁵⁸. Chociaż negatywny wpływ RAVs na wynik terapii można najczęściej przezwyciężyć poprzez wydłużenie czasu leczenia lub optymalizację składu DAA, to w skali epidemiologicznej ucieczka przed terapią może doprowadzić do selekcji RAVs jako powszechnie obecnych wariantów wirusa HCV w populacji^{59,60}. Dodatkowo, chociaż w tym momencie odsetek osób, wśród których terapia z użyciem DAA doprowadziła do pojawienia się RAVs, wynosi około 2%, to przy skali zakażeń HCV liczba pacjentów wymagających ponownego leczenia będzie wzrastała⁶¹.

Niezwykły sukces terapii opartej na DAA jest jednym z powodów dla których WHO przyjęła globalną strategię, która miała doprowadzić do łącznego zmniejszenia o 90% zachorowalności na wirusowe zapalenie wątroby typu B i C oraz do 65% redukcji śmiertelności spowodowanej przez te wirusy⁶². Na początku 2020 roku na całym świecie odnotowano około 58 mln zakażeń wirusem HCV i chociaż liczba ta oznacza spadek o 6,8 miliona w porównaniu z rokiem 2015, prognozy przeprowadzone przez grupę Polaris Observatory HCV Collaborators sugerują, że planowany spadek ilości zakażeń w skali globalnej do roku 2030 prawdopodobnie nie zostanie osiągnięty³⁷. Obecnie jedynie dwa czynniki chorobotwórcze uznano za eradykowane – wirus ospy prawdziwej oraz wirus pomoru bydła (księgosusz), w obu przypadkach kluczowym czynnikiem umożliwiającym eradykację były szczepionki⁶³. Z tego powodu większość osób zajmujących się zagadnieniem zakażeń wirusem HCV jest zgodna, że opracowanie szczepionki chroniącej przed zakażeniem HCV znacząco przyczyniłoby się do redukcji liczby zakażeń i zgonów, a dodatkowo byłoby znacząco tańsze w porównaniu z alternatywnymi sposobami kontroli epidemii HCV^{64–68}.

4.6.6 Zmienność genetyczna HCV

Jedną z największych przeszkód w opracowaniu skuteczniejszej szczepionki chroniącej przed infekcją HCV jest niezwykła zmienność genetyczna wirusa. Możemy wyróżnić 6 głównych genotypów HCV o znaczeniu klinicznym. Genotyp 1 dominuje w rejonach takich jak Europa, Ameryki, Azja i Australia. Genotyp 2 występuje głównie w Afryce subsaharyjskiej i Azji Wschodniej, Genotyp 3 odpowiada za większość zakażeń w rejonach szczególnie dotkniętych epidemią HCV takich jak Indie oraz Pakistan oraz występuje z dużą częstotliwością w Europie, Australii i Nowej Zelandii. Genotyp 4 dominuje w rejonach Bliskiego Wschodu oraz w krajach Afryki północnej – w szczególności w Egipcie. Genotypy 5 i 6 występują z niewielką częstotliwością i razem odpowiadają za mniej niż 5% wszystkich infekcji HCV. Genotyp 5 występuje z podwyższoną częstotliwością w Republice Południowej Afryki, a genotyp 6 w rejonie Azji południowowschodniej (Kambodża, Mjanma oraz Wietnam)⁶⁹. Dodatkowo w obrębie genotypów HCV można wyróżnić 93 subtypy. Najwięcej subtypów zostało wyszczególnionych wśród genotypu 6 – aż trzydzieści trzy, najmniej w genotypie 5 - zaledwie jeden⁷⁰. W skali globalnej genotyp 1a i 1b odpowiadają za blisko połowę wszystkich zakażeń HCV⁷¹, a połączone genotypy 1 oraz 3 stanowią blisko 70% wszystkich infekcji.



Rycina 4. Rozpowszechnienie genotypów HCV na świecie. Za: Polaris Observatory HCV Collaborators. "Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study." *The Lancet. Gastroenterology & hepatology* vol. 2,3 (2017): 161-176. doi:10.1016/S2468-1253(16)30181-9

W Polsce w wyniku badań prowadzonych w latach 2013-2016 pokazano, że zdecydowaną większość przypadków HCV w badanej grupie stanowią zakażenia genotypem 1b (ok. 80%), w następnej kolejności zakażenia genotypem 3, 4, 1a oraz genotypem 2. Zakażenia genotypami 5 i 6 należą do rzadkości i stanowiły tylko 0.1% wszystkich zakażeń w badanej grupie⁷².

Dodatkowo, w przebiegu infekcji HCV następuje różnicowanie się tak zwanych pseudogatunków (z ang. quasispecies). Szybkie tempo mutacji genomu wirusowego skutkuje powstaniem zróżnicowanej populacji HCV w obrębie zainfekowanego organizmu, a stale towarzysząca presja ze strony układu immunologicznego powoduje selekcję wariantów wirusa posiadających przewagę ewolucyjną nad resztą wariantów i w przebiegu infekcji stają się one wariantami dominującymi^{73,74}.

Pomimo intensywnie prowadzonych badań, zarówno klinicznych jak i podstawowych, nad odpowiedzią immunologiczną wzbudzaną podczas zakażenia wirusem HCV elementy kluczowe dla skutecznej ochrony przed zakażeniem nadal nie są znane. Wiadomo jednak, że prócz zróżnicowania genetycznego, istnieje kilka innych mechanizmów pozwalających wirusowi HCV na unikanie odpowiedzi ze strony układu immunologicznego.

4.7 Odpowiedź komórkowa

Silna odpowiedź komórkowa celująca w wiele epitopów pochodzących z wirusa HCV może być jednym z kluczowych czynników w procesie eliminacji wirusa z zakażonego organizmu i może odgrywać kluczową rolę podczas tworzenia szczepionki chroniącej przed chronicznym zakażeniem HCV. Badania prowadzone na ludziach i szympanсах podkreślają ważną rolę odpowiedzi komórkowej opartej na limfocytach CD8⁺ oraz CD4⁺ w kontroli zakażenia HCV. Zakażenie HCV w szympanсах pozbawionych CD8⁺ lub CD4⁺ prowadziło do powstania trwałej wirerii i zmian chorobowych w wątrobach zakażonych zwierząt^{75,76}.

Co ciekawe, swoista odpowiedź limfocytów CD4⁺ i CD8⁺ przeciwko HCV, zarówno w zakażeniach samoistnie ustępujących jak i w zakażeniach przechodzących w fazę chroniczną pojawia się dość późno, około 6-10 tygodni po zakażeniu⁷⁷⁻⁸⁰. Nie jest do końca jasne, czy kinetyka odpowiedzi ma wpływ na przebieg choroby, ale potencjalna szczepionka powinna umożliwić znacznie wcześniejszą odpowiedź limfocytów T na infekcję, co mogłoby zapewnić kluczową przewagę w procesie zwalczania zakażenia.

4.7.1 Limfocyty CD4⁺

Jedną z cech charakterystycznych dla chronicznego zakażenia HCV jest brak proliferacji limfocytów CD4⁺ swoistych dla HCV oraz ich zanikanie w przebiegu zakażenia⁸¹⁻⁸³. Z drugiej strony, w przebiegu samoograniczającej się infekcji HCV identyfikuje się wiele antygenów HCV indukujących proliferację CD4⁺ *in vitro*, a testy te pozostają pozytywne przez lata po ustąpieniu infekcji⁸¹. Nie wiadomo, jaki mechanizm prowadzi do osłabienia odpowiedzi limfocytów CD4⁺, ale w przypadku stworzenia szczepionki opartej na odpowiedzi komórkowej kluczowym będzie wzbudzenie i utrzymanie odpowiedzi komórkowej opartej na limfocytach CD4⁺ specyficznych wobec antygenów HCV.

4.7.2 Limfocyty CD8⁺

Podobnie jak w przypadku limfocytów CD4⁺, silna i szeroko zakrojona odpowiedź CD8⁺ została zaobserwowana w przebiegu zakażenia o charakterze samoograniczającym się. Podobnie jak w przypadku odpowiedzi CD4⁺, silną odpowiedź CD8⁺ obserwowano w przypadku choroby samoograniczającej. Jednak jeśli pacjentów badano w ciągu pierwszych 6 miesięcy od zakażenia HCV, podobnie silną odpowiedź CD8⁺ można było zaobserwować u pacjentów z chronicznym przebiegiem infekcji^{77,84,85}. Limfocyty CD8⁺ rozpoznające HCV występują w większej ilości w porównaniu z komórkami CD4⁺, z tego powodu mechanizmy i dynamika odpowiedzi opartej na limfocytach CD8⁺ są lepiej poznane.

Wyróżnia się dwa mechanizmy zaangażowane w unikanie odpowiedzi immunologicznej CD8⁺ w chronicznym przebiegu HCV. Jednym z nich jest pojawienie się wariantów wirusa niosących

zmiany w epitopach będących celem dla limfocytów CD8+, które skutkują brakiem odpowiedzi ze strony komórek swoistych względem epitopu⁸⁶⁻⁸⁸.

Innym istotnym mechanizmem, ograniczającym skuteczność odpowiedzi limfocytów T w chronicznej infekcji HCV, jest tak zwane „wyczerpanie” limfocytów CD8+, proces ten charakteryzuje się narastającą niezdolnością komórek do wykonywania funkcji efektorowych, a na jej końcowym etapie apoptozą populacji limfocytów T swoistych dla HCV^{89,90}. Coraz więcej badań sugeruje, że zarówno wewnętrzne szlaki sygnalizacyjne (takie jak aktywacja receptorów hamujących aktywność limfocytów T), jak również zewnętrzne szlaki regulacyjne (np. cytokiny immunoregulacyjne oraz aktywność limfocytów T regulatorowych) biorą udział w procesie wyczerpania limfocytów T. Co ciekawe, wyczerpanie odpowiedzi cytotoksycznej jest odpowiedzialne nie tylko za utrzymanie wirerii, ale może również ograniczać immunopatologię związaną z HCV^{91,92}. Wykazano, że w przebiegu infekcji HCV swoiste dla wirusa limfocyty T CD8+ mogą ekspresować różne kombinacje receptorów hamujących aktywność tych komórek, między innymi PD-1, CTLA-4, CD160, TIM-3, CD244 oraz KLRG1⁹³⁻⁹⁵. Podczas chronicznej infekcji ciągła stymulacja limfocytów CD8+ swoistym dla nich antygenem prowadzi do zwiększenia ilości receptorów i w efekcie do wyczerpania odpowiedzi komórkowej. W przypadku zewnętrznych szlaków sygnalizacyjnych kluczową rolę pełnią cytokiny regulujące aktywność limfocytów, przede wszystkim IL-10 oraz limfocyty regulatorowe CD4+Foxp3+, które hamują aktywność limfocytów CD8+, a w przypadku przedłużonej obecności swoistych antygenów mogą prowadzić do wygaszenia odpowiedzi komórkowej^{92,96-100}. Ograniczenie aktywności cytotoksycznej limfocytów T jest szczególnie widoczne w miejscu rozwoju wirerii - wątrobie, gdzie stężenie antygeny jest największe i gdzie funkcjonuje wiele mechanizmów immunosupresyjnych, dodatkowo regulujących funkcje limfocytów T CD8+^{91,92,100,101}.

4.8 Odpowiedź humoralna

Odpowiedź układu immunologicznego oparta na produkcji przeciwciał neutralizujących (z ang. neutralizing antibodies - nAb) jest kluczowym elementem obrony organizmu w przebiegu infekcji wirusowej. Większość dostępnych szczepionek chroniących przed zakażeniami wirusowymi ma na celu wzbudzenie właśnie odpowiedzi nAb^{102,103}.

Rola przeciwciał neutralizujących w zakażeniu HCV nie jest do końca jasna. Z jednej strony wiadomo, że odpowiedź nAb nie jest niezbędna do usunięcia wirusa¹⁰⁴, jednak wiele badań wykazało, że nAb mogą odgrywać istotną rolę w kontroli i zwalczaniu infekcji HCV. W

badaniach na grupie kobiet zakażonych tym samym szczepem wirusa HCV pokazano, że istnieje silna korelacja pomiędzy usunięciem wirusa, a wzbudzeniem nAb w początkowej fazie zakażenia HCV¹⁰⁵. Podobne wnioski zostały opisane w innych pracach, gdzie pojawienie się przeciwciał o szerokim spektrum neutralizacji korelowało z samoistnie ustępującym zakażeniem HCV¹⁰⁶. Co ciekawe, istnieją także doniesienia, że u pacjentów z rozpoznanym chronicznym zakażeniem HCV, pojawienie się nAb korelowało ze zwalczeniem infekcji, co może dawać nadzieję, że szczepionka wzbudzająca silną odpowiedź nAb może mieć działanie terapeutyczne¹⁰⁷. Podobne wyniki otrzymano w przypadku biernej immunizacji w modelu zwierzęcym, gdzie podanie zakażonym szympanom surowicy lub nAb znacząco obniżało poziom wirerii, a podanie nAb chimerycznym myszom z przeszczepem ludzkiej wątroby zakażonych HCV prowadziło do eliminacji wirerii^{108,109}. Te badania potwierdzają zdolność odpowiedzi humoralnej do kontroli zakażenia i zapobiegania chronicznemu zapaleniu wątroby wywołanemu przez HCV. Badanie przeprowadzone na osobach przyjmujących narkotyki drogą dożylną pokazało, że w przypadku reinfekcji osób, które spontanicznie pozbyły się wirusa w przebiegu pierwszej infekcji, procent osób ponownie zwalczających wirusa sięgał 83% i był ok. 3-krotnie większy niż odsetek zaobserwowany podczas infekcji pierwotnej¹¹⁰. Dodatkowo z surowicy pacjentów można było wyizolować przeciwciała zdolne do neutralizacji heterologicznych szczepów HCV, takie przeciwciała nie są zazwyczaj obecne w surowicy pacjentów zakażonych chronicznie¹¹⁰. Przewaga szczepionek wzbudzających odpowiedź humoralną nad szczepionkami celującymi w odpowiedź komórkową polega na zdolności wzbudzenia tzw. odporności sterylizacyjnej, w wyniku której po wniknięciu cząsteczek wirusowych do organizmu są one natychmiast wiązane przez przeciwciała neutralizujące. W związku z tym nie dochodzi do replikacji wirusa, a w obrazie klinicznym nie widać wzrostu poziomu wirerii.

W innym badaniu bierny transfer immunoglobulin poliklonalnych z surowicy chronicznie zakażonego dawcy zapobiegał zakażeniu chimerycznych myszy z przeszczepem ludzkiej wątroby zarówno przez homologiczne, jak i heterologiczne szczepy HCV^{111,112}. Podobne wyniki uzyskano dla szympanów, u których podanie IgG anti-HCV zapobiegało zakażeniu wirusem ze szczepu homologicznego, ale nie heterologicznego¹¹³. Potencjalną zdolność nAb do zapobiegania zakażeniu HCV potwierdzają także retrospektywne badania na biorcach przeszczepu wątroby. Badanie wykazało, że podanie surowicy z immunoglobulinami skierowanych przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B pacjentom zakażonych HCV zmniejsza reinfekcję przeszczepu przez HCV¹¹⁴. Badacze wysunęli hipotezę, że użyta surowica była dodatkowo zanieczyszczona przeciwciałami anti-HCV. Co ciekawe, pacjenci niezakażeni

HCV poddawani przeszczepowi i leczeni tą samą surowicą wykazywali znacząco mniejszą częstotliwość zakażeń HCV¹¹⁴.

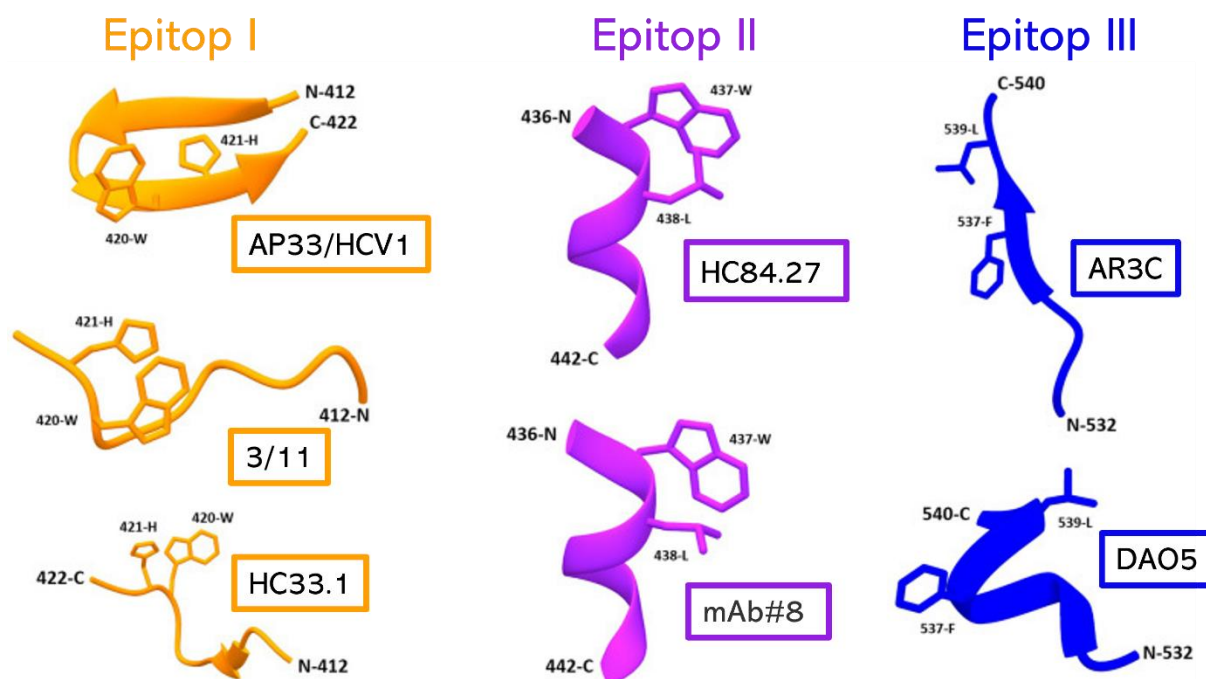
Powyższe badania sugerują, że silna odpowiedź immunologiczna oparta na przeciwciałach może przynajmniej częściowo kontrolować infekcję HCV a odpowiedź sterylizująca jest możliwa do osiągnięcia, jeżeli indukowane przeciwciała będą występować w odpowiednio wysokim stężeniu i będą zdolne do neutralizacji wielu szczepów HCV.

4.9 Mechanizmy ucieczki przed przeciwciałami neutralizującymi

Głównym celem dla przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko HCV jest heterodimer glikoprotein E1E2 pośredniczący w procesie wejścia HCV do komórek gospodarza. nAb blokują oddziaływanie glikoprotein E1E2 z receptorami wejścia, uniemożliwiając HCV wnikanie do komórek w procesie nazywanym neutralizacją wirusa. Podobnie jak w przypadku odpowiedzi komórkowej, obserwuje się wiele mechanizmów umożliwiających przetrwanie HCV w obecności przeciwciał neutralizujących. HCV krąży w zakażonym organizmie jako pula pseudogatunków, różniących się genetycznie i antygenowo. Takie warianty w wyniku presji immunologicznej stale ewoluują, co prowadzi do selekcji mutantów, które nie są neutralizowane przez krążące w zakażonym organizmie nAb^{73,115,116}. Większość zmian powstałych podczas ucieczki przed przeciwciałami jest akumulowana w sekwencji glikoprotein E1E2, będących głównym celem odpowiedzi humoralnej i prowadzi do uniknięcia odpowiedzi immunologicznej gospodarza¹¹⁷. Przykładem takich zmian mogą być mutacje w obrębie epitopu II – D431A, które prowadzą do utraty powinowactwa ze strony neutralizującego przeciwciała CBH-2¹¹⁸ lub mutacja W420R, w wyniku której zanika wiązanie z silnie neutralizującym przeciwciałem AP33^{119,120}.

4.9.1 Zmiana konformacji w obrębie epitopów

Konserwowane epitopy uczestniczące w wiązaniu receptora wejścia CD81 wykazują niezwykle elastyczność konformacyjną, która umożliwia ucieczkę wirusa przed przeciwciałami o szerokim spektrum neutralizacji. Ryc. 5 pokazuje epitopy glikoproteiny E2 (I, II oraz III) przyjmujące różne konformacje po związaniu z przeciwciałami.



Rycina 5. Konformacje epitopów I, II i III w kompleksie z przeciwciałami.

Konformacje epitopu I: (górną) β -zwrot o strukturze szpilki do włosów (konformacja zamknięta) w kompleksie z nAb HCV1 (PDB: 4DGY); (środkowa) konformacja otwartej pętli w kompleksie z nAb 3/11 (PDB: 4WHY); (dolna) konformacja pętli półotwartej z antyrównoległą β -karką w kompleksie z nAb HC33.1 (PDB:4XVJ).

Konformacje epitopu II: (górną) krótka α -helisa w kompleksie z nAb HC84.27 (PDB: 4JZO); (dolna) krótka α -helisa w stanie otwartym w kompleksie z nAb mAb#8 (PDB: 4HZL).

Konformacje epitopu III: (górną) otwarta i ustabilizowana nić w konformacji β -karkki w kompleksie z przeciwciałem AR3C (PDB: 4MWF); (dolna) helikalna, nieuporządkowana konformacja w kompleksie z mAb DAO5 (PDB: 5NPJ).

Rysunek modyfikowany źródło: Sepulveda-Crespo, Daniel et al. "Hepatitis C virus vaccine design: focus on the humoral immune response." *Journal of biomedical science* vol. 27,1 78. 6 Jul. 2020, doi:10.1186/s12929-020-00669-4

4.9.2 Ucieczka poprzez wprowadzanie zmian poza epitopem

Ucieczka przed przeciwciałami neutralizującymi poprzez wprowadzanie zmian w domenach położonych z dala od epitopu wiążącego dane przeciwciało jest dobrze poznanym mechanizmem występującym wśród wirusów. Złożona struktura glikoprotein powierzchniowych E1E2 pozwala na pewną dynamikę w obrębie domen, a zmiana aminokwasu w jednym miejscu może mieć wpływ na konformację lub dostępność epitopów położonych z dala od miejsca zmiany. Przykładowo, zmiany w obrębie sekwencji

aminokwasowej HVR1 mogą wpływać na konformację i zdolność wiązania przeciwciał w obrębie epitopu I położonego w dalszej części glikoproteiny E2¹²¹. Podobnie, zmiany wprowadzone w obrębie rdzenia glikoproteiny E2 w pozycjach S501N oraz V506A mogą wpływać na konformację pętli wiążącej CD81 – w tym rejonu epitopu I oraz epitopu III¹²².

4.9.3 Mechanizm „przynęty dla przeciwciał”

Większość odpowiedzi opartej na przeciwciałach zarówno w ostrych jak i chronicznych zakażeniach HCV jest skierowana przeciwko regionom hiperzmiennym zlokalizowanym w sekwencji glikoproteiny E2, a wirus pozbawiony rejonu HVR1 jest znacząco bardziej podatny na neutralizację. HVR znajdują się pod stałą presją ze strony układu immunologicznego i charakteryzują się zdolnością do wprowadzania i tolerowania dużej ilości zmian w sekwencji aminokwasowej. Przeciwciała przeciwko regionom HVR są zwykle swoiste dla danego wariantu wirusa i często nie mają właściwości neutralizujących²³. Ta immunodominacja rejonów HVR połączona z ich zdolnością do unikania odpowiedzi immunologicznej poprzez ciągłe wprowadzanie zmian w rejonach wiążących przeciwciała jest opisywana jako mechanizm „przynęty dla przeciwciał”. Mechanizm ten chroni bardziej konserwowane rejony glikoproteiny E2 niezbędne do wiązania receptorów wejścia HCV i pomaga w ucieczce wirusa przed przeciwciałami neutralizującymi^{123–125}.

4.9.4 Glikozylacja heterodimeru E1E2

Zarówno E1 jak i E2 są silnie glikozylowanymi białkami, posiadającymi odpowiednio 4-5 oraz 9-11 miejsc glikozylacji. Glikany pełnią istotną rolę w procesie wejścia wirusa do komórki, podczas którego reszty cukrowe oddziałują z lektynami na powierzchni nabłonka w obrębie wątroby, zagęszczając cząsteczki HCV przed procesem wejścia do hepatocytów^{126,127}. Istnieje kilka modeli tłumaczących rolę N-glikozylacji E1E2 w ucieczce przed odpowiedzią humoralną. Najprostszym z nich jest tak zwana „tarcza glikanowa”, która pełni rolę sterycznej przeszkody w wiązaniu przeciwciał do epitopu w obrębie glikoproteiny. Charakterystyka mutantów N-glikozylacji w zakażeniach HCV w hodowli komórkowej (cell culture derived HCV – HCVcc) wykazała, że co najmniej pięć glikanów (E2N1, E2N2, E2N4, E2N6 oraz E2N11) zmniejsza wrażliwość wirusa na przeciwciała neutralizujące wiążące się w miejscu oddziaływania glikoproteiny E2 z receptorem CD81, jednak nie mają one wpływu na rozpoznawanie epitopów znajdujących się w obrębie HVR1¹²⁸. Następnym mechanizmem jest przesunięcie miejsca glikozylacji (z ang. glycan shift), który został opisany jako mechanizm ucieczki przed presją ze strony silnie neutralizujących przeciwciał wiążących się w obrębie epitopu I glikoproteiny E2. Przesunięcie glikanu E2N1 z pozycji N417 do N415 prowadzi do utraty powinowactwa przez

silnie działające przeciwciała o szerokim spektrum neutralizacji takie jak AP33 czy HCV1^{126,129}. Przeciwciała te wiążą epitop I w konformacji β -zwrotu (z ang. β -hairpin), w którym łańcuchy boczne glikanu E2N1 w pozycji N417 są skierowane w kierunku od przeciwciała, jednak w przypadku przesunięcia miejsca glikozylacji w pozycję N415 łańcuch boczny tworzy steryczną przeszkodę uniemożliwiającą wiązanie przeciwciał¹²⁹.

4.9.5 „Oddychanie” glikoprotein E1E2

Ostatnio przeprowadzone badania podważają model bezpośredniego, sterycznego osłaniania epitopów przez glikany. Badania sugerują, że ochronne działanie glikanów może polegać na modulowaniu dostępu do epitopów poprzez wpływanie na stabilność konformacji glikoprotein E1E2 i jej zmianę między konformacją zamkniętą (odporną na neutralizację) i otwartą (wrażliwą na neutralizację). Dodatkowo zauważono, że usunięcie rejonu HVR1 prowadziło do trwałego przesunięcia konformacji do pozycji otwartej, niezależnie od statusu glikozylacji E1E2¹³⁰.

Model ten, choć nie do końca dobrze poznany, podkreśla niezwykłą plastyczność glikoprotein E1E2 oraz epitopów biorących udział w wiązaniu receptorów wejścia, rolę N-glikozylacji oraz immunodominujących rejonów hiperzmiennych.

4.9.6 Inne mechanizmy

Jeszcze innym mechanizmem unikania przez HCV przeciwciał neutralizujących jest jego zdolność do rozprzestrzeniania się poprzez bezpośrednią transmisję z komórki do komórki¹³¹. HCV rozprzestrzenia się przez przestrzenie międzykomórkowe w formie cząsteczek lipowirusowych – kompleksu cząsteczek wirusowych oraz lipoprotein o małej lub bardzo małej gęstości pochodzących z komórek gospodarza¹³². Cząsteczki lipowirusowe HCV są podobne do naturalnie występujących cząsteczek lipidów o bardzo małej gęstości, w których większość białek wirusowych pozostaje przysłonięta przez lipoproteiny. Taka forma mimikry pozwala wirusowi na unikanie odpowiedzi ze strony przeciwciał neutralizujących^{133,134}. Dodatkowo, podczas produkcji HCV w hodowlach komórkowych zauważono, że komórki produkują cząsteczki lipidowe z zakotwiczoną glikoproteiną E2. Takie kompleksy mogą stanowić „przynętę dla przeciwciał” i podczas naturalnej infekcji obniżać poziom przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko zakaźnym cząsteczkom wirusowym¹³⁵.

Ponadto wykazano, że wyizolowane od pacjentów warianty HCV, u których nastąpiła ucieczka HCV przed układem immunologicznym, posiadają zwiększoną oporność na aktywność białek transbłonowych indukowanych przez interferon (z ang. Interferon-induced transmembrane proteins - IFITM) co wspomagało ucieczkę HCV przed nAb¹³⁶.

4.10 Modele zwierzęce w badaniach nad szczepionką

Brak modeli zwierzęcych dla zakażeń HCV, w których następowaloby wydajne namnażanie wirusa i skierowana byłaby przeciwko niemu swoista odpowiedź ze strony układu immunologicznego jest jedną z głównych przeszkód w prowadzeniu badań nad szczepionką HCV. HCV wykazuje ścisły tropizm gatunkowy dla ludzi, a jedynym naturalnym modelem zwierzęcym jest szympan, który nie jest obecnie dostępny do badań nad HCV z powodu ograniczeń etycznych.

Szympany odegrały kluczową rolę w badaniach nad odkryciem i charakterystyką czynnika zakaźnego powodującego zapalenie wątroby typu Nie-A-Nie-B, prowadzonych w latach 70 i 80 XX wieku, a długoterminowa obserwacja tych zwierząt potwierdziła możliwość przejścia infekcji HCV w fazę chroniczną¹³⁷⁻¹³⁹. Surowice pochodzące z szympanów zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu Nie-A-Nie-B doprowadziły do izolacji i identyfikacji HCV, do powstania testów umożliwiających wykrycie HCV w krwi pochodzącej od dawców oraz do opracowania terapii z wykorzystaniem DAA¹³⁹.

Aby wypełnić lukę po modelu szympanim, przez lata prowadzono badania nad opracowaniem modelu infekcji HCV opartego na małych zwierzętach. W tym celu powstało kilka szczepów myszy, które mogą podtrzymywać aktywną replikację HCV i w niektórych przypadkach można je wykorzystać do oceny odpowiedzi immunologicznej *in vivo*^{140,141}. Pierwszym modelem są myszy będące biorcami ksenoprzeszczepów ludzkich hepatocytów. Model ten podtrzymuje wysoki poziom replikacji wirusa i jest niezwykle cenny w badaniach nad wejściem HCV do komórek gospodarza oraz aktywnością leków antywirusowych. Jednak myszy poddawane przeszczepom mają upośledzony układ immunologiczny, co ogranicza ich zastosowanie w badaniach nad szczepionką HCV¹⁴¹. Innym podejściem jest wprowadzenie do mysich komórek genów kodujących ludzkie receptory wejścia dla HCV m. in. CD81 czy OCLN. Niewątpliwą zaletą tego systemu jest możliwość badania odpowiedzi immunologicznej w przebiegu infekcji HCV. Minusem jest jednak to, że transgeniczne myszy charakteryzują się niezwykle niskim poziomem replikacji wirusa¹⁴¹.

Biorąc pod uwagę wyzwania w opracowaniu zwierzęcego modelu infekcji HCV, rozsądnym rozwiązaniem wydaje się użycie jako modelu wirusa blisko spokrewnionego z HCV. Najbliższym krewnym HCV jest Hepacivirus innych niż naczelnie (z ang. non-primates hepacivirus - NPHV), który występuje w populacji koni domowych. Zakażenie NPHV koni może wywołać infekcję chroniczną prowadzącą do patologii wątroby¹⁴². Jednak koń nie jest łatwo dostępnym czy łatwym w pracy modelem zwierzęcym, co ogranicza jego ogólne

zastosowanie. W 2014 roku w wątrobie szczurów norweskich w Nowym Jorku odkryto wirusa Hepacivirus gryzoni (z ang. rodent hepacivirus - RHV), który charakteryzuje się wysokim podobieństwem do HCV¹⁴³. Zakażenie immunokompetentnych myszy laboratoryjnych¹⁴⁴ i szczurów¹⁴⁵ spowodowało silną hepatotropową infekcję wirusową. Choć w modelu mysim wirus ustępował samoistnie, to u szczurów pozostawała na wysokim poziomie, powodując zapalenie wątroby, pobudzenie odpowiedzi immunologicznej i dysfunkcję limfocytów T¹⁴⁵, co podkreśla użyteczność RHV w pracach nad szczepionką HCV.

Brak modeli zwierzęcych dla zakażenia HCV w połączeniu z dostępem do wysoko skutecznych terapii DAA podsyła dyskusje na temat modelu kontrolowanego zakażenia człowieka, który znacząco przyspieszyłby prace nad szczepionką HCV. W takich badaniach zdrowi ochotnicy zostaliby zaszczepieni eksperymentalną szczepionką lub placebo, a następnie zakażeni dobrze scharakteryzowanym szczepem HCV w celu oceny skuteczności immunogenu. Takie podejście ma wiele zalet, między innymi dlatego, że kandydatów na szczepionki HCV można byłoby szybko zidentyfikować pod kątem skuteczności w ściśle kontrolowanych warunkach, a następnie szybko przejść do dalszych testów w populacjach wysokiego ryzyka. Zminimalizowałyby to ogromne koszty finansowe i społeczne związane z prowadzeniem długoterminowych badań na populacjach wysokiego ryzyka, które bez wątpienia są wąskim gardłem w badaniach nad szczepionką. Pomimo potencjalnych zalet perspektywa modelu kontrolowanego zakażenia człowieka budzi wiele obaw zarówno natury etycznej jak i naukowej^{146,147}.

4.11 Badania nad szczepionką HCV

Przez lata wiele potencjalnych szczepionek przeciwko HCV mających wzbudzić odpowiedź humoralną i/lub komórkową zostało ocenionych pod kątem immunogenności w różnych modelach zwierzęcych⁶⁶. Podejścia szczepionkowe obejmowały immunizację inaktywowanym wirusem, całymi białkami wirusowymi, cząsteczkami wirusopodobnymi czy syntetycznymi peptydami. Testowano także preparaty oparte na DNA, RNA i rekombinowanych wektorach wirusowych. Tylko niewielka część szczepionek testowana w modelach przedklinicznych została przetestowana pod kątem ochrony przed zakażeniem w modelu szympansim a spośród tych, które wykazały pewien stopień skuteczności w zapobieganiu przewlekłej infekcji w szympaniach, tylko dwie przeszły do testów klinicznych. W tym momencie ze względu na brak modelu szympaniego droga do testów klinicznych nie jest do końca jasna.

Szczepionki indukujące odpowiedź ze strony limfocytów T są zwykle skoncentrowane na stosunkowo konserwowanych białkach HCV, takich jak niestrukturalne białka NS3, NS4 czy NS5 oraz na strukturalnym białku rdzenia. Jedną z bardziej obiecujących szczepionek była opracowana przez Okairos Corporation (obecnie GlaxoSmithKline) dwudawkowa szczepionka, w której w pierwszej dawce podawano wektor oparty na modyfikowanym adenowirusie szympansim niosącym sekwencje kodujące białka niestrukturalne HCV (ChAd3-NS). W drugiej dawce podawano wektor oparty na zmodyfikowanym wirusie krowianki ze szczepu Ankara (MVA-NS) z podobną kasetą zawierającą białka niestrukturalne wirusa HCV. Taki skład antygenów został po raz pierwszy przetestowany na szympanсах, u których immunizacja adenowirusem, po której podano dawkę przypominającą zawierającą plazmidowe DNA, indukowała długo utrzymującą się odpowiedź limfocytów T CD4+ i CD8+¹⁴⁸. Podanie szczepionki, a następnie zakażenie szympansov HCV spowodowało szybką aktywację odpowiedzi komórek T pamięci i znaczne zahamowanie ostrej fazy wirerii. Szczepionka ta została przetestowana na ochotnikach w pierwszej fazie badań klinicznych i wzbudziła silną odpowiedź swoistych dla HCV limfocytów CD4+ i CD8+¹⁴⁹. Po tym sukcesie szczepionka została przetestowana w drugiej fazie badań klinicznych na osobach z grup podwyższonego ryzyka zakażeniem HCV. Niestety, chociaż u większości zaszczepionych schemat szczepień stymulował odpowiedź limfocytów T swoistych dla HCV, nie zaobserwowano u nich profilaktycznego efektu działania szczepionki oraz zmniejszenia występowania przewlekłego zakażenia HCV³⁰. Przyczyny niepowodzenia tych długich i kosztownych badań klinicznych nie są do końca znane, ale mogą wskazywać na potrzebę szczepionki, która indukuje zarówno komórkową jak i humoralną odpowiedź immunologiczną.

Szczepionki mające na celu wywołanie odpowiedzi humoralnej oparte są na glikoproteinach E1, E2 lub heterodimerze E1E2, które są głównymi celami dla przeciwciał neutralizujących. W ramach tego podejścia, jak dotąd najbardziej zaawansowanym kandydatem jest rekombinowany heterodimer E1E2 pochodzący z genotypu 1a HCV podawany w obecności adjuwantu typu olej w wodzie – MF59. W badaniach prowadzonych na szympanсах pokazano działanie ochronne szczepionki podczas infekcji wirusem pochodzącym z homologicznego szczepu¹⁵⁰. Podczas zakażenia szczepem heterologicznym szczepionka nie zapewniała sterylizującej odporności, ale opóźniła początek wirerii i łagodziła przebieg infekcji w porównaniu z nieszczepionymi kontrolami¹⁵¹. W testach klinicznych fazy I prowadzonych na zdrowych ochotnikach pokazano, że szczepionka zawierająca heterodimer E1E2 w połączeniu z adjuwantem wykazywała wysoki profil bezpieczeństwa i indukowała odpowiedź przeciwciał neutralizujących o szerokim spektrum działania^{13,152,153}. Jednakże ze względu na trudności z

produkcją i oczyszczaniem heterodimeru E1E2 badania nie były kontynuowane w drugiej fazie badań klinicznych.

Podsumowując, idealna szczepionka HCV powinna indukować odpowiedź immunologiczną chroniącą przed zakażeniem lub przynajmniej przed przejściem infekcji w fazę chroniczną. Szczepionka powinna wzbudzać silną odpowiedź cytotoksyczną poprzez aktywację limfocytów CD8⁺ oraz CD4⁺, lecz równie istotne jest uzyskanie odpowiedzi ze strony przeciwciał neutralizujących o szerokim spektrum działania, które są niezbędne w osiągnięciu sterylizującej odpowiedzi immunologicznej i prawdopodobnie w zapobieganiu chronicznej infekcji HCV.

4.12 Częsteczki wirusopodobne

Jedną z metod wzbudzania silnej odpowiedzi immunologicznej jest wykorzystanie cząsteczek wirusopodobnych (z ang. virus-like particles – VLP). Powstawanie VLP opiera się na naturalnej zdolności białek wirusowych, zwykle białek powierzchniowych lub białek kapsydu, do spontanicznej samoorganizacji w nanostruktury o dobrze zdefiniowanej geometrii. VLP składają się z wielu kopii jednego lub więcej białek wirusowych i naśladują ogólną strukturę natywnych, zakaźnych cząsteczek wirusowych.

Ta wysoce uporządkowana struktura sprawia, że w kontekście odpowiedzi immunologicznej VLP prezentują się jako motywy wzorców molekularnych powiązanych z patogenami (z ang. pathogen-associated molecular patterns - PAMP). Ponieważ motywy te są unikalne dla czynników zakaźnych, układ odpornościowy ssaków silnie reaguje na VLP, aktywując receptory Toll-podobne (z ang. Toll-like receptors - TLR) oraz inne receptory rozpoznające wzorce (z ang. Pattern recognition receptors – PRR)¹⁵⁴. Ponadto, ze względu wysoce powtarzalną powierzchnię, VLP indukują silną odpowiedź humoralną poprzez bezpośrednią multimeryzację receptorów na powierzchni limfocytów B¹⁵⁵, która może prowadzić do aktywacji limfocytów B niezależnej od limfocytów T. Poza tym PAMP stymulują wychwytywanie antygenów przez komórki prezentujące antygen (z ang. antigen presenting cells - APC), szczególnie przez komórki dendrytyczne, i ułatwiają prezentację antygenów komórkom swoistej odpowiedzi immunologicznej¹⁵⁴. Ponieważ wychwytywanie antygenów jest procesem silnie zależnym od wielkości antygenów, APC są w stanie wychwytywać antygeny o wymiarach zbliżonych do wielkości patogenów (z optimum pomiędzy 20 a 200 nm), a komórki dendrytyczne optymalnie wychwytyują antygeny o średnicach około 40 nm^{156,157}. Ze względu na fakt, że VLP wykazują odpowiednią wielkość dla wychwytywania przez komórki prezentujące

antygen, a obecne na ich powierzchni PAMP ułatwiają aktywację swoistej odpowiedzi immunologicznej, VLP są często opisywane jako „samoadiuwantujące” systemy dostarczania immunogenu¹⁵⁸. W praktyce oznacza to, że w celu wywołania skutecznej odpowiedzi immunologicznej w szczepionkach VLP można użyć mniejszej ilości antygeny w stosunku do preparatów zawierających ten sam antygen w formie monomerycznej.

VLP charakteryzują się też dobrym profilem bezpieczeństwa, ponieważ cząsteczki nie zawierają wirusowego materiału genetycznego, co całkowicie znosi ryzyko związane z procesami replikacji, insercji, rewersji, rekombinacji lub reasortacji wirusa. Dodatkowo, szczepionki oparte na VLP można produkować bez konieczności namnażania zakaźnych wirusów, stąd kwestie bezpieczeństwa związane z bezpieczeństwem personelu czy ucieczką patogenego wirusa z zakładów produkcyjnych są wyeliminowane.

Obecnie w szczepieniach ludzi wykorzystywane są trzy szczepionki oparte na VLPs – pierwszą z nich jest szczepionka przeciwko HBV, oparta na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B (z ang. hepatitis B small surface antigen – sHBsAg) zatwierdzona przez amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków w 1986 roku¹⁵⁹. Wiele lata później akceptację uzyskała szczepionka przeciwko wirusowi brodawczaka ludzkiego (Human papillomavirus - HPV)¹⁶⁰. W ostatnim czasie do użytku w krajach Afryki subsaharyjskiej weszła długo wyczekiwana szczepionka chroniąca przed malarią – Mosquirix¹⁶¹. Szczepionka ta opiera się na fragmentach białka circumsporozoitowego w fuzji z białkiem sHBsAg, tworząc kompleks, który ulega koekspresji z nadmiarem sHBsAg w efekcie prowadząc do powstania VLP¹⁶².

sHBsAg jest jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek tworzących VLP¹⁶³. VLP zbudowane z sHBsAg mają średnicę około 20 nm i są powszechnie wykorzystywane jako komercyjna szczepionka chroniąca przed zakażeniem HBV^{159,163,164}. W przebiegu naturalnej infekcji HBV zbudowane z białka sHBsAg VLP, nazywanego czasami „antygenem australijskim”, są produkowane w zakażonych komórkach, a następnie uwalniane do przestrzeni międzykomórkowej¹⁶⁵. Takie VLP spełniają funkcję „przynęt” dla układu immunologicznego, prowadząc do wyczerpania komórek odpornościowych i wytworzenia tolerancji immunologicznej¹⁶⁵. Struktura białka sHBsAg tworzy dużą, hydrofilową pętlę zewnątrzkomórkową nazywaną determinantą „a”, zawierającą główne epitopy rozpoznawane przez limfocyty B. Pętla dobrze toleruje insercje obcych sekwencji oraz umożliwia ich skuteczną ekspozycję na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych¹⁶⁴. VLP oparte o białko sHBsAg są często wykorzystywane do prezentowania obcych antygenów, w tym antygenów

pochozących z wirusów grypy, flawiwirusów, HIV, SARS-CoV2 czy wspomnianego powyżej zarodźca malarii^{162,166–168}.

Ze względu na zdolność VLP opartych na sHBsAg do wzbudzania silnej odpowiedzi immunologicznej, cząsteczki były wykorzystywane do ekspozycji sekwencji pochodzących z HCV, w tym rejonu HVR1 wyeksponowanego na pętli zewnątrzkomórkowej sHBsAg oraz skróconych form białek E1 oraz E2 w fuzji z białkiem sHBsAg^{169–172}. Jak wspomniano powyżej, rejon HVR1 charakteryzuje się dużą immunogennością, ale skierowane przeciwko niemu przeciwciała są albo nieneutralizujące, albo neutralizują tylko szczepy homologiczne. Glikoproteiny E1 oraz E2 są potencjalnie dobrymi antygenami, mogącymi wzbudzać silną odpowiedź przeciwciał neutralizujących, ale VLP powstałe w wyniku fuzji białka sHBsAg z glikoproteinami HCV wzbudzały przeciwciała zdolne do neutralizacji tylko wąskiej grupy izolatów HCV.

Alternatywnym podejściem jest stworzenie szczepionki, w której immunogenami będą silnie konserwowane epitopy pochodzące z glikoproteiny E2 HCV odpowiedzialne za wiązanie receptora wejścia dla HCV – CD81, a więc będących celem dla przeciwciał neutralizujących. Ogólnie rzecz biorąc, szczepionki oparte na krótkich fragmentach białek np. syntetycznych peptydach są słabo immunogenne, co zostało pokazane w badaniu immunogenności cyklicznego wariantu epitopu I glikoproteiny E2 gdzie wzbudzone przeciwciała słabo wiązały się do kompleksu E1E2 i nie neutralizowały wirusa *in vitro*¹⁷³. Z tego względu uznaje się, że krótkie fragmenty białek np. epitopy I, II i III glikoproteiny E2 wykorzystywane jako immunogeny wymagają zwiększenia masy molekularnej i multimeryzacji poprzez połączenie z nośnikami np. VLP.

5. Literatura:

1. Feinstone, S. M., Kapikian, A. Z., Purcell, R. H., Alter, H. J. & Holland, P. V. Transfusion-Associated Hepatitis Not Due to Viral Hepatitis Type A or B. *New England Journal of Medicine* **292**, 767–770 (1975).
2. Houghton, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* **51**, 939–948 (2009).
3. Choo, Q.-L. *et al.* Isolation of a cDNA cLone Derived from a Blood-Borne Non-A, Non-B Viral Hepatitis Genome. *Science* **244**, 359–362 (1989).
4. Kato, T. *et al.* Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient*. *Journal of Medical Virology* **64**, 334–339 (2001).
5. Lindenbach, B. D. *et al.* Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* **309**, 623–626 (2005).
6. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2020. *NobelPrize.org* <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2020/summary/>.
7. Simmonds, P. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **98**, 2–3 (2017).
8. Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle – An update. *Journal of Hepatology* **61**, S3–S13 (2014).

9. Lindenbach, B. D. & Rice, C. M. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* **11**, 688–700 (2013).
10. Hepatitis C Online. <https://www.hepatitisc.uw.edu/>.
11. Mahmoudvand, S., Shokri, S., Taherkhani, R. & Farshadpour, F. Hepatitis C virus core protein modulates several signaling pathways involved in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* **25**, 42–58 (2019).
12. The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly - PMC. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3897199/>.
13. Frey, S. E. *et al.* Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* **28**, 6367–6373 (2010).
14. Sepulveda-Crespo, D., Resino, S. & Martinez, I. Hepatitis C virus vaccine design: focus on the humoral immune response. *Journal of Biomedical Science* **27**, 78 (2020).
15. Frontiers | Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.01411/full>.
16. El Omari, K. *et al.* Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nat Commun* **5**, 4874 (2014).
17. Kong, L. *et al.* Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1 antigenic site 314–324 in complex with antibody IGH526. *J Mol Biol* **427**, 2617–2628 (2015).
18. Meunier, J.-C. *et al.* Isolation and Characterization of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to the E1 Glycoprotein of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology* **82**, 966–973 (2008).
19. Keck, Z.-Y. *et al.* Human monoclonal antibody to hepatitis C virus E1 glycoprotein that blocks virus attachment and viral infectivity. *J Virol* **78**, 7257–7263 (2004).
20. Helle, F. *et al.* Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol* **84**, 11905–11915 (2010).
21. Khan, A. G. *et al.* Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **509**, 381–384 (2014).
22. Kong, L. *et al.* Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **342**, 1090–1094 (2013).
23. Law, J. L. M. *et al.* Role of the E2 Hypervariable Region (HVR1) in the Immunogenicity of a Recombinant Hepatitis C Virus Vaccine. *J. Virol.* **92**, (2018).
24. Krey, T. *et al.* The Disulfide Bonds in Glycoprotein E2 of Hepatitis C Virus Reveal the Tertiary Organization of the Molecule. *PLoS Pathogens* **6**, e1000762 (2010).
25. Keck, Z. *et al.* Cooperativity in Virus Neutralization by Human Monoclonal Antibodies to Two Adjacent Regions Located at the Amino Terminus of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein. *J Virol* **87**, 37–51 (2013).
26. Brasher, N. A. *et al.* B cell immunodominance in primary hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology* **72**, 670–679 (2020).
27. Gentzsch, J. *et al.* Hepatitis C Virus p7 is Critical for Capsid Assembly and Envelopment. *PLoS Pathog* **9**, e1003355 (2013).
28. Popescu, C.-I. *et al.* NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly. *PLoS Pathog* **7**, e1001278 (2011).
29. Matthew, A. N. *et al.* Avoiding Drug Resistance by Substrate Envelope-Guided Design: Toward Potent and Robust HCV NS3/4A Protease Inhibitors. *mBio* **11**, e00172-20 (2020).
30. Page, K. *et al.* Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med* **384**, 541–549 (2021).
31. Morikawa, K. *et al.* Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat* **18**, 305–315 (2011).
32. Paul, D., Hoppe, S., Saher, G., Krijnse-Locker, J. & Bartenschlager, R. Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J Virol* **87**, 10612–10627 (2013).
33. Gitto, S., Gamal, N. & Andreone, P. NS5A inhibitors for the treatment of hepatitis C infection. *Journal of Viral Hepatitis* **24**, 180–186 (2017).
34. Coordination of Hepatitis C Virus Assembly by Distinct Regulatory Regions in Nonstructural Protein 5A | PLOS Pathogens. <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005376>.

35. Ganta, N. M. *et al.* A review on HCV inhibitors: Significance of non-structural polyproteins. *Eur J Med Chem* **164**, 576–601 (2019).
36. Gupta, S. P. Chapter 3 - Inhibition of Viruses: Promising Targets and Their Importance. in *Studies on Hepatitis Viruses* (ed. Gupta, S. P.) 35–65 (Academic Press, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-813330-9.00003-X.
37. Polaris Observatory HCV Collaborators. Global change in hepatitis C virus prevalence and cascade of care between 2015 and 2020: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol* **7**, 396–415 (2022).
38. Halota, W. *et al.* Recommendations of the Polish Group of Experts for HCV for the treatment of hepatitis C in 2020. *ceh* **6**, 163–169 (2020).
39. World Health Organization. Hepatitis C Fact sheet. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>.
40. Countries Database – CDA Foundation. <https://cdfound.org/polaris-countries-database/>.
41. Rosenthal, E. S. & Graham, C. S. Price and affordability of direct-acting antiviral regimens for hepatitis C virus in the United States. *Infect Agent Cancer* **11**, 24 (2016).
42. Barber, M. J., Gotham, D., Khwairakpam, G. & Hill, A. Price of a hepatitis C cure: Cost of production and current prices for direct-acting antivirals in 50 countries. *Journal of Virus Eradication* **6**, 100001 (2020).
43. Obwieszczenie Ministra Zdrowia z dnia 21 czerwca 2022 r. w sprawie wykazu refundowanych leków, środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego oraz wyrobów medycznych na 1 lipca 2022 r. - Ministerstwo Zdrowia - Portal Gov.pl. *Ministerstwo Zdrowia* <https://www.gov.pl/web/zdrowie/obwieszczenia-ministra-zdrowia-w-sprawie-wykazu-refundowanych-lekow-srodkow-spozywczych-specjalnego-przeznaczenia-zywieniowego-oraz-wyrobow-medycznych-ktory-wejdzie-w-zycie-1-lipca-2022-r>.
44. Chhatwal, J. *et al.* Assessment of the Feasibility and Cost of Hepatitis C Elimination in Pakistan. *JAMA Network Open* **2**, e193613 (2019).
45. Brouard, C. *et al.* The Undiagnosed Chronically-Infected HCV Population in France. Implications for Expanded Testing Recommendations in 2014. *PLOS ONE* **10**, e0126920 (2015).
46. Mastalerz-Migas, A., Flisiak, R., Drobnik, J., Tomasiewicz, K. & Pawłowska, M. Stanowisko Polskiego Towarzystwa Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych, Polskiego Towarzystwa Hepatologicznego i Polskiego Towarzystwa Medycyny Rodzinnej w zakresie diagnostyki zakażeń HCV w ramach podstawowej opieki zdrowotnej. *Lekarz POZ* **7**, (2021).
47. Roingard, P. & Beaumont, E. Hepatitis C Vaccine: 10 Good Reasons for Continuing. *Hepatology* **71**, 1845–1850 (2020).
48. Simmons, B., Saleem, J., Hill, A., Riley, R. D. & Cooke, G. S. Risk of Late Relapse or Reinfection With Hepatitis C Virus After Achieving a Sustained Virological Response: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Infect Dis* **62**, 683–694 (2016).
49. Martin, N. K., Vickerman, P., Dore, G. & Hickman, M. The HCV epidemics in key populations (including PWID, prisoners, and MSM): the use of DAAs as treatment for prevention. *Curr Opin HIV AIDS* **10**, 374–380 (2015).
50. Veracruz, N., Gish, R. G., Cheung, R., Chitnis, A. S. & Wong, R. J. Global incidence and mortality of hepatitis B and hepatitis C acute infections, cirrhosis and hepatocellular carcinoma from 2010 to 2019. *Journal of Viral Hepatitis* **29**, 352–365 (2022).
51. Cancer (IARC), T. I. A. for R. on. Global Cancer Observatory. <https://gco.iarc.fr/>.
52. El-Serag, H. B. & Kanwal, F. Epidemiology of hepatocellular carcinoma in the United States: where are we? Where do we go? *Hepatology* **60**, 1767–1775 (2014).
53. Brown, J. L. Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma. *Gut* **47**, 610–611 (2000).
54. Janjua, N. Z. *et al.* Long-term effect of sustained virological response on hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C in Canada. *J Hepatol* **66**, 504–513 (2017).
55. Baumert, T. F., Jühling, F., Ono, A. & Hoshida, Y. Hepatitis C-related hepatocellular carcinoma in the era of new generation antivirals. *BMC Med* **15**, 52 (2017).
56. Guarino, M. *et al.* Incidence of HCC recurrence after DAA treatment for HCV in a multicentre Italian cohort study. *Liver Cancer International* **1**, 12–24 (2020).

57. Muzica, C. M. *et al.* Hepatocellular carcinoma after direct-acting antiviral hepatitis C virus therapy: A debate near the end. *World J Gastroenterol* **26**, 6770–6781 (2020).
58. Liu, Z. *et al.* Prevalence of HCV resistance-associated substitutions among treatment-failure patients receiving direct-acting antiviral agents. *Journal of Viral Hepatitis* **27**, 585–592 (2020).
59. Baumert, T. F., Berg, T., Lim, J. K. & Nelson, D. R. Status of Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection and Remaining Challenges. *Gastroenterology* **156**, 431–445 (2019).
60. Pawlotsky, J.-M. Hepatitis C Virus Resistance to Direct-Acting Antiviral Drugs in Interferon-Free Regimens. *Gastroenterology* **151**, 70–86 (2016).
61. Bourlière, M. *et al.* Sofosbuvir, Velpatasvir, and Voxilaprevir for Previously Treated HCV Infection. *N Engl J Med* **376**, 2134–2146 (2017).
62. Interim guidance for country validation of viral hepatitis elimination. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240028395>.
63. Disease Eradication: What Does It Take to Wipe out a Disease? *ASM.org* <https://asm.org/Articles/2020/March/Disease-Eradication-What-Does-It-Take-to-Wipe-out>.
64. Stone, J. *et al.* The Potential Impact of a Hepatitis C Vaccine for People Who Inject Drugs: Is a Vaccine Needed in the Age of Direct-Acting Antivirals? *PLoS ONE* **11**, e0156213 (2016).
65. Cox, A. L. Challenges and Promise of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Med* **10**, a036947 (2020).
66. Bailey, J. R., Barnes, E. & Cox, A. L. Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology* **156**, 418–430 (2019).
67. Hahn, J. A. *et al.* Potential impact of vaccination on the hepatitis C virus epidemic in injection drug users. *Epidemics* **1**, 47–57 (2009).
68. Krahn, M. D. *et al.* Potential cost-effectiveness of a preventive hepatitis C vaccine in high risk and average risk populations in Canada. *Vaccine* **23**, 1549–1558 (2005).
69. Blach, S. *et al.* Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology* **2**, 161–176 (2017).
70. ICTV. https://talk.ictvonline.org/ictv_wikis/flaviviridae/w/sg_flavi/634/table-1---confirmed-hcv-genotypes-subtypes-march-2022.
71. Petruzzello, A., Marigliano, S., Loquercio, G., Cozzolino, A. & Cacciapuoti, C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol* **22**, 7824–7840 (2016).
72. Flisiak, R. *et al.* Prevalence of HCV genotypes in Poland – the EpiTer study. *Clin Exp HEPATOL* **2**, 144–148 (2016).
73. Farci, P. *et al.* The Outcome of Acute Hepatitis C Predicted by the Evolution of the Viral Quasispecies. *Science* **288**, 339–344 (2000).
74. Tsukiyama-Kohara, K. & Kohara, M. Hepatitis C Virus: Viral Quasispecies and Genotypes. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 23 (2018).
75. Shoukry, N. H. *et al.* Memory CD8+ T cells are required for protection from persistent hepatitis C virus infection. *J Exp Med* **197**, 1645–1655 (2003).
76. Grakoui, A. *et al.* HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science* **302**, 659–662 (2003).
77. Cox, A. L. *et al.* Comprehensive analyses of CD8+ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology* **42**, 104–112 (2005).
78. Neumann-Haefelin, C. & Thimme, R. Success and Failure of Virus-Specific T Cell Responses in Hepatitis C Virus Infection. *DDI* **29**, 416–422 (2011).
79. Thimme, R. *et al.* Determinants of Viral Clearance and Persistence during Acute Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 1395–1406 (2001).
80. Klenerman, P. & Thimme, R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut* **61**, 1226–1234 (2012).
81. Wiesch, J. S. zur *et al.* Broad Repertoire of the CD4+ Th Cell Response in Spontaneously Controlled Hepatitis C Virus Infection Includes Dominant and Highly Promiscuous Epitopes. *The Journal of Immunology* **175**, 3603–3613 (2005).
82. Schulze zur Wiesch, J. *et al.* Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 61–75 (2012).

83. Day, C. L. *et al.* Broad Specificity of Virus-Specific CD4+ T-Helper-Cell Responses in Resolved Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **76**, 12584–12595 (2002).
84. Lechner, F. *et al.* Analysis of Successful Immune Responses in Persons Infected with Hepatitis C Virus. *Journal of Experimental Medicine* **191**, 1499–1512 (2000).
85. Urbani, S. *et al.* Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology* **44**, 126–139 (2006).
86. Neumann-Haefelin, C. *et al.* Human leukocyte antigen B27 selects for rare escape mutations that significantly impair hepatitis C virus replication and require compensatory mutations. *Hepatology* **54**, 1157–1166 (2011).
87. Neumann-Haefelin, C. *et al.* Analysis of the Evolutionary Forces in an Immunodominant CD8 Epitope in Hepatitis C Virus at a Population Level. *Journal of Virology* **82**, 3438–3451 (2008).
88. Thimme, R. T cell immunity to hepatitis C virus: Lessons for a prophylactic vaccine. *Journal of Hepatology* **74**, 220–229 (2021).
89. Angelosanto, J. M., Blackburn, S. D., Crawford, A. & Wherry, E. J. Progressive Loss of Memory T Cell Potential and Commitment to Exhaustion during Chronic Viral Infection. *Journal of Virology* **86**, 8161–8170 (2012).
90. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat Immunol* **12**, 492–499 (2011).
91. Amoras, E. da S. G. *et al.* Intrahepatic interleukin 10 expression modulates fibrinogenesis during chronic HCV infection. *PLOS ONE* **15**, e0241199 (2020).
92. Manigold, T. & Racanelli, V. T-cell regulation by CD4 regulatory T cells during hepatitis B and C virus infections: facts and controversies. *The Lancet Infectious Diseases* **7**, 804–813 (2007).
93. Blackburn, S. D. *et al.* Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* **10**, 29–37 (2009).
94. Bengsch, B. *et al.* Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on Exhausted HCV-Specific CD8+ T Cells Is Linked to Antigen Recognition and T Cell Differentiation. *PLOS Pathogens* **6**, e1000947 (2010).
95. McMahan, R. H. *et al.* Tim-3 expression on PD-1+ HCV-specific human CTLs is associated with viral persistence, and its blockade restores hepatocyte-directed in vitro cytotoxicity. *J Clin Invest* **120**, 4546–4557 (2010).
96. Rushbrook, S. M. *et al.* Regulatory T Cells Suppress In Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Persistent Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **79**, 7852–7859 (2005).
97. Pearson, S. S. *et al.* Functional Suppression by FoxP3+CD4+CD25high Regulatory T Cells during Acute Hepatitis C Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases* **197**, 46–57 (2008).
98. Boettler, T. *et al.* T Cells with a CD4+CD25+ Regulatory Phenotype Suppress In Vitro Proliferation of Virus-Specific CD8+ T Cells during Chronic Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology* **79**, 7860–7867 (2005).
99. Accapezzato, D. *et al.* Hepatic expansion of a virus-specific regulatory CD8(+) T cell population in chronic hepatitis C virus infection. *J Clin Invest* **113**, 963–972 (2004).
100. Kroy, D. C. *et al.* Liver Environment and HCV Replication Affect Human T-Cell Phenotype and Expression of Inhibitory Receptors. *Gastroenterology* **146**, 550–561 (2014).
101. Knolle, P. A. & Thimme, R. Hepatic Immune Regulation and Its Involvement in Viral Hepatitis Infection. *Gastroenterology* **146**, 1193–1207 (2014).
102. Nabel, G. J. Designing Tomorrow's Vaccines. *New England Journal of Medicine* **368**, 551–560 (2013).
103. Caradonna, T. M. & Schmidt, A. G. Protein engineering strategies for rational immunogen design. *npj Vaccines* **6**, 1–11 (2021).
104. Semmo, N. *et al.* Maintenance of HCV-specific T-cell responses in antibody-deficient patients a decade after early therapy. *Blood* **107**, 4570–4571 (2006).
105. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C | PNAS. <https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0607026104>.
106. Osburn, W. O. *et al.* Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology* **59**, 2140–2151 (2014).
107. Raghuraman, S. *et al.* Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. *J Infect Dis* **205**, 763–771 (2012).

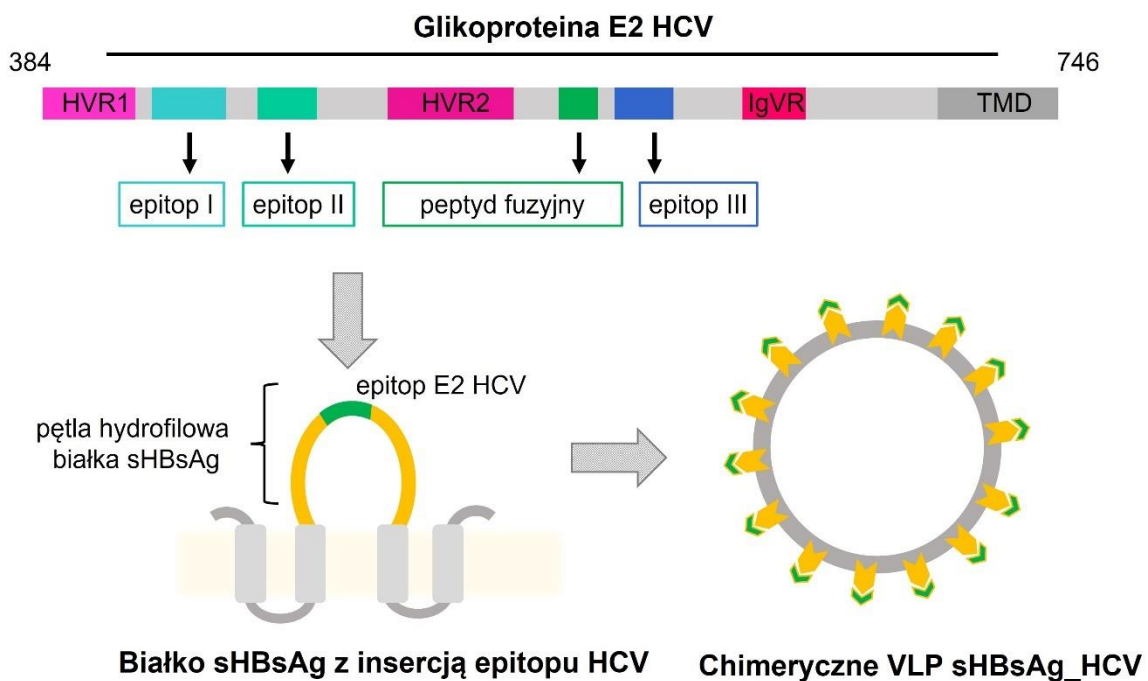
108. de Jong, Y. P. *et al.* Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci Transl Med* **6**, 254ra129 (2014).
109. Krawczynski, K. *et al.* Effect of immune globulin on the prevention of experimental hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* **173**, 822–828 (1996).
110. Osburn, W. O. *et al.* Spontaneous Control of Primary Hepatitis C Virus Infection and Immunity Against Persistent Reinfection. *Gastroenterology* **138**, 315–324 (2010).
111. Meuleman, P. *et al.* In vivo evaluation of the cross-genotype neutralizing activity of polyclonal antibodies against hepatitis C virus. *Hepatology* **53**, 755–762 (2011).
112. Vanwolleghem, T. *et al.* Polyclonal immunoglobulins from a chronic hepatitis C virus patient protect human liver-chimeric mice from infection with a homologous hepatitis C virus strain. *Hepatology* **47**, 1846–1855 (2008).
113. Bukh, J. *et al.* Immunoglobulin with High-Titer In Vitro Cross-Neutralizing Hepatitis C Virus Antibodies Passively Protects Chimpanzees from Homologous, but Not Heterologous, Challenge. *Journal of Virology* **89**, 9128–9132 (2015).
114. Feray, C. *et al.* Incidence of Hepatitis C in Patients Receiving Different Preparations of Hepatitis B Immunoglobulins after Liver Transplantation. *Ann Intern Med* **128**, 810–816 (1998).
115. Forns, X., Purcell, R. H. & Bukh, J. Quasispecies in viral persistence and pathogenesis of hepatitis C virus. *Trends Microbiol* **7**, 402–410 (1999).
116. Viral entry and escape from antibody-mediated neutralization influence hepatitis C virus reinfection in liver transplantation | Journal of Experimental Medicine | Rockefeller University Press. <https://rupress.org/jem/article/207/9/2019/40978/Viral-entry-and-escape-from-antibody-mediated>.
117. Bankwitz, D. *et al.* Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes. *J Virol* **84**, 5751–5763 (2010).
118. Keck, Z.-Y. *et al.* A point mutation leading to hepatitis C virus escape from neutralization by a monoclonal antibody to a conserved conformational epitope. *J Virol* **82**, 6067–6072 (2008).
119. Owsianka, A. M. *et al.* Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* **80**, 8695–8704 (2006).
120. Tarr, A. W. *et al.* Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* **43**, 592–601 (2006).
121. Augestad, E. H. *et al.* Global and local envelope protein dynamics of hepatitis C virus determine broad antibody sensitivity. *Science Advances* **6**, eabb5938.
122. Mutations in Hepatitis C Virus E2 Located outside the CD81 Binding Sites Lead to Escape from Broadly Neutralizing Antibodies but Compromise Virus Infectivity | Journal of Virology. <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/JVI.00248-09>.
123. Prentoe, J., Velázquez-Moctezuma, R., Fong, S. K. H., Law, M. & Bukh, J. Hypervariable region 1 shielding of hepatitis C virus is a main contributor to genotypic differences in neutralization sensitivity. *Hepatology* **64**, 1881–1892 (2016).
124. Prentoe, J. & Bukh, J. Hypervariable Region 1 in Envelope Protein 2 of Hepatitis C Virus: A Linchpin in Neutralizing Antibody Evasion and Viral Entry. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
125. Prentoe, J. *et al.* Hypervariable region 1 differentially impacts viability of hepatitis C virus strains of genotypes 1 to 6 and impairs virus neutralization. *J Virol* **85**, 2224–2234 (2011).
126. Lavie, M., Hanouille, X. & Dubuisson, J. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Front. Immunol.* **9**, 910 (2018).
127. Lozach, P.-Y., Burleigh, L., Staropoli, I. & Amara, A. The C Type Lectins DC-SIGN and L-SIGN. *Glycovirolgy Protocols* **379**, 51–68 (2007).
128. Helle, F. *et al.* The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *J Virol* **81**, 8101–8111 (2007).
129. Pantua, H. *et al.* Glycan Shifting on Hepatitis C Virus (HCV) E2 Glycoprotein Is a Mechanism for Escape from Broadly Neutralizing Antibodies. *Journal of Molecular Biology* **425**, 1899–1914 (2013).
130. Prentoe, J. *et al.* Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 10039–10047 (2019).

131. Brimacombe, C. L. *et al.* Neutralizing antibody-resistant hepatitis C virus cell-to-cell transmission. *J Virol* **85**, 596–605 (2011).
132. Wrensch, F. *et al.* Hepatitis C Virus (HCV)–Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Front Immunol* **9**, 1436 (2018).
133. Vieyres, G. & Pietschmann, T. HCV Pit Stop at the Lipid Droplet: Refuel Lipids and Put on a Lipoprotein Coat before Exit. *Cells* **8**, 233 (2019).
134. Dreux, M. *et al.* High density lipoprotein inhibits hepatitis C virus-neutralizing antibodies by stimulating cell entry via activation of the scavenger receptor BI. *J Biol Chem* **281**, 18285–18295 (2006).
135. Deng, L. *et al.* Syntenin regulates hepatitis C virus sensitivity to neutralizing antibody by promoting E2 secretion through exosomes. *J Hepatol* **71**, 52–61 (2019).
136. Wrensch, F. *et al.* IFITMs mediate viral evasion in acute and chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* **70**, 1506–1520 (2019).
137. Alter, H. J., Purcell, R. H., Holland, P. V. & Popper, H. Transmissible agent in non-A, non-B hepatitis. *Lancet* **1**, 459–463 (1978).
138. Bradley, D. W. *et al.* Persistent non-A, non-B hepatitis in experimentally infected chimpanzees. *J Infect Dis* **143**, 210–218 (1981).
139. Lanford, R. E., Walker, C. M. & Lemon, S. M. The Chimpanzee Model of Viral Hepatitis: Advances in Understanding the Immune Response and Treatment of Viral Hepatitis. *ILAR J* **58**, 172–189 (2017).
140. Yong, K. S. M., Her, Z. & Chen, Q. Humanized Mouse Models for the Study of Hepatitis C and Host Interactions. *Cells* **8**, 604 (2019).
141. Vercauteren, K., de Jong, Y. P. & Meuleman, P. Animal models for the study of HCV. *Curr Opin Virol* **13**, 67–74 (2015).
142. Scheel, T. K. H. *et al.* Characterization of nonprimate hepacivirus and construction of a functional molecular clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 2192–2197 (2015).
143. Firth, C. *et al.* Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *mBio* **5**, e01933-01914 (2014).
144. Billerbeck, E. *et al.* Mouse models of acute and chronic hepacivirus infection. *Science* **357**, 204–208 (2017).
145. Trivedi, S. *et al.* Viral persistence, liver disease, and host response in a hepatitis C-like virus rat model. *Hepatology* **68**, 435–448 (2018).
146. Liang, T. J., Feld, J. J., Cox, A. L. & Rice, C. M. Controlled Human Infection Model — Fast Track to HCV Vaccine? *New England Journal of Medicine* **385**, 1235–1240 (2021).
147. Barnes, E., Cooke, G. S., Lauer, G. M. & Chung, R. T. Implementation of a controlled human infection model for evaluation of HCV vaccine candidates. *Hepatology* **n/a**.
148. Park, S.-H. *et al.* Successful vaccination induces multifunctional memory T-cell precursors associated with early control of hepatitis C virus. *Gastroenterology* **143**, 1048-1060.e4 (2012).
149. Swadling, L. *et al.* A Human Vaccine Strategy Based On Chimpanzee Adenoviral and MVA Vectors That Primes, Boosts and Sustains Functional HCV Specific T-Cell Memory. *Sci Transl Med* **6**, 261ra153 (2014).
150. Choo, Q. L. *et al.* Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1294–1298 (1994).
151. Houghton, M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol Rev* **239**, 99–108 (2011).
152. Law, J. L. M. *et al.* A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLoS One* **8**, (2013).
153. Kachko, A. *et al.* Antibodies to an interfering epitope in hepatitis C virus E2 can mask vaccine-induced neutralizing activity. *Hepatology* **62**, 1670–1682 (2015).
154. Zepeda-Cervantes, J., Ramírez-Jarquín, J. O. & Vaca, L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
155. Kouskoff, V., Lacaud, G. & Nemazee, D. T cell-independent rescue of B lymphocytes from peripheral immune tolerance. *Science* **287**, 2501–2503 (2000).

156. Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns | Nature Reviews Immunology. <https://www.nature.com/articles/nri2868>.
157. Reddy, S. T., Rehor, A., Schmoekel, H. G., Hubbell, J. A. & Swartz, M. A. In vivo targeting of dendritic cells in lymph nodes with poly(propylene sulfide) nanoparticles. *J Control Release* **112**, 26–34 (2006).
158. Ludwig, C. & Wagner, R. Virus-like particles—universal molecular toolboxes. *Current Opinion in Biotechnology* **18**, 537–545 (2007).
159. Zhao, H., Zhou, X. & Zhou, Y.-H. Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **16**, 1533 (2020).
160. Koutsky, L. The Epidemiology behind the HPV Vaccine Discovery. *Annals of Epidemiology* **19**, 239–244 (2009).
161. WHO recommends groundbreaking malaria vaccine for children at risk. <https://www.who.int/news/item/06-10-2021-who-recommends-groundbreaking-malaria-vaccine-for-children-at-risk>.
162. Laurens, M. B. RTS,S/AS01 vaccine (Mosquirix™): an overview. *Hum Vaccin Immunother* **16**, 480–489 (2019).
163. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. & Hall, B. D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 347–350 (1982).
164. Cao, J. *et al.* Cryo-EM structure of native spherical subviral particles isolated from HBV carriers. *Virus Research* **259**, 90–96 (2019).
165. Vaillant, A. HBsAg, Subviral Particles, and Their Clearance in Establishing a Functional Cure of Chronic Hepatitis B Virus Infection. *ACS Infect. Dis.* **7**, 1351–1368 (2021).
166. Cheong, W.-S., Reiseger, J., Turner, S. J., Boyd, R. & Netter, H.-J. Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antiviral Res.* **81**, 113–122 (2009).
167. Berkower, I., Raymond, M., Muller, J., Spadaccini, A. & Aberdeen, A. Assembly, structure, and antigenic properties of virus-like particles rich in HIV-1 envelope gp120. *Virology* **321**, 75–86 (2004).
168. SARS-CoV-2 receptor binding domain displayed on HBsAg virus-like particles elicits protective immunity in macaques. <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.abl6015>.
169. Vietheer, P. T. K., Boo, I., Drummer, H. E. & Netter, H.-J. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Antivir Ther* **12**, 477–487 (2007).
170. Netter, H. J., Macnaughton, T. B., Woo, W.-P., Tindle, R. & Gowans, E. J. Antigenicity and Immunogenicity of Novel Chimeric Hepatitis B Surface Antigen Particles with Exposed Hepatitis C Virus Epitopes. *J Virol* **75**, 2130–2141 (2001).
171. Beaumont, E., Patient, R., Hourieux, C., Dimier-Poisson, I. & Roingard, P. Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology* **57**, 1303–1313 (2013).
172. Patient, R., Hourieux, C., Vaudin, P., Pagès, J.-C. & Roingard, P. Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies. *N Biotechnol* **25**, 226–234 (2009).
173. Sandomenico, A. *et al.* Generation and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Cyclic Variant of Hepatitis C Virus E2 Epitope 412-422. *J Virol* **90**, 3745–3759 (2016).

6. Cele badań

1. Opracowanie potencjalnych szczepionek opartych na chimerycznych cząsteczkach wirusopodobnych HBV-HCV zbudowanych z małego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (sHBsAg), prezentujących na swojej powierzchni silnie konserwowane epitopy pochodzące z glikoproteiny powierzchniowej E2 wirusa HCV.
2. Charakterystyka swoistej odpowiedzi immunologicznej wzbudzanej przez chimeryczne cząsteczki wirusopodobne i ocena ich potencjału w zastosowaniu jako szczepionka przeciwko HCV.
3. Opracowanie metod produkcji cząsteczek wirusopodobnych HBV-HCV w systemie opartym na pierwotniaku *L. tarentolae*.



Rycina 6. Konstrukcja chimerycznych cząsteczek wirusopodobnych sHBsAg_HCV. Wyselekcjonowane, silnie konserwowane epitopy glikoproteiny E2 wirusa HCV zostały wbudowane w hydrofilową pętlę białka sHBsAg tworząc chimeryczne VLP sHBsAg_HCV.

7. Omówienie uzyskanych wyników badań

Szczegółowy opis materiałów, metodyki i wyników badań wraz z dyskusją zawarty jest w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską:

1. Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. Czarnota A, Tyborowska J, Peszyńska-Sularz G, Gromadzka B, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2016) *Microbial Cell Factories* <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>
2. Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. Czarnota A, Offersgaard A, Pihl AF, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2020) *Vaccines (Basel)* <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>
3. The effect of glycan shift on antibodies against HCV E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Czarnota A, Offersgaard A, Owsianka A., Bukh J, Gottwein JM., Patel AH, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2023) *Microbiology Spectrum* <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

Streszczenia publikacji składających się na rozprawę doktorską:

7.1 Praca 1.

Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus.

Czarnota A, Tyborowska J, Peszyńska-Sularz G, Gromadzka B, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2016) *Microbial Cell Factories* <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

7.1.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:

Celem pracy było zaprojektowanie i produkcja cząsteczek wirusopodobnych opartych na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B prezentującym na swojej powierzchni sekwencję aminokwasową epitopu I glikoproteiny E2 HCV (Ryc. 7). Takie cząsteczki zostały następnie wykorzystane przy formułacji preparatu użytego do szczepień myszy. Następnym celem była dokładna charakterystyka wzbudzonej odpowiedzi immunologicznej, zarówno humoralnej jak i cytotoksycznej, skierowanej przeciwko białku nośnikowemu sHBsAg, epitopowi I oraz pełnej formie glikoproteiny E2 HCV.

Jedną z najważniejszych przeszkód w stworzeniu szczepionki chroniącej przed zakażeniem HCV jest wysoka zmienność genetyczna wirusa. Głównym celem dla przeciwciał neutralizujących wirusa jest glikoproteina E2 położona na powierzchni cząsteczek wirusowych.

W obrębie glikoproteiny E2 można wyróżnić kilka rejonów o wysokiej zmienności a także rejon silnie konserwowane. Jednym z takich rejonów jest epitop I położony poniżej HVR1 w pozycji 412-423, konserwowany w ponad 5500 sekwencjach glikoproteiny E2 zdeponowanych w bazie GeneBank. Epitop I jest dobrze zdefiniowanym celem dla wielu przeciwciał o szerokim spektrum neutralizacji, w tym dla monoklonalnego przeciwciała AP33, a przeciwciała wiążące się z tym rejonem często rozpoznają epitop w formie liniowej. Cechy te sprawiają, że rejon 412–423 jest doskonałym antygenem do prezentacji w szczepionce opartej na epitopach skierowanej przeciwko HCV.

Aby skutecznie wzbudzić odpowiedź immunologiczną przeciwko krótkiemu epitopowi I, został on zaprezentowany na powierzchni VLPs opartych na białku sHBsAg, które jest obecnie stosowane na całym świecie jako komercyjna, rekombinowana szczepionka przeciw wirusowemu zapaleniu wątroby typu B. Trzeciorzędowa struktura sHBsAg tworzy hydrofilową pętlę zawierającą epitopy wzbudzające silną odpowiedź humoralną, znane również jako determinanta „a”. Ze względu na swój potencjał immunogeny VLPs oparte na sHBsAg mogą mieć zastosowanie jako nośnik obcych antygenów.

7.1.2 Wyniki:

Jednym z innowacyjnych aspektów tej pracy było wyprodukowanie VLPs opartych na sHBsAg w systemie ekspresyjnym opartym na pierwotniaku *L. tarentolae*. System *L. tarentolae* umożliwia produkcję rekombinowanych białek o wzorze N-glikozylacji zbliżonym do tego opisywanego dla komórek ssaczy. Ponadto *L. tarentolae* może rosnąć w biofermentorach do dużej gęstości komórek, a wydajność produkcji rekombinowanego białka może sięgać kilku miligramów na litr hodowli.

W pracy opisano dwa konstrukty, pierwszy z nich został oznaczony jako sHBsAg_412-425, w którym sekwencja kodująca rejon 412-425 glikoproteiny E2 HCV została wstawiona do sekwencji białka sHBsAg (serotyp adw2) w pozycjach aminokwasowych P127 i A128 (Ryc. 7). W konstrukcie wykorzystano sekwencję odpowiadającą epitopowi I glikoproteiny E2 HCV – 412-423 z dołączonymi dwoma aminokwasami S424 oraz T425, które pozwoliły na zachowanie naturalnie występującego miejsca N-glikozylacji w pozycji N423 (N2). Dodatkowo zaprojektowano kontrolny konstrukt sHBsAg_wt nieposiadający insercji obcej

sekwencji. Uzyskane sekwencje sHBsAg_412-425 oraz sHBsAg_wt wklonowano do wektora pLEXSY_I-blecherry3, który umożliwia integrację sekwencji kodującej rekombinowane białka do genomu pierwotniaka *L. tarentolae* i indukowaną ekspresję transgenu z promotora T7 pod kontrolą operatora tetracyklinowego.

412-425 QLINTNGSWHINST



Rycina 7. Konstrukcja chimerycznego białka sHBsAg_412-425. Sekwencja epitopu 412-425 pochodząca z izolatu HCV H77C użyta do skonstruowania chimerycznego białka sHBsAg_412-425. sHBsAg_412-425 został stworzony poprzez insercję sekwencji 412-425 do sekwencji kodującej pętlę hydrofilową białka sHBsAg w pozycji P127/A128 – miejsce insercji zaznaczone z czarną strzałką.

Oba chimeryczne białka były produkowane w hodowlach zawiesinowych *L. tarentolae* zgodnie z instrukcjami producenta (Jena Bioscience). W skrócie, zlinearyzowane plazmidy wprowadzono do komórek *L. tarentolae* poprzez elektroporację, a transfekowane komórki selekcyjonowano poliklonalnie z wykorzystaniem antybiotyku selekcyjnego. Tak uzyskane stabilne linie komórkowe mogły być następnie użyte do nadprodukcji białka prowadzonej poprzez dodanie tetracyklin. Komórki hodowano w kolbach z wytrząsaniem do końcowej gęstości optycznej 4-5 przy 600 nm (OD₆₀₀).

W celu analizy ekspresji rekombinowanych białek wykorzystano immunofluorescencję komórek pierwotniaka *L. tarentolae*, SDS-PAGE połączony z Western blottingiem oraz test ELISA.

Barwienie immunofluorescencyjne komórek *L. tarentolae* pokazało, że sHBsAg_wt oraz sHBsAg_412-425 są zlokalizowane głównie w cytozolu pierwotniaka, prawdopodobnie w retikulum endoplazmatycznym. Nie zaobserwowano sekrecji białek do pożywki hodowlanej. Analiza Western blot lizatów komórkowych wykazała, że w warunkach redukujących masy cząsteczkowe monomerów sHBsAg_wt i sHBsAg_412-425 wynosiły odpowiednio około 27 i

30 kDa. Różnica w masach cząsteczkowych monomerów jest prawdopodobnie związana nie tylko z insercją 14 aminokwasów epitopu I, ale także z masą cząsteczkową N-glikanów. Białko chimeryczne 412-425_sHBsAg zawiera dwa dodatkowe miejsca N-glikozylacji w porównaniu z sHBsAg_wt. N-glikozylację sHBsAg_412-425 potwierdzono trawieniem endoglikozydazą - PNGazą F. W teście ELISA chimeryczne cząsteczki sHBsAg_412-425 były swoiście rozpoznawane przez monoklonalne przeciwciała AP33, bez reaktywności krzyżowej z białkiem sHBsAg_wt oraz przez poliklonalne przeciwciała anti-HBsAg, które wiązały się również z białkiem sHBsAg_wt.

Analiza w transmisyjnym mikroskopie elektronowym potwierdziła tworzenie się cząsteczek wirusopodobnych opartych na białku sHBsAg_412-425, a ich kształt przypominał prawidłowo złożone VLPs sHBsAg ulegające ekspresji w układach ekspresyjnych ssaków lub drożdży. Dodatkowo potwierdziłam prawidłową prezentację epitopu I na powierzchni cząsteczek sHBsAg_412-425 za pomocą techniki immunobarwienia w obrazie mikroskopu elektronowego, w której użyto przeciwciał AP33 oraz przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z nanocząsteczkami złota.

Otrzymane cząsteczki wirusopodobne były oczyszczane z lizatu komórkowego za pomocą ultrawierwienia w gradiencie jodiksanolu. Po zebraniu frakcji zawierających największą ilość rekombinowanego białka i wymianie buforu na PBS próbki były wykorzystywane do formulacji preparatów szczepionkowych.

Aby wykazać immunogenność cząsteczek sHBsAg i 412-425_sHBsAg, dwie grupy myszy BALB/c szczepiono podskórnymi frakcjami zawierającymi cząsteczki sHBsAg_wt lub sHBsAg_412-425. Dodatkową grupę stanowiła grupa kontrolna, której podano PBS. Wszystkie myszy szczepiono w obecności opartego na skwalenie adjuwantu typu olej w wodzie – AddaVax, analogu adjuwantu MF59, który jest zarejestrowany w Europie do stosowania u ludzi. Dwa tygodnie po ostatnim szczepieniu ze zwierząt pobrano śledziony oraz krew, które zostały wykorzystane do badań nad odpowiedzią komórkową oraz humoralną wzbudzaną przez VLPs.

W celu sprawdzenia odpowiedzi komórkowej wzbudzanej przez VLPs wykorzystano metodę ELISpot, w której wykrywano produkcję IFN- γ . W tym celu z mysich śledzion wyizolowano splenocyty, które następnie stymulowano pulami peptydów pokrywającymi całą sekwencję aminokwasową białka sHBsAg. Peptydy podzielono na trzy pule odpowiadające pozycjom aminokwasów: 1-99 (P1), 100-188 (P2) i 189-240 (P3). Najsilniejszą odpowiedź komórkową

zaobserwowano dla splenocytów z myszy szczepionych sHBsAg_412-425 stymulowanych peptydami z pul z P1 oraz P3 (odpowiadającym N- i C-terminalnym domenom białka sHBsAg).

Analiza mysich surowic wykazała, że zarówno sHBsAg_412-425 jak i sHBsAg_wt są zdolne do wzbudzenia silnej i swoistej odpowiedzi humoralnej. Surowice silnie reagowały na antygeny stosowane do immunizacji, osiągając miano sięgające 5×10^5 . Szczegółowa charakterystyka surowicy wykazała reaktywność krzyżową zarówno z oczyszczonym białkiem sHBsAg pochodzącym z drożdży (yeast-derived sHBsAg - yHBsAg), jak i z dostępną w handlu szczepionką przeciwko HBV (Engerix-B). Sugeruje to, że insercja 14 aminokwasów epitopu I w cząsteczce sHBsAg nie eliminuje odpowiedzi humoralnej przeciwko samemu białku sHBsAg. Jednak odpowiedź immunologiczna przeciwko białku sHBsAg była niższa w grupie myszy sHBsAg_412-425 w porównaniu z grupą myszy szczepionych konstruktem sHBsAg_wt.

Surowice z grupy sHBsAg_412-425 reagowały nie tylko z białkiem sHBsAg, ale także z syntetycznym peptydem odpowiadającym regionowi 412–425 glikoproteiny E2 HCV. Krzywa standardowa AP33 wykazała, że ilość przeciwciał w surowicy sHBsAg_412-425 skierowanych przeciw epitopowi 412-425 odpowiadała stężeniu przeciwciała AP33 wynoszącemu około 0,9 mg/ml.

Ponadto postanowiliśmy przetestować reaktywność krzyżową surowic myszy immunizowanych VLPs sHBsAg_412–425 z kompleksami glikoprotein E1E2 pochodzącymi z różnych genotypów HCV. Surowice rozpoznawały glikoproteiny E2 pochodzące z genotypów 1a, 1b, 2b, 3a, 4 oraz 6 HCV, ale nie rozpoznawały E2 pochodzącego z genotypu piątego. Wynikało to z faktu, że użyty przez nas izolat 5a-UKN.5.14.4 posiada zmiany w sekwencji aminokwasowej epitopu I, w porównaniu z sekwencją źródłową epitopu I prezentowanego na VLPs sHBsAg_412-425, w tym zmianę W420R uniemożliwiającą wiązanie się przeciwciał AP33 do kompleksu glikoprotein E1E2, co może sugerować podobieństwo pomiędzy przeciwciałami AP33 oraz przeciwciałami sHBsAg_412-425 we wzorze wiązania do epitopu I glikoproteiny E2 HCV.

7.1.3 Wnioski:

1. Białko sHBsAg jest wydajnie produkowane w komórkach *L. tarentolae*. Podobnie jak w systemie drożdżowym, białko sHBsAg zatrzymywane jest we frakcji cytoplazmatycznej i nie ulega sekrecji do pożywki.

2. Pierwszy raz opisano produkcję VLP opartych na białku sHBsAg w systemie *L. tarentolae*.
3. Białka sHBsAg_wt oraz sHBsAg_412-425 otrzymane w *L. tarentolae* były N-glikozylowane.
4. Epitop I był pomyślnie prezentowany na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych, a jego insercja w obrębie hydrofilowej pętli białka sHBsAg nie zaburza produkcji białka oraz tworzenia się chimericznych VLPs.
5. Otrzymane białka wzbudzają odpowiedź komórkową przeciwko białku sHBsAg, głównie przeciwko epitopom znajdującym się w N- i C- terminalnej domenie transmembranowej.
6. Wykazano silną odpowiedź humoralną wzbudzoną przez VLPs. Surowice sHBsAg_412–425 wiązały zarówno syntetyczny peptyd odpowiadający sekwencji aminokwasowej 412-425, jak i pochodzące z drożdży białka HBsAg. Odpowiedź immunologiczna przeciwko białku HBsAg była słabsza w grupie myszy sHBsAg_412-425 niż w grupie sHBsAg_wt.
7. W warunkach denaturująco/redukujących surowice 412–425_sHBsAg wiązały glikoproteinę E2 pochodzącą z różnych genotypów HCV, co wskazuje na obecność przeciwciał o reaktywności krzyżowej.
8. Chimeryczne VLP sHBsAg_412-425 mogą być przydatne w opracowaniu racjonalnie zaprojektowanej, biwalentnej szczepionki profilaktycznej przeciwko dwóm głównym ludzkim patogenom hepatotropowym.

7.2 Praca 2.

Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency.

Czarnota A, Offersgaard A, Pihl AF, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2020) *Vaccines (Basel)* <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

7.2.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:

Istnieje wiele zidentyfikowanych, konserwowanych epitopów glikoproteiny E2 wiążących przeciwciała neutralizujące różne genotypy HCV. Wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko nie jednemu, lecz wielu silnie konserwowanym epitopom może być

kluczowe w projektowaniu pan-genotypowej szczepionki przeciwko HCV. Regiony silnie konserwowane w sekwencji glikoproteiny E2 odgrywają ważną rolę w wiązaniu cząsteczki wirusowej do receptorów komórki gospodarza i mogą stanowić doskonały cel dla przeciwciał neutralizujących. Jednymi z takich rejonów są sekwencje 412-423 i 434-446 (tzw. epitop I oraz epitop II), oraz sekwencje zlokalizowane w dalszych domenach antygenowych - rejony 502-520 oraz 523-535. Wszystkie wymienione rejony są konserwowane w sekwencji białka E2 oraz odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu glikoproteiny E2 z receptorem wejścia dla wirusa – białkiem CD81. Każdy z tych rejonów opisano także jako cel dla przeciwciał neutralizujących HCV.

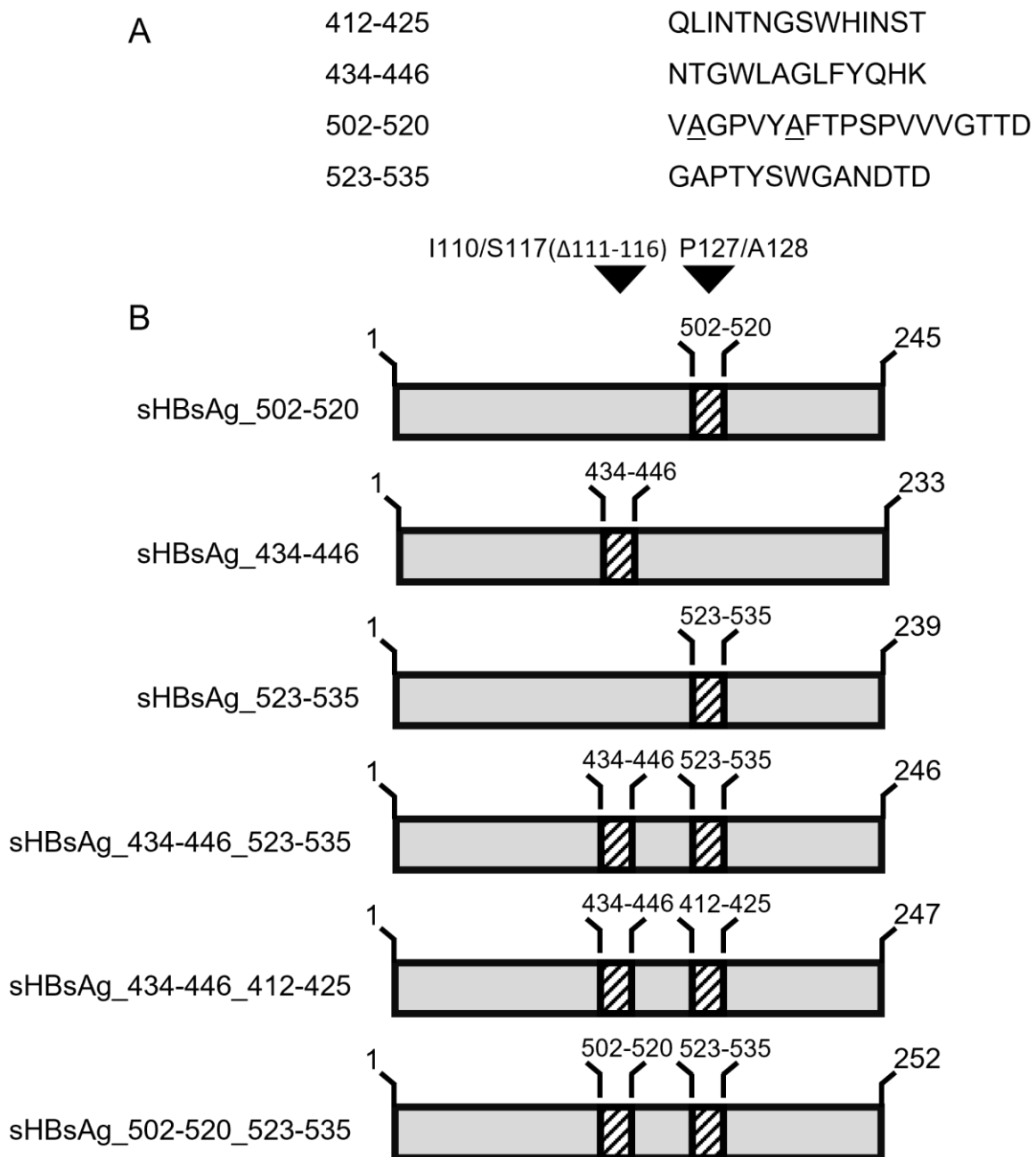
Epitop I (rejon 412–423 glikoproteiny E2 HCV) jest ważnym celem dla przeciwciał o szerokim spektrum neutralizacji i był wcześniej brany pod uwagę jako cel terapii opartej na przeciwciałach. Opublikowane przez nas wcześniejsze wyniki (Czarnota, 2016) podkreślają zdolność epitopu I do indukowania przeciwciał reagujących krzyżowo z glikoproteiną E2 pochodzącą z różnych genotypów wirusa HCV. Rola przeciwciał wiążących rejon 434-446 (epitop II) jest dyskusyjna. W części prac przeciwciała wiążące ten rejon wzmacniały neutralizację HCV, w której pośredniczyły przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi I. W innych pracach sugerowano, że epitop II może wzbudzać przeciwciała nieneutralizujące, interferujące z neutralizującymi przeciwciałami wiążącymi epitop I. Rejon 523-535 (epitop III) znajduje się na C-końcu pętli wiążącej receptor CD81 i jest ważnym celem dla wielu przeciwciał neutralizujących o szerokim spektrum działania. Co istotne, większość monoklonalnych przeciwciał przeciwko epitopowi III zostało wyizolowanych z osób zakażonych i ma charakter przeciwciał konformacyjnych. Mniej poznanym epitopem jest rejon 502-520, który został opisany jako potencjalny peptyd fuzyjny, mający znaczenie w procesie wiązania HCV z receptorami wejścia do komórki gospodarza.

Z uwagi na niezwykle zmienność HCV i możliwość pojawienia się zmian w sekwencjach epitopów, które umożliwiłyby ucieczkę przed przeciwciałami neutralizującymi, wzbudzenie silnej odpowiedzi przeciwciał skierowanych przeciwko wielu konserwowanym rejonom wydaje się kluczowe w uzyskaniu uniwersalnej szczepionki opartej na epitopach chroniącej przed zakażeniem wirusem HCV.

7.2.2 Wyniki:

Sekwencje kodujące regiony glikoproteiny E2 (genotyp 1a, izolat H77C) obejmujące reszty 412-425, 434-446, 502-520 oraz 523-535 zostały wstawione pojedynczo lub w kombinacjach

do sekwencji hydrofilowej pętli białka sHBsAg w pozycjach odpowiadających aminokwasom I110/S117 (Δ 111-116) i P127/A128 (Ryc. 8).



Rycina 8. Konstrukcja chimerycznych białek HBV-HCV. (A) Sekwencje epitopów pochodzących z izolatu HCV H77C użytych do skonstruowania chimerycznych białek. Podkreślona alanina [A] oznacza miejsce, w którym cysteina została zamieniona na alaninę. (B) Rekombinowane konstrukty zostały stworzone poprzez insercję sekwencji kodujących epitopy E2 HCV do sekwencji kodującej pętlę hydrofilową białka sHBsAg w pozycjach I110/S117(Δ 111-116) i/lub P127/A128 – miejsca insercji są zaznaczone z czarnymi strzałkami.

Chimeryczne cząsteczki VLP wyprodukowano w hodowlach komórkowych pierwotniaka *L. tarentolae* o dużej gęstości. Ekspresję białek w lizatach komórkowych potwierdzono metodą SDS-PAGE, a następnie Western blot z wykorzystaniem przeciwciał anty-sHBsAg. W warunkach redukujących masy cząsteczkowe monomerów białek chimerycznych mieściły się w zakresie 27-35 kDa. W przypadku wszystkich białek chimerycznych wykryto także multimery o wyższej masie cząsteczkowej. Chimeryczne VLP zagęszczono i częściowo oczyszczono poprzez ultrawierowanie w gradiencie jodksanolu. Składanie cząstek potwierdzono za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej. We frakcjach zawierających chimeryczne białka obecne były VLP o średnicy około 20-30 nm.

Aby zbadać immunogenność uzyskanych VLP, osiem grup myszy BALB/c zaszczepiono podskórnie frakcjami po oczyszczeniu zawierającymi rekombinowane VLPs. Wszystkie myszy immunizowano w obecności adiuwantu AddaVax. Po przeprowadzeniu pełnego cyklu immunizacji stwierdziliśmy obecność wysokiego miana swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko biotynylowanemu peptydom, odpowiadającym sekwencjom glikoproteiny E2 eksponowanej na powierzchni chimerycznych VLP. Wyniki te dowodzą, że immunizacja cząsteczkami zawierającymi zarówno pojedyncze jak i podwójne obce epitopy może wywołać silną odpowiedź przeciwciał przeciwko wszystkim eksponowanym epitopom HCV. Szczegółowa charakterystyka surowicy wykazała także silną reaktywność z oczyszczonym białkiem sHBsAg pochodzącym z drożdży (yHBsAg) dla surowic pobranych od myszy immunizowanych sHBsAg_502-520, sHBsAg_523-535 oraz sHBsAg_412-425 – uzyskane miano przeciwciał było porównywalne z mianem przeciwciał dla surowic po szczepieniu VLP sHBsAg_wt. Słabsze odpowiedzi lub ich brak obserwowano po immunizacji przy użyciu sHBsAg_434-446 i wszystkich VLP eksponujących po dwa epitopy (sHBsAg_434-446_523-535, sHBsAg_434-446_412-425 i sHBsAg_502-520_523-535).

Następnie przetestowaliśmy reaktywność krzyżową surowic przeciwko kompleksom E1E2 pochodzących z genotypów 1-6 wirusa HCV w testach ELISA. W warunkach redukująco-denaturujących sześć z siedmiu surowic rozpoznało glikoproteiny E1E2 pochodzące z genotypów 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a oraz 6a wirusa HCV. Surowice pochodzące od myszy immunizowanych VLP niosącymi epitop 412-425 nie rozpoznawały tylko glikoprotein E1E2 pochodzących z genotypu 5a. Jest to zgodne z poprzednio opisanymi wynikami i wynika z obecności zmian w pięciu aminokwasach w regionie 412-425 w porównaniu z sekwencją

źródłową pochodzącą z genotypu 1a. Przeciwciała wzbudzone przez VLP prezentujące epitopy 502-520 lub 523-535 wiązały wszystkie badane zdenaturowane kompleksy E1E2. Wykazałam także, że cząsteczki VLP sHBsAg_434-446 nie wzbudziły żadnych przeciwciał zdolnych do wiązania się z glikoproteinami E1E2.

Co ciekawe, zaobserwowałam znaczną zmienność między surowicami w profilu wiązania natywnych kompleksów E1E2 pochodzących z komórek ssaczych. Najszerzą reaktywność krzyżową stwierdzono w przypadku surowic z myszy immunizowanych VLP prezentujących epitop 412-425 (sHBsAg_412-425 oraz sHBsAg_434-446_412-425), ponieważ nie rozpoznały one jedynie powyżej opisanego kompleksu E1E2 pochodzącego z genotypu 5a zawierającego mutację W420R. Surowice myszy immunizowanych VLP niosącymi epitop 523-535 (sHBsAg_523-535, sHBsAg_434-446_523-535 oraz sHBsAg_502-520_523-535) rozpoznały heterodimer E1E2 z genotypów 1a, 1b, 2a oraz 5a, ale nie 3a. Dodatkowo zaobserwowano ograniczone rozpoznawanie kompleksu E1E2 pochodzącego z genotypów 2b oraz 6a. Surowice z myszy immunizowanych konstrukcjami sHBsAg_502-520 i sHBsAg_434-446 nie rozpoznały żadnego z testowanych natywnych heterodimerów E1E2.

Ostatnim etapem badań była ocena właściwości neutralizujących przeciwciał IgG oczyszczonych z mysich surowic przeciwko infekcyjnemu HCV pochodzącemu z hodowli komórkowych (HCVcc). Ten kluczowy etap doświadczeń został wykonany we współpracy z zespołem z Uniwersytetu w Kopenhadze. Współpraca umożliwiła nam rozszerzenie panelu testowanych genotypów HCVcc z dwóch (1a oraz 2a) do ośmiu (1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, 5a oraz 6a), tym samym byliśmy w stanie objąć analizą wszystkie najważniejsze genotypy wirusa HCV krążące w populacji ludzkiej. W wyniku przeprowadzonych testów stwierdzono, że efekt neutralizacji można było zaobserwować tylko w przypadku przeciwciał pochodzących od myszy immunizowanych VLP prezentujących epitop 412-425 (sHBsAg_412-425 i sHBsAg_434-446_412-425). Przeciwciała te wykazały najsilniejszą skuteczność neutralizacji wobec wirusów genotypu 1a, 1b, 4a oraz 5a, przy 80-100% neutralizacji przy najwyższych stężeniach IgG. Ponadto przeciwciała neutralizowały wirusy pochodzące z genotypu 2a i 2b z niższą skutecznością, zbliżając się do ~ 60% neutralizacji przy najwyższych stężeniach IgG. Natomiast w przypadku wirusów o genotypach 3a i 6a obserwowano mniej niż 50% neutralizacji przy najwyższym badanym stężeniu przeciwciał.

W przypadku wirusów genotypu 6a postawiono hipotezę, że brak wiązania może być spowodowany przez adaptacyjną zmianę w sekwencji aminokwasowej (N417T), powodującą

przesunięcie miejsca glikozylacji z N417 na N415. Z drugiej strony zaobserwowany przez nas brak neutralizacji genotypu 3a czy słabsza neutralizacja genotypów 2a i 2b nie były bezpośrednio związane ze zmianami w sekwencji aminokwasowej rejonu 412-425 pochodzącego z tych genotypów, ale najprawdopodobniej wynikały ze zjawiska „przysłaniania epitopu”. Zjawisko to jest opisane dla glikoproteiny E2 i może przyjąć formę maskowania przez gęstą sieć glikanów, eksponowania bardziej immunogennych epitopów, zmiany struktury epitopu czy nawet całej struktury domen docelowego białka w sposób uniemożliwiający wiązania przeciwciał neutralizujących.

7.2.3 Wnioski:

1. Uzyskaliśmy ekspresję chimerycznych cząsteczek wirusopodobnych opartych na białku sHBsAg prezentujących na swojej powierzchni liniowe epitopy pochodzące z glikoproteiny E2 wirusa HCV (epitopy 412-425, 434-446, 502-520, 523-535) w formie pojedynczej lub podwójnej.
2. Linia *L. tarentolae* produkująca białko sHBsAg_434-446 osiągała znacząco niższą gęstość optyczną. Białko, choć tworzyło VLPs, było obecne w lizacie komórkowym w istotnie mniejszej ilości. Immunizacja myszy wykazała, że przeciwciała wzbudzone przez VLPs sHBsAg_434-446 wiązały peptyd odpowiadający sekwencji epitopu II, jednak nie wiązały białka HBsAg w teście ELISA. Wynik ten może sugerować, że epitop 434-446 może mieć wpływ na strukturę lub immunogenność hydrofilowej pętli białka sHBsAg.
3. Przeciwciała wzbudzone przez VLPs prezentujące na swojej powierzchni pojedynczy epitop 412-425, 502-520 lub 523-535 wydajnie wiążą się z białkiem nośnikowym (sHBsAg). Słabe wiązanie lub całkowity jego brak zaobserwowano dla przeciwciał wzbudzonych przez cząsteczki prezentujące pojedynczy epitop 434-446 oraz przez cząsteczki prezentujące podwójne epitopy.
4. Wszystkie uzyskane cząsteczki wzbudzają przeciwciała wydajnie wiążące się z peptydami pokrywającymi sekwencję wykorzystanych epitopów.
5. Przeciwciała wzbudzone poprzez szczepienie VLPs prezentującymi epitopy 412-425 oraz 523-535 są w stanie wiązać się do natywnej formy kompleksu glikoprotein E1E2 pochodzącego z różnych genotypów wirusa HCV.
6. Efekt neutralizacji HCVcc jest obecny tylko w surowicach zwierząt szczepionych konstruktami eksponującymi epitop 412-425 glikoproteiny E2. Takie surowice charakteryzowały się wysokim mianem przeciwciał zdolnych do neutralizacji wirusa

HCV pochodzącego z różnych genotypów krążących w populacji ludzkiej. Przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi 523-535 nie neutralizowały HCVcc, co podkreśla znaczenie przeciwciał konformacyjnych skierowanych przeciwko temu epitopowi dla skutecznej neutralizacji wirusa.

7. Różnice w poziomach neutralizacji HCVcc przez przeciwciała sHBsAg₄₁₂₋₄₂₅ nie mogły być wyjaśnione wyłącznie przez różnice w sekwencjach epitopu I w różnych genotypach HCV. Ten wynik sugeruje wpływ zjawiska „przysłaniania epitopu” w ucieczce HCV przed przeciwciałami neutralizującymi.
8. Wyniki badań potwierdzają, że epitop I pozostaje najbardziej obiecującym celem dla racjonalnie zaprojektowanych szczepionek chroniących przed zakażeniem HCV.

7.3 Praca 3.

The effect of glycan shift on antibodies against HCV E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles.

Czarnota A, Offersgaard A, Owsianka A, Bukh J, Gottwein JM, Patel AH, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. (2023) *Microbiology Spectrum*
<https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

7.3.1 Cel pracy i uzasadnienie badań:

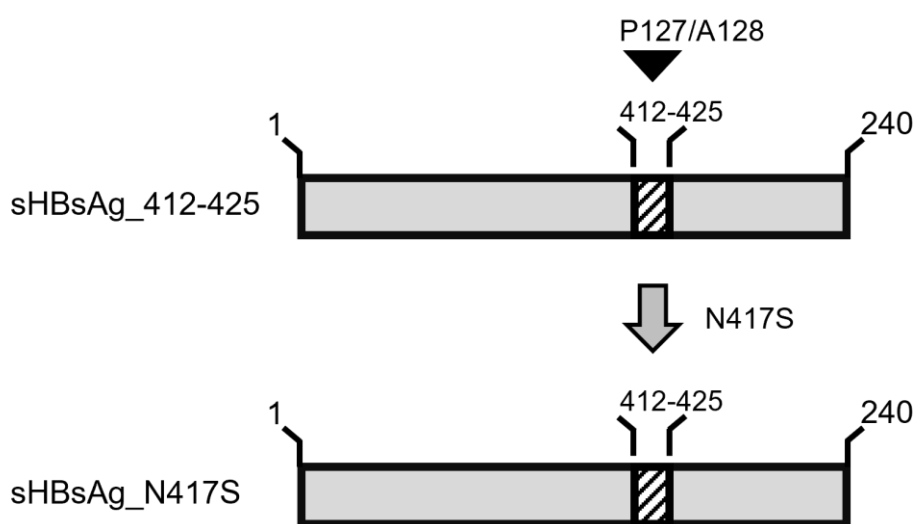
We wcześniejszych badaniach (Czarnota 2016, Czarnota, 2020) pokazałam, że VLPs oparte na białku sHBsAg prezentujące na swojej powierzchni epitop I glikoproteiny E2 HCV są silnie immunogenne i wzbudzają przeciwciała neutralizujące wirusy pochodzące z różnych genotypów HCV. Sugeruje to, że epitop I jest interesującym celem dla racjonalnie zaprojektowanych szczepionek przeciwko HCV.

Znanych jest wiele neutralizujących przeciwciał wiążących się z epitopem I, w tym mysie przeciwciało AP33 czy ludzkie przeciwciała HC33.1 i HCV1. Epitop I posiada miejsce N-glikozylacji N417, definiowane przez klasyczną sekwencję sygnałową N-X-S/T. Zmiana N417 na S417 lub T417 (N417S/T) może przesunąć miejsce N-glikozylacji (N1) na pozycję N415. Ten mechanizm wraz ze zmiennością sekwencji aminokwasowej czy osłaniania cząsteczek wirusowych za pomocą glikanów, stanowi jedną z wielu poznanych strategii wirusa HCV na ucieczkę przed układem immunologicznym gospodarza. Choć warianty wirusa HCV niosące zmiany przesunięcia glikanów N417S/T występują z małą częstotliwością w naturalnej

populacji HCV, są one silnie selekcjonowane podczas immunoterapii za pomocą neutralizujących przeciwciał monoklonalnych wiążących epitop I. Sugeruje to, że w przypadku szczepionek wzbudzających odpowiedź humoralną przeciwko epitopowi I powinno się scharakteryzować wiązanie do obu glikowariantów E2 oraz zaproponować antygeny zdolne do przewyciężenia mechanizmów ucieczki wirusa przed układem immunologicznym związanych ze zjawiskiem przesunięcia glikanów.

7.3.2 Wyniki:

Aby zbadać ucieczkę HCV związaną z przesunięciem glikanów, skonstruowałam VLPs sHBsAg_N417S niosące sekwencję 412-425 E2 ze zmianą N417S (QLINTSGSWHINST), wprowadzając w ten sposób sekwencję sygnałową przesuwającą glikan N1 z pozycji N417 na N415. sHBsAg_N417S porównano z wcześniej opisanymi VLPs sHBsAg_412-425 prezentującymi epitop 412-425 typu dzikiego (QLINTNGSWHINST) (Ryc. 9).



Rycina 9. Schemat utworzenia chimerycznego białka sHBsAg_N417S. Konstrukcja sHBsAg_N417S została stworzona poprzez wprowadzenie zmiany N417S do sekwencji epitopu HCV białka sHBsAg_412-425. W obu konstrukcjach epitopy HCV zostały wprowadzone do sekwencji kodującej pętlę hydrofilową białka sHBsAg w pozycji P127/A128 – miejsce insercji zaznaczone z czarną strzałką.

Produkcję VLPs przeprowadzono zgodnie z opisanym wcześniej protokołem (Czarnota, 2016 oraz Czarnota, 2020). W celu dokładniejszej analizy otrzymanych VLPs wykorzystano przeciwciała AP33, swoiście wiążące epitop I typu dzikiego. We wcześniejszych badaniach opisano brak wiązania AP33 w przypadku, gdy do kompleksu glikoprotein E1E2 wprowadzono zmianę N417S/T. Jednak w przypadku VLPs sHBsAg_N417S zaobserwowaliśmy, że pomimo

zmiany N417S, zarówno w teście ELISA jak i w barwieniu z użyciem przeciwciał skoniugowanych z nanocząsteczkami złota, AP33 wiązały epitop 412-425:N417S prezentowany na powierzchni VLP z taką samą wydajnością jak epitop 412-425:WT prezentowany na powierzchni sHBsAg_412-425. Można to wyjaśnić faktem, że prezentacja epitopu 412-425:N417S na powierzchni VLPs różni się konformacyjnie od prezentacji w kontekście natywnego kompleksu glikoprotein E1E2. Wiązanie AP33 zaobserwowano także dla VLP sHBsAg_N417S produkowanych w komórkach ssaczych HEK293-F, co wyklucza możliwość, że wiązanie AP33 jest spowodowane zmianami we wzorze glikozylacji białek produkowanych w systemie *L.tarentolae*. Immunizacja myszy wykazała, że zarówno VLPs sHBsAg_412-425, jak i sHBsAg_N417S wywołują swoistą odpowiedź przeciwciał skierowaną przeciwko peptydom odpowiadającym sekwencjom aminokwasowym epitopów 412-425:WT oraz 412-425:N417S. Wyniki te sugerują, że immunizacja VLP niosącymi epitop 412-425 może wywołać odpowiedź przeciwciał przeciwko liniowym peptydom niezależnie od zmiany N417S.

Warto podkreślić, że przeciwciała wzbudzone zarówno przez VLP sHBsAg_412-425, jak i sHBsAg_N417S wykazywały znaczące różnice w wiązaniu glikoprotein E1E2 w zależności od ich statusu N-glikozylacji. Surowice sHBsAg_412-425, podobnie jak AP33, skutecznie wiązały się z E1E2 z miejscem glikozylacji N1 w pozycji N417 (E1E2:WT) zarówno w warunkach natywnych, jak i zdenaturowanych/zredukowanych; jednak nie rozpoznawały one natywnego kompleksu E1E2 ze zmianą N417S (E1E2:N417S). Wiązanie to można było częściowo przywrócić przez inkubację surowic sHBsAg_412-425 lub AP33 ze zdenaturowanym/zredukowanym kompleksem E1E2:N417S, a efekt ten nie został zmieniony przez dodatkową deglikozylację. Wyniki te sugerują, że brak wiązania mysich surowic sHBsAg_412-425 z E1E2:N417S nie jest związany jedynie z obecnością miejsca N-glikozylacji w pozycji N415, ani ze zmianą aminokwasów w epitopie I, ale najprawdopodobniej jest skutkiem zmiany konformacyjnej w obrębie epitopu I.

W przypadku surowic sHBsAg_N417S zaobserwowaliśmy bardzo dobre powinowactwo do glikoprotein E1E2:N417 i całkowity brak wiązania do kompleksu E1E2:WT, zarówno w warunkach natywnych jak i denaturująco/redukujących. Słabe wiązanie surowicy sHBsAg_N417S z E1E2:WT zaobserwowano tylko po całkowitej deglikozylacji kompleksu. Wynik ten sugeruje, że wiązanie przeciwciał wzbudzonych przez sHBsAg_N417S jest przynajmniej częściowo ograniczone przez obecność N-glikanu w pozycji N417.

Aby porównać profil wiązania surowicy sHBsAg_412-425 i przeciwciał AP33, przeprowadziłam analizę z wykorzystaniem panelu mutantów kompleksu glikoprotein E1E2 pochodzących z genotypu 1a H77C, w których każdy aminokwas w epitopie 412-423 został zastąpiony alaniną. Surowica sHBsAg_412-425 nie wiązała mutantów posiadających zmianę w pozycjach L413, G418 oraz W420, a dla pozycji N415 zaobserwowałam znaczące obniżenie powinowactwa. Otrzymany profil wiązania był analogiczny do profilu otrzymanego dla nAb AP33 i zgodny z doniesieniami literaturowymi opisującymi aminokwasy kluczowe dla przeciwciał AP33.

Wyniki testu neutralizacji wirusa HCVcc dodatkowo podkreślają różnice w wiązaniu surowicy sHBsAg_412-425 i sHBsAg_N417S do glikoprotein E1E2. Przeciwciała oczyszczone z surowic sHBsAg_412-425 skutecznie neutralizowały izolaty pochodzące z genotypu 1a (H77:WT) jak i genotypu 2a (Jc1:WT) Jc1, ale nie wykazywały aktywności neutralizującej w stosunku do izolatów z wprowadzoną zmianą N417S (H77:N417S oraz Jc1:N417S). Analogiczne wyniki uzyskano dla przeciwciał AP33. Z kolei przeciwciała sHBsAg_N417S nie neutralizowały H77:WT, Jc1:WT, częściowo neutralizowały Jc1:N417S, ale nie H77:N417S.

W naszym poprzednim badaniu zaobserwowaliśmy wysoce skuteczną neutralizację HCVcc pochodzącego z genotypu 5a przez surowice sHBsAg_412-425. Z drugiej strony, surowica ta nie neutralizowała genotypu 6a. Ponieważ sekwencja 412-425 w izolatach pochodzących z genotypów 5a i 6a HCVcc różni się tylko zmianą N417T, zaproponowaliśmy, że brak wiązania może wynikać z przesunięcia miejsca glikozylacji. W niniejszym badaniu potwierdziliśmy wysoce skuteczną neutralizację HCVcc genotypu 5a przez przeciwciała sHBsAg_412-425 oraz AP33. Zgodnie z oczekiwaniami, nie zaobserwowano neutralizacji genotypu 5a HCVcc przez przeciwciała oczyszczone z surowicy sHBsAg_N417S. Jednak przeciwciała indukowane sHBsAg_N417S nie zneutralizowały również genotypu 6a HCVcc. Wyniki te sugerują, że przeciwciała wzbudzane przez VLP sHBsAg_N417S mają ograniczoną zdolność do neutralizacji *in vitro*.

7.3.3 Wnioski:

1. Uzyskaliśmy ekspresję chimerycznych VLPs sHBsAg_N417S prezentujących na swojej powierzchni epitop I z wprowadzoną zmianą N417S skutkującą przesunięciem miejsca glikozylacji z pozycji N417 na N415.

2. Epitop 412-425:N417S prezentowany na powierzchni VLPs opartych na sHBsAg jest rozpoznawany przez przeciwciała AP33, które w kontekście kompleksu glikoprotein E1E2 są wrażliwe na zmianę N417S.
3. Przeciwciała wzbudzone przez sHBsAg_N417S jak i sHBsAg_412-425 wiążą się z peptydami odpowiadającym sekwencją aminokwasową epitopowi I typu dzikiego (412-425:WT) jak i epitopowi ze zmianą N417S (412-425:N417S). Ten wynik sugeruje, że obecność N lub S w pozycji 417 nie ma wpływu na wiązanie surowic.
4. Surowice sHBsAg_412-425 oraz sHBsAg_N417S wykazują odmienne wzory wiązania do kompleksu glikoprotein E1E2. Surowica sHBsAg_412-425 wykazuje wrażliwość na obecność zmiany N417S, jednak nie jest to jedynie związane z obecnością miejsca N-glikozylacji w pozycji N415, ale najprawdopodobniej jest także skutkiem zmiany konformacyjnej w obrębie epitopu I. Z kolei wyniki otrzymane dla surowicy sHBsAg_N417S sugerują, że jej wiązanie jest przynajmniej częściowo ograniczone przez obecność N-glikanu w pozycji N417.
5. Doświadczenia przeprowadzone z kompleksami glikoprotein E1E2 oraz testy neutralizacji pokazały, że przeciwciała skierowane przeciwko epitopowi I wzbudzone przez VLPs sHBsAg_412-425 wykazują wzór wiązania analogiczny do przeciwciał AP33.
6. Otrzymane wyniki nasuwają pytanie o wpływ zmian znajdujących się poza epitopem I na lokalną konformację epitopu i wiązanie przeciwciał oraz sugerują, że przyszłe antygeny szczepionkowe powinny wzbudzać odpowiedź humoralną przeciwko glikoproteinom E2 prezentującym wiele wariantów glikozylacji i konformacji epitopu I.

8. Wnioski końcowe:

1. System oparty na pierwotniaku *L. tarentolae* pozwala na wydajną produkcję VLPs opartych na białku sHBsAg. Częsteczki wyprodukowane w tym systemie nie są eksportowane do pożywki hodowlanej i muszą zostać oczyszczone z lizatu komórkowego. Zarówno cząsteczki zbudowane z białka typu dzikiego (sHBsAg_wt) jak i chimeryczne cząsteczki HBV-HCV były modyfikowane potranslacyjnie poprzez N-glikozylację.
2. Prezentacja epitopu I glikoproteiny E2 HCV na powierzchni cząstek wirusopodobnych (VLPs) opartych na powierzchniowym białku wirusa HBV (sHBsAg) powoduje wzbudzenie silnej odpowiedzi humoralnej. Powstałe przeciwciała neutralizują różne genotypy wirusa HCV *in vitro*, przy czym charakteryzuje je profil wiązania podobny do przeciwciała monoklonalnego AP33.
3. Właściwości antygenowe epitopu I glikoproteiny E2 pokazują, że może być on elementem racjonalnie zaprojektowanej szczepionki chroniącej przed zakażeniem wirusem HCV.
4. Ze względu na występowanie glikowariantów epitopu I glikoproteiny E2 umożliwiających ucieczkę przed przeciwciałami wiążącymi ten epitop, w przyszłości konieczne będzie opracowanie antygeny lub kombinacji antygenów prezentujących epitop I w optymalnej konformacji.
5. Białko sHBsAg wykorzystane jako nośnik w chimerycznych cząsteczkach HBV-HCV zachowuje swoją immunogenność i wzbudza silną, swoistą odpowiedź zarówno humoralną jak i komórkową. Chimeryczne cząsteczki HBV-HCV mogłyby być użyte jako biwalentna szczepionka przeciwko HCV i HBV.

9. Osiągnięcia naukowe

9.1 Publikacje naukowe

9.1.1 Publikacje stanowiące część doktoratu

- Czarnota, A., Tyborowska, J., Peszyńska-Sularz, G., Gromadzka, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., Grzyb, K. (2016). Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microbial cell factories*, 15, 62. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>
- Czarnota, A., Offersgaard, A., Pihl, A. F., Prentoe, J., Bukh, J., Gottwein, J. M., Bieńkowska-Szewczyk, K., Grzyb, K. (2020). Specific Antibodies Induced by

Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*, 8(2), 294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

- Czarnota A., Offersgaard A., Owsianka A., Alzua G. P., Bukh J., Gottwein J. M., Patel A. H., Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K. (2023) The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. *Microbiology Spectrum* <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

9.1.2 Publikacje dodatkowe

- Panasiuk, M., Zimmer, K., Czarnota, A., Narajczyk, M., Peszyńska-Sularz, G., Chraniuk, M., Hovhannisyanyan, L., Żołądowska, S., Nidzworski, D., Żaczek, A. J., Gromadzka, B. (2022). Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 160. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01357-1>
- Chmielewska, A. M.#, Czarnota, A.#, Bieńkowska-Szewczyk, K., Grzyb, K. (2021). Immune response against SARS-CoV-2 variants: the role of neutralization assays. *NPJ vaccines*, 6(1), 142. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00404-6>
#równocenny wkład w pracę
- Panasiuk, M., Zimmer, K., Czarnota, A., Grzyb, K., Narajczyk, M., Peszyńska-Sularz, G., Żołądowska, S., Nidzworski, D., Hovhannisyanyan, L., Gromadzka, B. (2021). Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. *Microbial cell factories*, 20(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01677-1>
- Śmietanka, K., Tyborowska, J., Olszewska-Tomczyk, M., Domańska-Blicharz, K., Minta, Z., Rabalski, L., Czarnota, A., Kucharczyk, K., Szewczyk, B. (2019). A Recombinant Turkey Herpesvirus Expressing F and HN Genes of Avian Avulavirus-1 (AAvV-1) Genotype VI Confers Cross-Protection against Challenge with Virulent AAvV-1 Genotypes IV and VII in Chickens. *Viruses*, 11(9), 784. <https://doi.org/10.3390/v11090784>
- Grzyb, K., Czarnota, A., Brzozowska, A., Cieślik, A., Rąbalski, Ł., Tyborowska, J., Bieńkowska-Szewczyk, K. (2016). Immunogenicity and functional characterization of

Leishmania-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Scientific reports*, 6, 30627. <https://doi.org/10.1038/srep30627>

9.2 Konferencje naukowe

9.2.1 Wystąpienia ustne

- Czarnota A.*, Zalewski P., Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K. “Characterization of anti-hepatitis C neutralizing antibody response after immunization with chimeric hepatitis B/hepatitis C virus like particles.” International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology 25-26 Lutego 2021 Warszawa
 - Czarnota A.*, Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K. “Characterization of anti-hepatitis C neutralizing antibody response after immunization with chimeric hepatitis B/hepatitis C virus like particles.” 7th European Seminar in Virology (EuSeV) 14-16 Czerwca 2019 Padwa, Włochy
 - Czarnota A.*, Grzyb K., “The immunogenic vaccine against HCV and HBV” Bioinnovation 2017, 19-20 Października 2017 Gdańsk
 - Grzyb K., Czarnota A.*, Bieńkowska-Szewczyk K., ”Immunogenic vaccine against HCV and HBV” Biovaria 17 maja 2016 Monachium, Niemcy
- (*) Autor prezentujący

9.2.2 Postery

- Czarnota A., Raszplewicz A., Chmielewska A., Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K.* „Combined DNA vaccination with chimeric HBV-HCV virus-like particles and NS3/4A protease induces a potent humoral and cellular responses against HCV” 16th Vaccine Congress 12-14 Września 2022 Riva del Garda, Włochy
- Czarnota A.*, Offersgaard A., Owsianka A., Bukh J., Gottwein J. M., Patel A. H., Krystyna Bieńkowska-Szewczyk K., Katarzyna Grzyb K. ”The effect of glycan shift on antibodies elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles carrying HCV E2 412-425 epitope” 28th International Symposium on Hepatitis C Virus, Flaviviruses, and Related Viruses 6-9 Lipca 2022 Gandawa, Belgia
- Czarnota A.*, Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K. “The effect of glycan shift on antibodies elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles carrying HCV E2

412- 425 epitope.” 27th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses 6-9 Lipca 2021 Montreal, Kanada (online)

- Czarnota A.*, Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K., “Immunogenicity of the conserved HCV E2 glycoprotein epitopes exposed on the surface of the Hepatitis B small surface antigen VLPs.” 25th International symposium on hepatitis C virus and related viruses, 11-14 Października 2018, Dublin, Irlandia
- Czarnota, A.*, Tyborowska, J., Peszyńska-Sularz, G., Gromadzka, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., Grzyb, K. “Immunogenicity of highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus exposed on the surface of Leishmania-derived hepatitis B small antigen particles” 23rd International symposium on hepatitis C virus and related viruses, 11-15 Października 2016 Kioto, Japonia
- Czarnota A.*, Tyborowska J., Peszyńska Sularz G., Gromadzka B., Bieńkowska-Szewczyk K., Grzyb K., “Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus” 12-15 Kwietnia 2016 Biotech solutions for health and environment, Gdańsk
- Grzyb K.*, Czarnota A., Brzozowska A., Cieślik A., Rabalski Ł., Tyborowska J., Peszyńska Sularz G., Bieńkowska-Szewczyk K., “Functional characterization and immunogenicity study of hepatitis C virus envelope glycoprotein complex recombinantly expressed by the protozoan *Leishmania tarentolae*” 22nd International symposium on hepatitis C virus and related viruses 9-13 Października 2015, Strasbourg, Francja

(*) Autor prezentujący

9.3 Zgłoszenia patentowe

9.3.1 Zgłoszenia patentowe do Urzędu Patentowego Rzeczypospolitej Polskiej

- Grzyb K. Czarnota A., Bieńkowska-Szewczyk K. Szczepionka, sposób jej otrzymywania, wyizolowane chimeryczne białko, wektor ekspresyjny, zestaw zawierający szczepionkę oraz kompozycja do zastosowania w profilaktyce zakażeń powodowanych przez HCV i/lub HBV (Pat.230663) Przyznano 2 sierpnia 2018
- Grzyb K., Czarnota A. Sekwencje antygenowe do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia wirusem HCV i/lub HBV, kompozycje sekwencji antygenowych wirusa HCV do zastosowania w leczeniu prewencyjnym zakażenia wirusem HCV i/lub HBV (P.427320) Data zgłoszenia – 1 października 2018

- Król, E., Szewczyk, B., Brzuska, G., Czarnota, A. Sekwencje aminokwasowe rekombinowanych białek flawiwirusowych oraz rekombinowanych flawiwirusowych cząstek wirusopodobnych, ich zastosowanie do zapobiegania zakażeniom wirusem Zika oraz zastosowanie diagnostyczne in vitro (P.430234), Data zgłoszenia – 13 czerwca 2019

9.3.2 Zgłoszenia do Europejskiego Urzędu Patentowego

- Grzyb K. Czarnota A., Bieńkowska-Szewczyk K. An immunogenic vaccine against the HCV and/or HBV An immunogenic vaccine against the HCV and/or HBV (EP3244921) Przyznano 28 sierpnia 2019
- Król, E., Szewczyk, B., Brzuska, G., Czarnota, A. Amino acid sequences of recombinant flaviviral virus-like particles, their medical use in the prevention of Zika virus infection (EP20751675.8) Przyznano 20 kwietnia 2020

9.4 Granty naukowe

- Grant uzyskany w wyniku Konkursu Projektów Badawczych dla Uczestników Interdyscyplinarnych Przyrodniczo-Matematycznych Studiów Doktoranckich UG-GUMed (2021). Ocena odpowiedzi humoralnej wzbudzonej przez cząsteczki wirusopodobne eksponujące dwie formy epitopu 412-425 glikoproteiny E2 wirusa HCV.
- Grant NCN – Preludium 2016/23/N/NZ6/02503 Ocena immunogenności silnie konserwowanych epitopów glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C eksponowanych na powierzchni cząsteczek wirusopodobnych opartych na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B.

10. Załącznik 1.

Pełna wersja publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską. Publikacje zostały załączone zgodnie z kolejnością przedstawioną w punkcie 7.

RESEARCH

Open Access



Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus

Anna Czarnota¹, Jolanta Tyborowska², Grażyna Peszyńska-Sularz³, Beata Gromadzka², Krystyna Bieńkowska-Szewczyk¹ and Katarzyna Grzyb^{1*}

Abstract

Background: Hepatitis C virus (HCV) infection is a major health problem worldwide, affecting an estimated 2–3 % of human population. An HCV vaccine, however, remains unavailable. High viral diversity poses a challenge in developing a vaccine capable of eliciting a broad neutralizing antibody response against all HCV genotypes. The small surface antigen (sHBsAg) of hepatitis B virus (HBV) has the ability to form highly immunogenic subviral particles which are currently used as an efficient anti-HBV vaccine. It also represents an attractive antigen carrier for the delivery of foreign sequences. In the present study, we propose a bivalent vaccine candidate based on novel chimeric particles in which highly conserved epitope of HCV E2 glycoprotein (residues 412–425) was inserted into the hydrophilic loop of sHBsAg.

Results: The expression of chimeric protein was performed in an unconventional, *Leishmania tarentolae* expression system resulting in an assembly of particles which retained immunogenicity of both HCV epitope and sHBsAg protein. Direct transmission electron microscopy observation and immunogold staining confirmed the formation of spherical particles approximately 22 nm in diameter, and proper foreign epitope exposition. Furthermore, the sera of mice immunized with chimeric particles proved reactive not only to purified yeast-derived sHBsAg proteins but also HCV E2 412–425 synthetic peptide. Most importantly, they were also able to cross-react with E1E2 complexes from different HCV genotypes.

Conclusions: For the first time, we confirmed successful assembly of chimeric sHBsAg virus-like particles (VLPs) in the *L. tarentolae* expression system which has the potential to produce high-yields of properly N-glycosylated mammalian proteins. We also proved that chimeric *Leishmania*-derived VLPs are highly immunogenic and able to elicit cross-reactive antibody response against HCV. This approach may prove useful in the development of a bivalent prophylactic vaccine against HBV and HCV and opens up a new and low-cost opportunity for the production of chimeric sHBsAg VLPs requiring N-glycosylation process for their proper functionality and immunogenicity.

Keywords: Hepatitis C virus (HCV), HBV small surface antigen (sHBsAg), VLP, *Leishmania tarentolae*, Vaccine

Background

Although recent advances in hepatitis C treatment give reasons for optimism, a prophylactic vaccine for hepatitis C virus (HCV) remains an elusive goal. The recently

developed direct-acting antiviral drugs (DAAs) have improved the sustained viral response (SVR) rates up to even 99 % for Sofosbuvir/Ledipasvir therapy [1]. Unfortunately, the cost of the DAA therapy is still extremely high [2]. Considering the above, the development of an effective prophylactic vaccine against HCV should be a medical priority. HCV infection affects an estimated 2–3 % of human population and the number is even higher in undeveloped countries, including Egypt with the HCV

*Correspondence: katarzyna.grzyb@biotech.ug.edu.pl

¹ Laboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-MUG, University of Gdańsk, A. Abrahamowa 58, 80-307 Gdańsk, Poland

Full list of author information is available at the end of the article

prevalence of 20 % [3]. Approximately 70–80 % of the infected individuals develop chronic liver disease, which can lead to cirrhosis and liver carcinoma.

HCV is a member of the *Flaviviridae* family. Its single stranded positive-sense RNA genome codes for both structural and non-structural viral proteins. The HCV nucleocapsid is surrounded by E1E2 envelope glycoproteins embedded in a lipid envelope. E1 and E2 glycoproteins constitute a potential target for the development of a prophylactic HCV vaccine, as they are involved in virus–host interaction, and the antibodies directed against these proteins seem to neutralize HCV [4]. Due to the fact that resolution of HCV infection is mediated not only by a broad and potent T cell response [5], but also by the neutralizing antibodies (nAbs) raised mainly against HCV E1E2 heterodimer [6, 7], a prophylactic vaccine consisting of adjuvanted recombinant E1E2 heterodimer was proposed. The most advanced approach included immunization with E1E2 complex expressed in Chinese hamster ovary (CHO) cell line. Phase I clinical trials indicated that immunization with glycosylated envelope proteins resulted in potent nAbs and CD 4⁺ T-cell responses [8, 9].

The major obstacle in the development of a protective immunity against HCV is its high genetic diversity and variability. In recent studies, HBV capsid-like particles (CLPs) were used to present variants of the HCV E2 glycoprotein hyper-variable region 1 (HVR1). HVR1 is one of the most immunogenic regions of glycoprotein E2, but its constant evolution and diversity along HCV genotypes leads to limited cross-reactivity of the elicited antibodies [10]. The region located downstream of HVR1 contains a potent and highly conserved epitope first identified by the mouse monoclonal antibody AP33. The region, spanning residues 412–423 of glycoprotein E2, can elicit broadly nAbs capable of inhibiting HCV, both in vitro and in vivo [11, 12]. Epitope AP33 is highly conserved among over 5500 E2 sequences in the GenBank database and mostly regarded as a linear epitope [11]. These features make 412–423 residues a perfect peptide antigen expressed on various antigen carriers. Moreover, the region is only 13 amino acids long and does not include any additional cysteine residue that could result in formation of non-authentic disulfide bonds and disrupt the carrier structure [13]. In general, peptide vaccines used in isolation are weakly immunogenic and require some carries for delivery [14]. This finds support in a recently published report which shows that monoclonal antibodies (mAbs) generated against a cyclic variant of the AP33 epitope bind poorly to E2 and do not neutralize the virus [15].

Yeast-derived HBV small surface antigen (sHBsAg) forms particles 22 nm in diameter currently used worldwide as the commercial recombinant hepatitis B vaccine. sHBsAg tertiary structure forms a highly conserved,

hydrophilic loop containing the major B-cell epitopes also known as the “a”-determinant [16, 17]. Because of its immunogenic potential, sHBsAg was also applied as an antigen carrier to deliver foreign sequences and induce anti-foreign humoral and cellular responses [13, 18–25].

The present study focused on construction, characterization and immunological studies of novel sHBsAg chimeric particles produced in the *L. tarentolae* expression system. The system enables production of recombinant proteins with their mammalian-like N-glycosylation pattern. Moreover, *L. tarentolae* can grow in biofermenters to a high cell density and the recombinant protein production yield can reach several milligrams per liter of culture [26, 27]. Here, we propose a new vaccine candidate based on chimeric particles in which the HCV E2 glycoprotein region (aa 412–425) is inserted within the “a”-determinant loop of sHBsAg. We show that *Leishmania*-derived HBV/HCV chimeric particles elicit promising titers of cross-reactive antibodies against HCV. These particles also induce both humoral and cellular immune response against HBV, opening a new and low-cost approach to bivalent vaccine development.

Results

Expression and characterization of sHBsAg and 412–425_sHBsAg particles

The HCV E2 glycoprotein region spanning 412–425 residues was chosen as the epitope of broadly neutralizing properties [28] and inserted into the major antigenic loop of HBV sHBsAg protein (Fig. 1). The expression of the recombinant proteins was carried out in high-density cell cultures of recombinant parasites, using tetracycline-inducible *L. tarentolae* expression system. The expression of proteins was confirmed by immunofluorescence (Fig. 2a), western blot (Fig. 2b) and ELISA (Fig. 2c) with protein-specific antibodies: anti-HBsAg and anti-E2 (AP33). The confocal studies indicate that both proteins are predominantly located in the cytosol of *L. tarentolae* cells, probably in endoplasmic reticulum (ER). No particle secretion into the culture medium was observed. The western blot analysis of cell lysates



Fig. 1 Schematic illustration of the sHBsAg sequence with the foreign HCV E2 412–425 epitope inserted into the “a”-determinant region. The sHBsAg insertion site corresponding to amino acid positions 127 and 128 is marked red. The numbering corresponds to the amino acid positions in the sHBsAg protein. The 412–425 epitope of the HCV E2 glycoprotein is shown in green

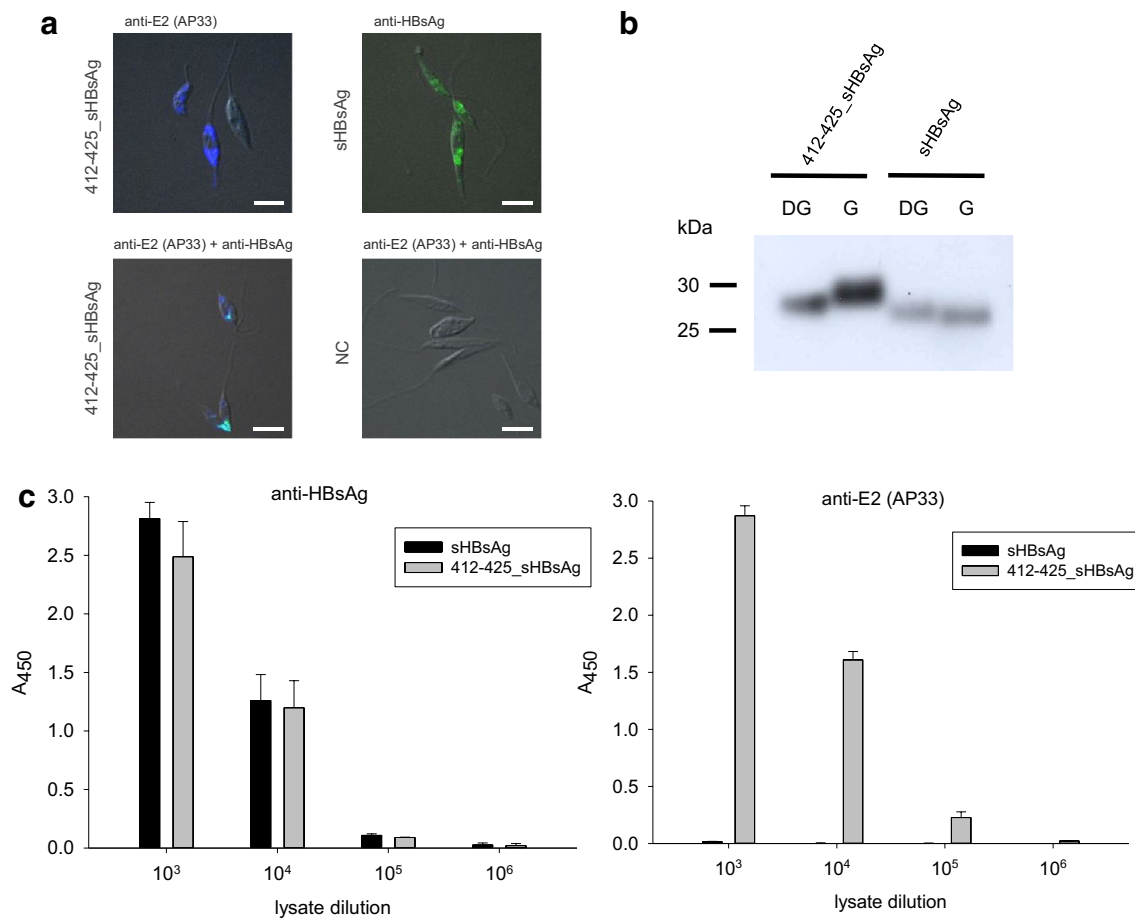


Fig. 2 Characterization of the particles expressed in the *L. tarentolae* system. **a** Immunofluorescence of recombinant *L. tarentolae* cells transfected with plasmids expressing 412–425_sHBsAg and sHBsAg. Cells transfected with empty *pLEXSY-1-blecherry3* plasmid were used as negative control (NC). The staining was carried out using AP33 mAbs (blue) and anti-HBsAg Abs (green), scale bar = 5 μ m. **b** Western blot analysis of the *Leishmania*-derived particles in reducing conditions. sHBsAg and 412–425_sHBsAg were treated with PNGase F and detected using the anti-HBsAg specific antibody. G represents the glycosylated and DG deglycosylated form of protein. **c** Recognition of particles with anti-HBsAg and AP33 Abs in the ELISA tests. ELISA plates were coated with serial dilutions of recombinant *L. tarentolae* cell lysates containing sHBsAg and 412–425_sHBsAg particles. The dilution factor is depicted on x-axis. For each ELISA assay, the mean from three independent experiments performed in duplicate is shown. The mean A_{450} values and standard deviations are shown on the y-axis. The background from the *L. tarentolae* wild-type cell lysate in each dilution was subtracted from the obtained results

showed that in reducing conditions, the molecular masses of monomers of sHBsAg and 412–425_sHBsAg were approximately 27 and 30 kDa, respectively (Fig. 2b). The difference in the molecular masses of the monomers is probably associated not only with the insertion of the 14 aa long fragment but also with the molecular mass of the N-glycans. The chimeric protein 412–425_sHBsAg contains two additional N-glycosylation sites at positions 417 and 423 versus the wild-type sHBsAg. N-glycosylation of 412–425_sHBsAg was confirmed by reaction with PNGase E, where a decrease in the protein molecular weight after endoglycosidase digestion was observed (Fig. 2b). In ELISA

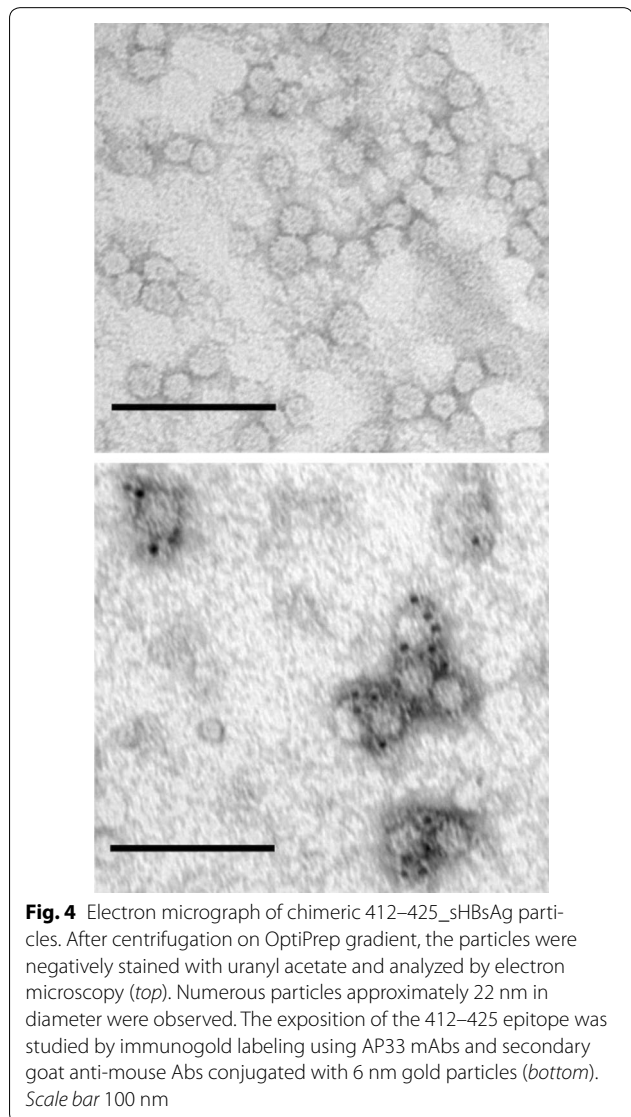
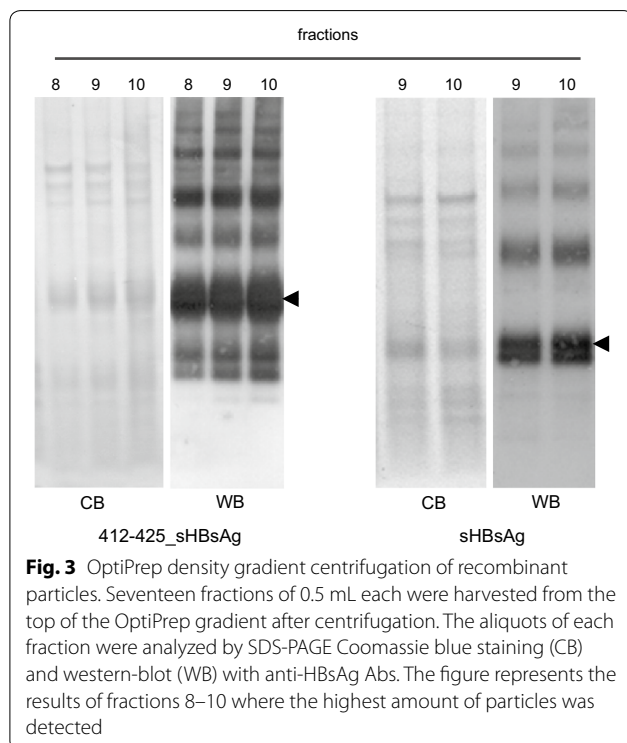
test, 412–425_sHBsAg chimeric particles were specifically and efficiently recognized by neutralizing AP33 mAb with no cross-reactivity with sHBsAg particles. 412–425_sHBsAg particles were also recognized by polyclonal anti-HBsAg antibodies at the efficacy similar to that of sHBsAg (Fig. 2c).

The sHBsAg and 412–425_sHBsAg particles were partially purified from cell lysate by ultracentrifugation on OptiPrep gradient, and 0.5 mL fractions were harvested and analyzed by western blot using anti-HBsAg antibodies. The purity of the fractions was estimated with Coomassie stained SDS-PAGE gel (Fig. 3). Multimers of higher molecular mass were also detected for both

proteins. Fractions with the highest concentration of particles were pooled, and protein concentration measured by Bradford assay reached 15–20 mg/L of the induced cell culture. Interestingly, one-step purification process of the particles on OptiPrep gradient proved effective. Finally, electron microscopy analysis of the 412–425_sHBsAg fraction showed spherical-particles approximately 22 nm in diameter, with morphology resembling the icosahedral structures of *P. pastoris*-derived particles [29]. Additionally, immunogold labeling of 412–425_sHBsAg particles with AP33 antibodies specific to the 412–425 epitope revealed selective labeling of 22 nm particles, which suggests strongly that the 412–425 epitope is properly exposed on the surface of sHBsAg particles (Fig. 4). In summary, these results confirm an efficient expression of both sHBsAg and 412–425_sHBsAg proteins as well as a proper exposition of the 412–425 epitope on sHBsAg carrier.

Immunogenicity of sHBsAg and 412–425_sHBsAg particles

To demonstrate immunogenicity of sHBsAg and chimeric 412–425_sHBsAg particles, two groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously on days: 0, 14, and 28 with fractions containing sHBsAg or 412–425_sHBsAg particles. All mice were immunized in presence of a squalene-based oil-in-water nanoemulsion adjuvant. Two weeks after the last vaccination, splenocytes were isolated and T cell response was analyzed by gamma interferon



(IFN- γ) enzyme-linked immune spot (ELISPOT) assay. For splenocytes stimulation we designed peptides covering the entire sHBsAg protein sequence, 15 amino acids in length with an overlap of 10. The peptides were divided into three pools corresponding to amino acid positions: 1–99 (P1 n = 19), 100–188 (P2 n = 16) and 189–240 (P3 n = 9). IFN- γ ELISPOT data were found comparable for both antigens, however a more potent cellular response was noted for 412–425_sHBsAg. The strongest T-cell response was observed for pools 1 and 3 (Fig. 5).

Two weeks after the last immunization blood samples were collected and the antibody titers determined. Pooled sera reacted strongly to the antigens used for immunization, with the endpoint titer reaching as high as 5×10^5 (Fig. 6a). Weaker antibody response was observed for

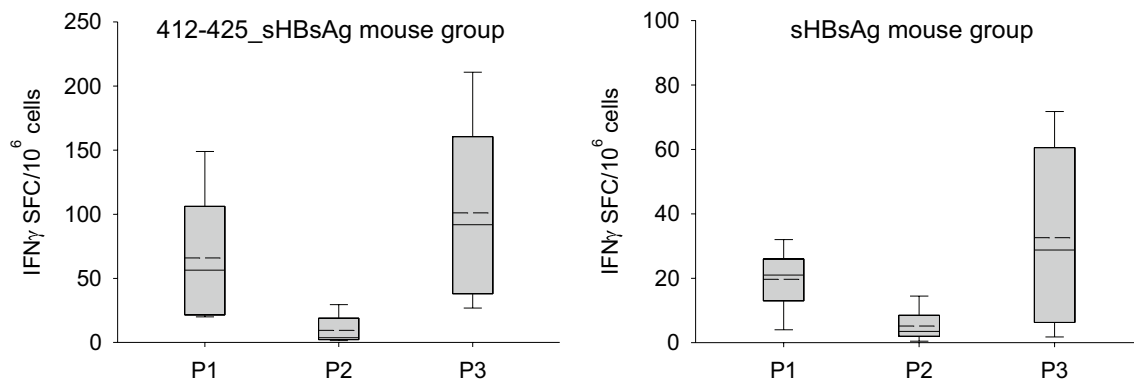


Fig. 5 Analysis of cellular response in BALB/c mice immunized with *Leishmania*-derived particles. Box plot of antigen-specific IFN- γ ELISPOT responses in sHBsAg (right) and 412–425_sHBsAg (left) groups of immunized mice. Splenocytes from six immunized BALB/c mice per group were stimulated with 20 μ g/well of 43 different 15-mer overlapping peptides spanning the sHBsAg protein sequence pooled into three groups (P1, P2, P3). The splenocytes were collected 2 weeks after the last immunization. The gray region is the 25–75th percentile; the horizontal lines indicate the mean (dashed) and median (solid) values

412–425_sHBsAg particles when detected with sera from sHBsAg immunized mice (Fig. 6a right). Detailed serum characterization showed cross-reactivity with both purified yeast-derived HBsAg protein (yHBsAg) and a commercially available HBV vaccine (Engerix-B) (Fig. 6b). The results proved that sera from both groups of mice contained high titers of anti-sHBsAg antibodies, and this suggests that 14 aa foreign epitope insertion within sHBsAg particle does not interfere dramatically with the humoral response against sHBsAg protein itself. Similar induction of anti-HBsAg antibodies was observed in mice immunized with chimeric HBsAg particles which delivered HCV-specific cysteine-containing sequence [13]. However, the immune response against sHBsAg protein was lower in the 412–425_sHBsAg group of mice compared to the sHBsAg wild-type group. Of note, the absorbance values obtained for the purified yHBsAg protein were higher than those obtained from the vaccine (Fig. 6b). This can be caused by the fact that sHBsAg particles in vaccines are associated to aluminium hydroxide which can lower test sensitivity due to epitope coverage [30].

Next, we studied the antibody response of 412–425_sHBsAg particles to 412–425 epitope. Interestingly, sera from the 412–425_sHBsAg group were able to recognize not only the sHBsAg protein (as mentioned above), but also synthetic peptide corresponding to the 412–425 region of HCV E2 glycoprotein. The endpoint titer in peptide ELISA test reached 10^3 . The AP33 standard curve showed that the amount of anti-412–425 epitope antibody in serum corresponded to AP33 antibody concentration of approximately 0.9 mg/mL (Fig. 6c). Furthermore, we decided to test cross-reactivity of the sera from 412–425_sHBsAg immunized mice against E1E2

complex from different HCV genotypes. As expected, the antisera recognized E2 glycoproteins from HCV genotypes 1a, 1b, 2b, 3a, 4, and 6, but failed to recognize E2 derived from genotype five (Fig. 6d). That was due to the fact that genotype five isolate had 4 amino acid changes in region 412–423 in comparison with the sequence used to create 412–425_sHBsAg protein. Such a modification may influence epitope recognition as well as neutralization of the HCV pseudotype particles (HCVpp) [11]. All facts considered, the 412–425_sHBsAg sera were found broadly cross-reactive across the HCV genotypes.

To recapitulate, the immunization studies confirmed that both *Leishmania*-derived particles are highly immunogenic in mice. Moreover, the 412–425_sHBsAg sera recognized efficiently both the 412–425 peptide and mammalian cell culture-derived E2 protein from different HCV genotypes, as well as yeast-derived sHBsAg proteins.

Discussion

Despite the discovery of highly effective antiviral agents, 3–4 million new HCV infections every year still represent a major health problem. Therefore, the development of an effective and a low-cost prophylactic vaccine is needed to control global HCV infection. For years, humoral response and nAbs were considered to play a side role in HCV infection process. However, recent studies suggest that nAbs play an active role in HCV spontaneous resolution [6, 7, 31]. During the infection, all known nAbs target epitopes within the HCV envelope glycoproteins E1 and E2, prevalently the E2 epitopes. The ectodomain of the E2 glycoprotein contains three regions of variability that are targeted by nAbs—HVR1, HVR2, plus the intergenotypic variable region. HVR1 is a 26–28 aa long

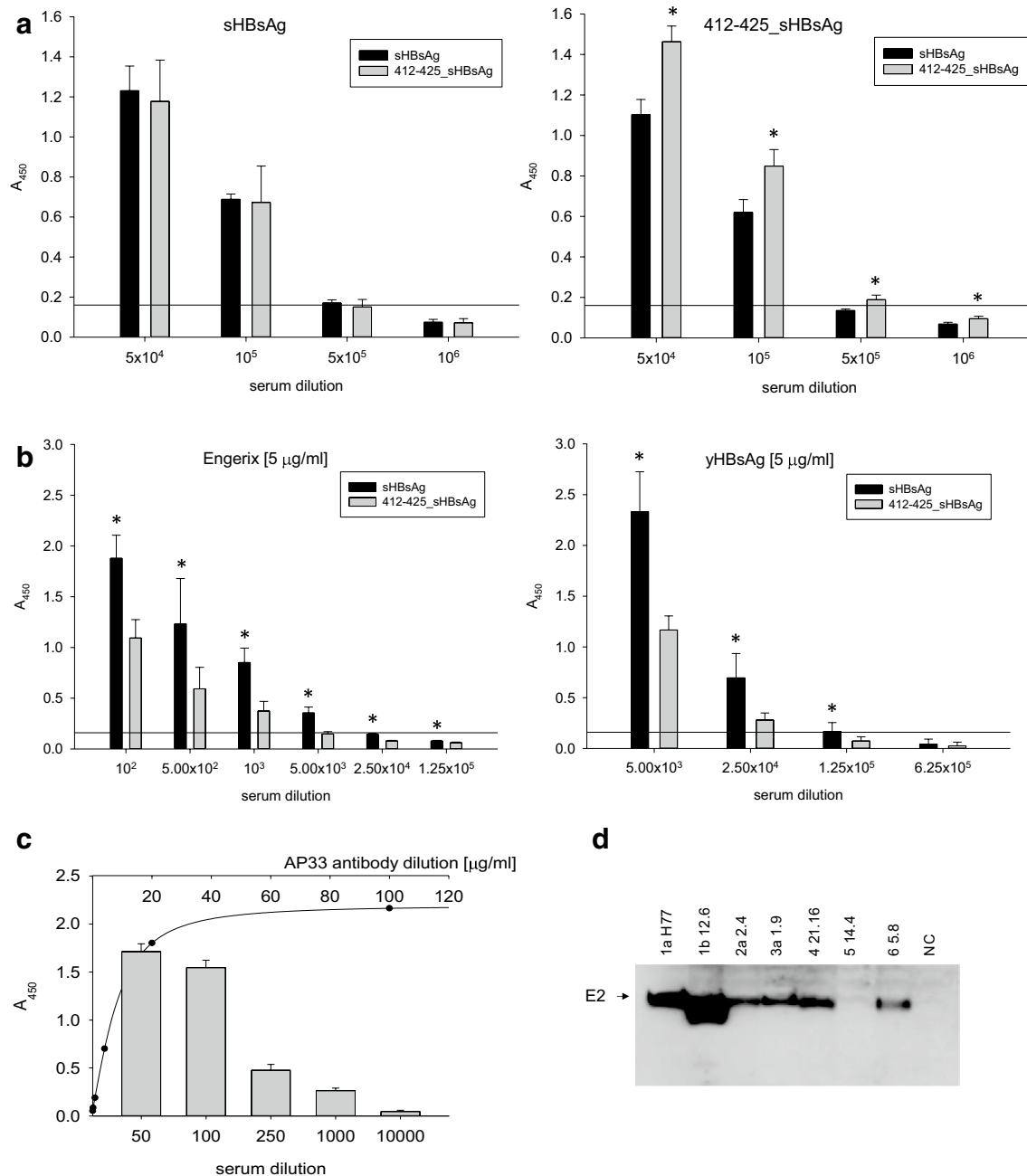


Fig. 6 Analysis of the humoral response induced by *Leishmania*-derived particles in BALB/c mice. **a** Analysis of the antibody endpoint titers of the pooled mouse antisera specific to the recombinant particles. ELISA plates were coated with 412–425_sHBsAg (right) or sHBsAg (left) particles. **b** Analysis of the interaction of immune sera with yeast-derived HBsAg proteins. ELISA plates were coated with 5 $\mu\text{g/ml}$ of purified HBsAg protein from *P. pastoris* (yHBsAg) (right) or commercially available vaccine against HBV (Enderix-B) (left). **c** Analysis of the antibody response to the 412–425 synthetic peptide. ELISA plates were coated with 20 μg of 412–425 peptide. AP33 mAb was used to estimate concentration of Abs specific to the 412–425 region in serum. Dilution factor of the pooled 412–425_sHBsAg sera and concentration of the AP33 antibody are shown on x-axis (bottom and top, respectively). The 412–425_sHBsAg sera values are represented with bars, the AP33 values are marked with solid line. Mean A_{450} values and standard deviations are shown on the y-axis. The background from the negative control serum in each dilution was subtracted from the obtained results (a, b, c). For each ELISA assay, the mean from three independent experiments performed in duplicate is shown. Asterisks indicate statistical significance ($*P < 0.05$, paired two-tailed *t*-test) (a, b). The solid horizontal line (a, b) indicates the cutoff value (three times the mean background value). **d** Analysis of cross-reactivity of the 412–425_sHBsAg sera to the E1E2 complex from different HCV genotypes. The figure represents western blotting in reducing conditions with 412–425_sHBsAg sera diluted 1:500. As an antigen, extracts of HEK293 cells transfected with plasmids expressing E1E2 glycoproteins from different HCV genotypes were used. Non-transfected HEK293 cell lysate was used as negative control (NC)

fragment responsible for interactions with cellular SR-BI receptor [32]. Because of its high immunogenicity, HVR1 was often considered a potential vaccine epitope. However, a recent approach where HVR1 is used as an antigen carried on HBV capsid-like particles showed deficiency in the HCVpp and cell culture HCV (HCVcc) cross-neutralization [10]. Unfortunately, HVR1 is the most variable region of HCV and the high rate of mutation within this region results in poor cross-neutralization across different HCV isolates. It has been reported that HVR1 plays the role of a major epitope decoy that elicits isolate-specific nAbs from which the HCV can easily escape [33].

It has previously been demonstrated that CD81-binding regions of HCV E2 glycoprotein are highly conserved and represent the main target for the broad range of nAbs [11, 31, 34, 35]. Thus, the intrinsically conserved epitopes able to induce cross-neutralizing antibodies seem to be essential in vaccine development. The recent data suggest that recombinant E1E2 complex is capable of eliciting antibodies that bind the conserved residues overlapping epitopes of many broadly cross-neutralizing antibodies targeting E2-CD81 interaction [36].

In this study, we decided to design particles carrying broadly-neutralizing 412–425 epitope and insert it into the major antigenic loop of sHBsAg protein. Both sHBsAg (wild-type) and 412–425_sHBsAg (chimeric) proteins were expressed in *L. tarentolae* cells at similar efficiencies. The fact indicates that epitope insertion did not impair the protein folding. This is consistent with observation from previous study which showed that “a”-determinant of sHBsAg can support 36 amino acids insertions without an impact on the particle expression efficiency [23]. The insertion of 412–425 epitope in “a”-determinant was confirmed by cell lysate ELISA and immunogold labeling of particles with AP33 antibodies. The EM analysis revealed that 412–425_sHBsAg particles were present in the cell lysate and their shape resembled the correctly assembled sHBsAg particles expressed in the mammalian or yeast expression systems [29, 37].

Over the last few years, new vaccination approaches involving VLP-based vaccines have been developed. VLP are effective immunogens and due to their highly organized structure they are able to elicit both the nAbs and T-cell responses [38]. sHBsAg has been shown to self-assemble into highly immunogenic, non-infectious subviral particles, and is used worldwide as a safe, commercial hepatitis B vaccine. The sHBsAg protein was previously expressed in mammalian [37], baculovirus [39], *E.coli* [40], and yeast systems utilizing *P. pastoris* [29, 41], *S. cerevisiae* [42], *H. polymorpha* [37], and *Y. lipolytica* [43]. The choice of *S. cerevisiae* yeast for commercial production of sHBsAg was dictated by low cultivation costs and high protein yield. However, unlike in the mammalian

expression system, the yeast-derived sHBsAg is not glycosylated, which is a major drawback of the yeast-based systems. Noteworthy, sHBsAg expression in mammalian cells leads to particle secretion [18, 23, 44]. The process significantly simplifies purification of particles from the culture medium. On the other hand, particle secretion was never observed in yeast systems where protein was retained within ER partially assembling into multi-layer lamellar structures. There is no evidence for the presence of the particles within the yeast cells [29]. Importantly, the assembly of *L. tarentolae* expressed particles was confirmed by electron microscopy, though we never observed any particle secretion into the culture medium. They are possibly retained in ER, just as the yeast-derived virus-like particles (VLPs), and the assembly of the particles probably occurs after the cell lysis in the subsequent down-stream processing.

This report is the first to describe efficient expression of sHBsAg in a eukaryotic protozoan *L. tarentolae*-based expression system. The *L. tarentolae* system has recently been used to express immunogenic human papillomavirus (HPV) L1 VLPs [45] and to produce recombinant proteins with the N-glycosylation pattern similar to the mammalian one, as demonstrated for erythropoietin [26] and soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) [46]. Region 412–425 of the HCV E2 glycoprotein includes two highly conserved glycosylation sites which have recently been shown to play an important role in epitope recognition by the broadly neutralizing monoclonal antibodies AP33, HCV1 [47], and HC33.11 [48]. Moreover, it has previously been shown that the structure of oligosaccharides attached to hemagglutinin can play an important role in its immunogenicity [49]. The N-glycosylation pattern of *L. tarentolae*-derived particles should be further analyzed, although higher mass of the 412–425_sHBsAg protein and the results of deglycosylation with PNGase F suggest the presence of additional N-glycans.

Recently, various strategies of using sHBsAg as the prophylactic HCV vaccine candidates have been investigated. It has been shown that pre-existing immunity to sHBsAg does not impede immune response against foreign epitopes or proteins carried on an sHBsAg particle. This suggests that chimeric HBsAg-based particles can be used in the booster dose strategy in individuals previously vaccinated against HBV [50, 51]. The use of sHBsAg particles as carriers of small HCV epitopes inserted into the antigenic external hydrophilic loop was reported in several studies [23, 24, 52]. Another approach involved the design of chimeric HBV-HCV particles in which the N-terminal transmembrane domain (TMD) of the sHBsAg protein was replaced with the TMD of HCV full-length E1 or E2 proteins [19]. Those chimeric particles expressed in

CHO cells elicited strong antibody response against both HBsAg and HCV envelope proteins in immunized rabbits [53]. Moreover, the sera displayed cross-neutralizing activity against HCVpp and HCVcc, although the T-cell response of chimeric particles was not analyzed. Here, we tested the ability of *Leishmania*-derived particles to elicit a cellular response using an in vitro T cell activation assay. The strongest response occurred against sHBsAg peptide pools one and three. These results are in agreement with other reports suggesting that most T-cell immunodominant epitopes are located outside the “a”-determinant region [54, 55]. It also proves that the location of a foreign epitope does not interfere with cellular response against chimeric VLPs. Not surprisingly, no cellular response was detected when splenocytes were stimulated with 412–425 synthetic peptide (the results not shown). The outcome supports the previous findings, namely that almost no cellular epitopes were present on HCV envelope glycoproteins versus the core or NS proteins [5, 56]. Additionally, we observed a higher cellular response in mice immunized with chimeric 412–425_sHBsAg particles than in those immunized with wild-type particles. An N-glycan structural analysis confirmed that *L. tarentolae* is able to produce mammalian-like, as well as mannose-terminated N-glycans [26]. Several reports show that mannosylation of particles enhances antigen uptake and processing by the antigen presenting cells [57–59]. Possibly, additional N-glycans present in 412–425_sHBsAg particles are mannose-terminated and may promote a stronger cellular response. Nevertheless, it should be emphasized that no significant differences in the humoral responses were observed.

The antibody response to mammalian and yeast-derived sHBsAg is well documented [37, 60]. In this study, we proved strong immunogenicity of *L. tarentolae*-derived particles, since the antibody titers in the sera of both analyzed mouse groups reached 5×10^5 (Fig. 6a). The 412–425_sHBsAg sera were able to detect both synthetic peptide (Fig. 6c) and yeast-derived sHBsAg proteins (Fig. 6b). However, immune response against sHBsAg protein was weaker in the 412–425_sHBsAg group of mice than in the sHBsAg wild-type group. This is consistent with the previous findings which described lessening of the anti-sHBsAg immune response in animals immunized with chimeric particles versus those immunized with wild-type particles [24]. It has also been demonstrated that changes within external hydrophilic loop are strongly associated with the sHBsAg protein antigenicity [61]. Furthermore, our findings proved that 412–425_sHBsAg sera were able to recognize not only the synthetic peptide, but also HCV E2 glycoprotein of most virus genotypes, which indicated presence of broadly cross-reactive antibodies (Fig. 6d).

There is abundant evidence clearly demonstrating the importance of the cross-neutralizing antibodies in spontaneous clearance of HCV infection. Promising results have been obtained for adenovirus-based vaccine proved to induce a broad, strong and long-lasting T-cell response in healthy humans [62]. Thus, the development of a prophylactic vaccine can be achieved by combination of antigens which are able to elicit simultaneous T and B cell responses, both crucial for the successful protection against HCV [10, 36, 63].

Conclusions

Since HCV displays high genetic diversity, the ideal prophylactic vaccine should elicit antibodies against the highly conserved viral regions. Our results indicate that chimeric sHBsAg VLPs carrying a highly conserved HCV epitope may elicit cross-reactive antibodies against HCV while preserving anti-sHBsAg “a”-determinant immunogenicity. This approach, combined with a vaccine inducing a strong T-cell response against HCV, may be useful in developing a cost-effective bivalent prophylactic vaccine against the two main hepatotropic human pathogens. Moreover, chimeric sHBsAg particles were successfully expressed in *L. tarentolae* system, which can be considered an alternative to mammalian cells for large-scale production of N-glycosylated VLPs for pharmaceutical purposes.

Methods

Plasmids

Figure 1 summarizes the construction of the 412–425_sHBsAg chimeric gene used in this work. The region of HCV E2 glycoprotein, spanning the 412–425 residues (isolate H77c, GenBank accession no. AF011751) was inserted within HBV subtype adw2 sHBsAg amino acid positions 127P and 128A (GenBank accession no. AF397207.1). The construct was obtained by gene synthesis using *L. tarentolae*-adapted codon (GeneArt—Thermo Fisher Scientific). The gene coding for sHBsAg was synthesized as mentioned above. Synthesized genes were ligated into BglII—NotI restriction sites in the *pLEXSY-1-blecherry3* vector (Jena Bioscience). For HCV E2 glycoprotein expression in human epithelial kidney (HEK) 293 cells, we used plasmids coding for full-length E1E2 derived from HCV genotypes: 1a (isolate H77.20); 1b (UKN1B.12.6); 2a (UKN2A.2.4); 3a (UKN3.1.9); 4 (UKN4.21.16); 5 (UKN5.14.4); and 6 (UKN6.5.8) – kindly provided by J. Ball.

Leishmania tarentolae cultivation and protein expression

HBV small surface antigen and 412–425_sHBsAg proteins were expressed using the inducible LEXSY expression system according to the manufacturer’s instructions

(Jena Bioscience). Briefly, the plasmids were transfected into *L. tarentolae* cells by electroporation. Transfected cells were selected with bleomycin (100 µg/mL) in suspension culture. Subsequently, recombinant cell lines were cultivated in 25 cm² tissue culture flasks filled with 10 mL of selective medium supplemented with hemin at 26 °C and kept away from light. The T7 promoter driven transcription was induced by adding tetracycline to the final concentration of 15 µg/mL. Cells were grown in 500 mL shake flasks for 72 h, at 26 °C, in agitated culture to the final optical density of 4–5 at 600 nm (OD₆₀₀).

Indirect immunofluorescence

For immunofluorescence labeling, tetracycline-induced *L. tarentolae* cells were washed with PBS and fixed in 4 % paraformaldehyde for 30 min at RT. Lysine-coated glass coverslips were covered with fixed cell suspension and left to dry at RT. Next, the cells were permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in PBS for 10 min at RT. Subsequently, the coverslips were incubated with primary rabbit anti-HBsAg (Abcam) and mouse anti-E2 AP33 (kindly provided by A. Patel) antibodies diluted to 1:1000 in PBS-BSA buffer [0.5 % (w/v) BSA] for 1 h at RT. The coverslips were then washed with PBS and incubated with Alexa Fluor 633-labeled goat anti-mouse and Alexa Fluor 488-labeled goat anti-rabbit secondary antibodies (1:1000 in PBS-BSA) for 1 h at RT. After washing, the coverslips were mounted onto microscope slides with ProLong Gold antifade reagent.

SDS-PAGE and western blot

Analysis of the particle expression was carried out by SDS-PAGE using 4–12 % gradient Bis-Tris gels in MES SDS running buffer. After electrophoresis, proteins were transferred onto PVDF membrane using electroblotting, and subsequently the membranes were blocked overnight at 4 °C with 3 % nonfat milk in TBST [TBS buffer, 0.1 % (v/v) Tween-20]. Following blocking, membranes were incubated for 1 h at RT with primary anti-HBsAg antibodies diluted in TBST, washed with TBST, and then incubated with goat anti-rabbit secondary AP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The results were developed using the BCIP/NBT substrate.

For testing serum cross-reactivity, HEK 293 cells were transfected with plasmids expressing glycoproteins E1E2 derived from different HCV genotypes. 72 h after transfection, cells were washed with PBS buffer and lysed in lysis buffer (PBS buffer, 1 % Triton X-100). The clarified cell lysates were separated using SDS-PAGE and transferred onto PVDF membrane as described above. Following the blocking, the membranes were incubated for 1 h at RT with a mixture of pooled 412–425_sHBsAg sera diluted 1:500, washed with TBST and then incubated

with goat anti-mouse secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology).

PNGase F treatment

412–425_sHBsAg and sHBsAg cell lysates were boiled for 10 min in denaturing buffer (0.5 % SDS, 40 mM DTT). The samples were divided into two equal portions and incubated for 16 h at 37 °C, with or without PNGase F, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). The results were visualized with western blot using anti-HBsAg antibodies as described above.

Cell lysis and ultracentrifugation

Hundred milliliter of tetracycline-induced cell culture was centrifuged at 4 °C, 8000 rpm, for 15 min. The cell pellet was either stored at –20 °C until use or immediately resuspended in 10 mL of ice-cold lysis buffer [PBS buffer, 0.6 % (v/v) Tween-20]. Cells were sonicated and the suspension was clarified by centrifugation at 4 °C, 8000 rpm, for 35 min.; the supernatant was left for 16–24 h at RT for particle formation. Subsequently, the lysate was layered on an OptiPrep (Sigma-Aldrich) gradient formed in ultra-clear tubes [2 mL of 30 % (v/v) OptiPrep, 2 mL 24 % (v/v) OptiPrep, 1.5 mL 18 % (v/v) OptiPrep, 1.5 mL 12 % (v/v) OptiPrep, and 1.5 mL 6 % (v/v) OptiPrep in ultra-clear water] and ultracentrifuged at 27,000 rpm for 16 h at 4 °C. Then, 500 µL fractions were harvested and analyzed by western blot using anti-HBsAg rabbit polyclonal antibodies (Abcam). Purity of the fractions was analyzed by SDS-PAGE with Coomassie R-250 staining. sHBsAg positive fractions of the highest purity were pooled, and OptiPrep buffer was replaced with PBS using Amicon Ultra 100 K centrifugal units (Merck Millipore). The thus prepared samples were used for further analysis.

Cell lysate ELISA

ELISA 96-well plates were left for coating with cell lysates diluted in PBS for 16 h at 4 °C. Each well was then blocked with 3 % (w/v) BSA in PBST [PBS buffer, 0.05 % (v/v) Tween-20] for 2 h at RT. Primary mouse monoclonal AP33 and rabbit polyclonal anti-HBsAg (Acris Antibodies) were diluted in PBST with 0.3 % (w/v) BSA and added to the wells. After the washing, primary antibodies were detected with the goat anti-mouse or goat anti-rabbit secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The reaction with TMB substrate was stopped with 0.5 M H₂SO₄ and signal intensity at 450 nm was measured using plate reader (TECAN).

Immunization protocol

Groups of 6 BALB/c female mice, 6–8 weeks of age, were immunized subcutaneously with squalene-based

oil-in-water nanoemulsion adjuvant (Addavax, InvivoGen). The mice were immunized with 15 µg of protein on day 0, and with 10 µg on days: 14 and 28. The mice used as negative controls were immunized with PBS-adjuvant mixture alone. All experiments on animals were conducted by an accredited company (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk), in accordance with the current guidelines for animal experimentation. The protocols were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the Medical University of Gdańsk (Permit Number: 46/2012). All surgery was performed under isoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Analysis of antibody response

Mouse sera were collected on day 42 and pooled into two groups. Antibody response was measured by direct solid-phase ELISA using immunogens 10 µg/mL, 412–425 synthetic peptide (QLINTNGSWHINST) 20 µg/mL (JPT-Innovative Peptide Solutions), commercial vaccine against HBV 5 µg/mL (Engerix-B, GlaxoSmithKline) or yeast-derived HBsAg protein 5 µg/mL (Acris Antibodies). Plates were blocked for 2 h with 3 % (w/v) BSA in PBST. Following the blocking and washing, serial diluted mouse sera were added to the wells and incubated for 1 h at RT. Diluted primary mouse AP33 mAb were used as reference. Secondary goat anti-mouse or goat anti-rabbit Abs were used for detection.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the SigmaPlot 12.0 software (SYSTAT Software).

ELISPOT assay

T-cell response was analyzed by ELISPOT assay for detection of IFN-γ according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences). Briefly, ELISPOT 96-well plates were coated with purified anti-mouse IFN-γ antibody and blocked using RPMI Medium 1640 (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 100 µg/mL penicillin, and 2 mM L-glutamine. Splenocytes were isolated from the mice 42 days after immunization by passage through 70 µm strainers followed by treatment with ACK lysing buffer (Thermo Fisher Scientific). After washing, splenocytes were seeded at 5×10^5 cells/well and stimulated overnight at 37 °C with overlapping peptides (JPT-Innovative Peptide Solutions) pooled into 3 groups spanning the sHBsAg amino acid sequence at the concentration of 20 µg/mL. Concanavalin A was used as positive control. The mean number of spots from duplicate wells were calculated for each animal and adjusted to represent the mean number of spots per 10^6 splenocytes.

Electron microscopy and immunogold labeling

For visualization of the particles, the Optiprep gradient fractions were diluted 1:5 in PBS and deposited on formvar-carbon coated 200 mesh nickel grids. Negative staining was performed using 2 % uranyl acetate. Following the staining, samples were analyzed using transmission electron microscope (University of Gdańsk, Poland). For immunogold labeling, grid-deposited 412–425_sHBsAg particles were fixed using 0.1 % (v/v) glutaraldehyde in 4 % paraformaldehyde. Next, the grids were layered on top of AP33 antibodies diluted 1:20 in incubation buffer [PBS buffer, 0.1 % (v/v) BSA-c], and incubated at 4 °C for 16 h. After incubation with primary antibodies, the grids were washed six times using incubation buffer for 5 min at RT. Labeling was performed with goat anti-mouse IgG conjugated with 6 nm gold particles (Aurion), diluted 1:40 in incubation buffer and left for 1 h at RT. After the washing step, the grids were stained with uranyl acetate, dried and analyzed using transmission electron microscope JEM 1200 EX (JEOL Co., Japan) at the Nencki Institute (Warszawa, Poland).

Authors' contributions

AC, KG designed and performed the experiments, analyzed and interpreted the data, and wrote the manuscript. JT helped in data analysis and revision of the manuscript. GPS carried out the animal vaccination. BG helped in particle purification. KBS revised the manuscript. KG conceived the study, acquired the funding and supervised the research. All authors have read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-MUG, University of Gdańsk, A. Abrahamowa 58, 80-307 Gdańsk, Poland.

² Laboratory of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG-MUG, University of Gdańsk, A. Abrahamowa 58, Gdańsk 80-307, Poland.

³ Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk, Dębinki 1, Gdańsk 80-211, Poland.

Acknowledgements

We would like to thank Arvind Patel for providing the AP33 antibody and Jonathan Ball for providing the plasmids coding for E1E2 complex from different HCV genotypes. We are also grateful to Michał Rychłowski for his assistance in confocal analysis, Magdalena Narajczyk (Laboratory of Electron Microscopy, Faculty of Biology, University of Gdańsk) for TEM analysis, and Binay Chaubey and Paweł Majewski for critical reading of the manuscript. This study was founded by the Polish National Centre for Research and Development, Grant no. LIDER/12/151/L-3/11/NCBR/2012, and The Polish National Science Centre, Grant no. 2012/05/D/NZ6/00885.

Competing interests

KG and AC are authors of the Polish patent application no P410950 filed on 01/15/2015. Patent applications do not alter the authors' adherence to all Microbial Cell Factories policies on sharing data and materials. The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 October 2015 Accepted: 31 March 2016

Published online: 13 April 2016

References

1. ION-1 Investigators. Ledipasvir and Sofosbuvir for Untreated HCV Genotype 1 Infection. *N Engl J Med*. 2014. doi:10.1056/nejmoa1402454.

2. Chhatwal J, Kanwal F, Roberts MS, Dunn MA. Cost-effectiveness and budget impact of hepatitis C virus treatment with sofosbuvir and ledipasvir in the United States. *Ann Intern.* 2015. doi:10.7326/M14-1336.
3. Frank C, Mohamed MK, Strickland GT, Lavanchy D, Arthur RR, Magder LS, et al. The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet.* 2000. doi:10.1016/S0140-6736(99)06527-7.
4. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol.* 2007. doi:10.3748/wjg.v13.i17.2406.
5. Schmidt J, Blum H, Thimme R. T-cell responses in hepatitis B and C virus infection: similarities and differences. *Emerg Microbes Infect.* 2013. doi:10.1038/emi.2013.14.
6. Osburn WO, Snider AE, Wells BL, Latanich R, Bailey JR, Thomas DL, et al. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology.* 2014. doi:10.1002/hep.27013.
7. Pestka JM, Zeisel MB, Bläser E, Schürmann P, Bartosch B, Cosset FL, et al. Rapid induction of virus-neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007. doi:10.1073/pnas.0607026104.
8. Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, et al. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine.* 2010. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.084.
9. Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, et al. A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans. *PLoS One.* 2013. doi:10.1371/journal.pone.0059776.
10. Lange M, Fiedler M, Bankwitz D, Osburn W, Viazov S, Brovko O, et al. Hepatitis C virus hypervariable region 1 variants presented on hepatitis B Virus capsid-like particles induce cross-neutralizing antibodies. *PLoS One.* 2014. doi:10.1371/journal.pone.0102235.
11. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, Lavillette D, Bartosch B, Cosset FL, et al. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol.* 2005. doi:10.1128/jvi.79.17.11095-11104.2005.
12. Desombere I, Fafi-Kremer S, Van Houtte F, Pessaux P, Farhoudi A, Heydmann L, et al. Monoclonal anti-envelope antibody AP33 protects humanized mice against a patient-derived hepatitis C virus challenge. *Hepatology.* 2015. doi:10.1002/hep.28428.
13. Cheong W, Drummer H, Netter H. Delivery of a foreign epitope by sharing amino acid residues with the carrier matrix. *J Virol Methods.* 2009. doi:10.1016/j.jviromet.2009.01.015.
14. Li W, Joshi MD, Singhanian S, Ramsey KH, Murthy AK. Peptide Vaccine: progress and Challenges. *Vaccines.* 2014. doi:10.3390/vaccines2030515.
15. Sandomenico A, Leonardi A, Berisio R, Sanguigno L, Focà G, Focà A, et al. Generation and characterization of monoclonal antibodies against a cyclic variant of Hepatitis C Virus E2 epitope 412-422. *J Virol.* 2016. doi:10.1128/JVI.02397-15.
16. Gavilanes F, Gonzalez-Ros J, Peterson D. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J Biol Chem.* 1982;257(13):7770-7.
17. Bruss V, Gerhardt E, Vieluf K, Wunderlich G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology.* 1996. doi:10.1159/000150471.
18. Kotiw M, Johnson M, Pandey M, Fry S, Hazell SL, Netter HJ, et al. Immunological response to parenteral vaccination with recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing helicobacter pylori KatA epitopes in a Murine H. pylori challenge model. *Clin Vaccine Immunol.* 2012. doi:10.1128/CI.05295-11.
19. Patient R, Hourieux C, Vaudin P, Pagès JC, Roingard P. Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: implications for the design of new vaccine strategies. *N Biotechnol.* 2009. doi:10.1016/j.nbt.2009.01.001.
20. Cheong WS, Reiseger J, Turner SJ, Boyd R, Netter HJ. Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antiviral Res.* 2009. doi:10.1016/j.antiviral.2008.10.003.
21. Delpeyroux F, Chenciner N, Lim A, Malpièce Y, Blondel B, Crainic R, et al. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science.* 1986. doi:10.1126/science.2425433.
22. Berkower I, Raymond M, Muller J, Spadaccini A, Aberdeen A. Assembly, structure, and antigenic properties of virus-like particles rich in HIV-1 envelope gp120. *Virology.* 2004. doi:10.1016/j.virol.2003.12.017.
23. Netter HJ, Macnaughton TB, Woo WP, Tindle R, Gowans EJ. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol.* 2001. doi:10.1128/jvi.75.5.2130-2141.2001.
24. Vietheer PT, Boo I, Drummer HE, Netter HJ. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Antivir Ther.* 2007;12:477-87.
25. Von Brunn A, Früh K, Müller H, Zentgraf HW, Bujard H. Epitopes of the human malaria parasite *P. falciparum* carried on the surface of HBsAg particles elicit an immune response against the parasite. *Vaccine.* 1991. doi:10.1016/0264410x(91)90032-2.
26. Breiting R, Klingner S, Callewaert N, Pietrucha R, Geyer A, Ehrlich G, et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr Purif.* 2002. doi:10.1016/S1046-5928(02)00001-3.
27. Gazdag EM, Cirstea IC, Breiting R, Lukeš J, Blankenfeldt W, Alexandrov K. Purification and crystallization of human Cu/Zn superoxide dismutase recombinantly produced in the protozoan *Leishmania tarentolae*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* 2010. doi:10.1107/S1744309110019330.
28. Potter JA, Owsianka AM, Jeffery N, Matthews DJ, Keck ZY, Lau P, et al. Toward a hepatitis C virus vaccine: the structural basis of hepatitis C virus neutralization by AP33, a broadly neutralizing antibody. *J Virol.* 2012. doi:10.1128/JVI.02052-12.
29. Lünsdorf H, Gurrankonda C, Adnan A, Khanna N, Rinas U. Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the Hepatitis B surface antigen. *Microb Cell Fact.* 2011. doi:10.1186/1475-2859-10-48.
30. Costa C, Delgado I, da Costa J, de Carvalho RF, Mouta Sda S, Jr Vianna CO, et al. Establishment and validation of an ELISA for the quantitation of HBsAg in recombinant hepatitis B vaccines. *J Virol Methods.* 2011. doi:10.1016/j.jviromet.2010.12.010.
31. Wang Y, Keck Z, Fong S. Neutralizing Antibody Response to Hepatitis C Virus. *Viruses.* 2011. doi:10.3390/v3112127.
32. Ball J, Tarr A, McKeating J. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res.* 2014. doi:10.1016/j.antiviral.2014.02.013.
33. Bankwitz D, Steinmann E, Bitzegeio J, Ciesek S, Friesland M, Herrmann E, et al. Hepatitis C virus hypervariable region 1 modulates receptor interactions, conceals the CD81 binding site, and protects conserved neutralizing epitopes. *J Virol.* 2010. doi:10.1128/jvi.02200-09.
34. Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang Y, Fong S, Stamatakis Z, et al. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med.* 2007. doi:10.1038/nm1698.
35. Johansson DX, Voisset C, Tarr AW, Aung M, Ball JK, Dubuisson J, et al. Human combinatorial libraries yield rare antibodies that broadly neutralize hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007. doi:10.1073/pnas.0705522104.
36. Wong JA, Bhat R, Hockman D, Logan M, Chen C, Levin A, et al. Recombinant hepatitis C virus envelope glycoprotein vaccine elicits antibodies targeting multiple epitopes on the envelope glycoproteins associated with broad cross-neutralization. *J Virol.* 2014. doi:10.1128/jvi.01911-14.
37. Diminsky D, Schirmbeck R, Reimann J, Barenholz Y. Comparison between hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles derived from mammalian cells (CHO) and yeast cells (*Hansenula polymorpha*): composition, structure and immunogenicity. *Vaccine.* 1997. doi:10.1016/S0264-410x(96)00239-3.
38. Roldão A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines.* 2010. doi:10.1586/erv.10.115.
39. Kang C, Bishop D, Seo J, Matsuura Y, Choe M. Secretion of particles of hepatitis B surface antigen from insect cells using a baculovirus vector. *J Gen Virol.* 1987. doi:10.1099/0022-1317-68-10-2607.
40. Charnay P, Gervais M, Louise A, Galibert F, Tiollais P. Biosynthesis of hepatitis B virus surface antigen in *Escherichia coli*. *Nature.* 1980. doi:10.1038/286893a0.

41. Liu R, Lin Q, Sun Y, Lu X, Qiu Y, Li Y, et al. Expression, purification, and characterization of hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) in yeast *pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009. doi:[10.1007/s12010-009-8527-x](https://doi.org/10.1007/s12010-009-8527-x).
42. Valenzuela P, Medina A, Rutter W, Ammerer G, Hall B. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature*. 1982. doi:[10.1038/298347a0](https://doi.org/10.1038/298347a0).
43. Hamsa P, Chattoo B. Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. *Gene*. 1994. doi:[10.1016/0378-1119\(94\)90092-2](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90092-2).
44. Patzer EJ, Nakamura GR, Yaffe A. Intracellular transport and secretion of hepatitis B surface antigen in mammalian cells. *J Virol*. 1984;51(2):346–53.
45. Bolhassani A, Shirbaghaee Z, Agi E, Davoudi N. VLP production in *Leishmania tarentolae*: a novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. *Protein Expr Purif*. 2015. doi:[10.1016/j.pep.2015.08.024](https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.08.024).
46. Klatt S, Rohe M, Alagesan K, Kolarich D, Konthur Z, Hartl D. Production of glycosylated soluble amyloid precursor protein alpha (sAPPalpha) in *Leishmania tarentolae*. *J Proteome Res*. 2013. doi:[10.1021/pr300693f](https://doi.org/10.1021/pr300693f).
47. Kong L, Giang E, Robbins JB, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA, et al. Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012. doi:[10.1073/pnas.1202924109](https://doi.org/10.1073/pnas.1202924109).
48. Li Y, Pierce BG, Wang Q, Keck ZY, Fuerst TR, Fong S, et al. Structural basis for penetration of the glycan shield of hepatitis C virus E2 glycoprotein by a broadly neutralizing human antibody. *J Biol Chem*. 2015. doi:[10.1074/jbc.m115.643528](https://doi.org/10.1074/jbc.m115.643528).
49. De Vries RP, Smit CH, de Bruin E, et al. Glycan-dependent immunogenicity of recombinant soluble trimeric hemagglutinin. *J Virol*. 2012. doi:[10.1128/JVI.01084-12](https://doi.org/10.1128/JVI.01084-12).
50. Beaumont E, Roingeard P. Chimeric hepatitis B virus (HBV)/hepatitis C virus (HCV) subviral envelope particles induce efficient anti-HCV antibody production in animals pre-immunized with HBV vaccine. *Vaccine*. 2015. doi:[10.1016/j.vaccine.2015.01.007](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.01.007).
51. Netter HJ, Woo WP, Tindle R, Macfarlan RI, Gowans EJ. Immunogenicity of recombinant HBsAg/HCV particles in mice pre-immunized with hepatitis B virus-specific vaccine. *Vaccine*. 2003. doi:[10.1016/S0264-410X\(03\)00182-8](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(03)00182-8).
52. Lee I, Kim C, Ryu W. Presentation of the hydrophilic domains of hepatitis C viral E2 envelope glycoprotein on hepatitis B surface antigen particles. *J Med Virol*. 1996. doi:[10.1002/\(sici\)1096-9071\(199610\)50:2<145:aid-jmv7>3.0.co;2-a](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9071(199610)50:2<145:aid-jmv7>3.0.co;2-a).
53. Beaumont E, Patient R, Hourieux C, Dimier-Poisson I, Roingeard P. Chimeric hepatitis B virus/hepatitis C virus envelope proteins elicit broadly neutralizing antibodies and constitute a potential bivalent prophylactic vaccine. *Hepatology*. 2013. doi:[10.1002/hep.26132](https://doi.org/10.1002/hep.26132).
54. Desmond C, Bartholomeusz A, Gaudieri S, Revill PA, Lewin SR. A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther*. 2008;13(2):161–75.
55. Comber J, Karabudak A, Shetty V, Testa JS, Huang X, Philip R, et al. MHC class I presented T cell epitopes as potential antigens for therapeutic vaccine against HBV chronic infection. *Hepat Res Treat*. 2014. doi:[10.1155/2014/860562](https://doi.org/10.1155/2014/860562).
56. Verstrepen BE, Verschoor EJ, Fagrouch ZC, Mooij P, de Groot NG, Bontrop RE, et al. Strong vaccine-induced CD8 T-Cell responses have cytolytic function in a chimpanzee clearing HCV infection. *PLoS One*. 2014. doi:[10.1371/journal.pone.0095103](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095103).
57. Al-Barwani F, Young SL, Baird MA, Larsen DS, Ward VK. Mannosylation of virus-like particles enhances internalization by antigen presenting cells. *PLoS One*. 2014. doi:[10.1371/journal.pone.0104523](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104523).
58. Mishra H, Mishra D, Mishra PK, Nahar M, Dubey V, Jain NK. Evaluation of solid lipid nanoparticles as carriers for delivery of hepatitis B surface antigen for vaccination using subcutaneous route. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 2010;13(4):495–509.
59. Hamdy S, Haddadi A, Shayeganpour A, Samuel J, Lavasanifar A. Activation of antigen-specific T cell-responses by mannan-decorated PLGA nanoparticles. *Pharm Res*. 2011. doi:[10.1007/s11095-011-0459-9](https://doi.org/10.1007/s11095-011-0459-9).
60. Poland G, Jacobson R. Prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2832–8.
61. Cooreman M, Leroux-Roels G, Paulij W. Vaccine- and hepatitis B immune globulin-induced escape mutations of hepatitis B virus surface antigen. *J Biomed Sci*. 2001. doi:[10.1007/bf02256597](https://doi.org/10.1007/bf02256597).
62. Barnes E, Folgori A, Capone S, Swadling L, Aston S, Kurioka A, et al. Novel adenovirus-Based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci Transl Med*. 2012. doi:[10.1126/scitranslmed.3003155](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003155).
63. Chmielewska AM, Naddeo M, Capone S, Ammendola V, Hu K, Meredith L, et al. Combined adenovirus vector and hepatitis C virus envelope protein prime-boost regimen elicits T cell and neutralizing antibody immune responses. *J Virol*. 2014. doi:[10.1128/jvi.03574-13](https://doi.org/10.1128/jvi.03574-13).

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:







- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Article

Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency

Anna Czarnota ¹, Anna Offersgaard ^{2,3}, Anne Finne Pihl ^{2,3}, Jannick Prentoe ^{2,3},
Jens Bukh ^{2,3}, Judith Margarete Gottwein ^{2,3}, Krystyna Bienkowska-Szewczyk ¹ and
Katarzyna Grzyb ^{1,*}

- ¹ Laboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdańsk, 80-309 Gdańsk, Poland; anna.czarnota@biotech.ug.edu.pl (A.C.); krystyna.bienkowska-szewczyk@biotech.ug.edu.pl (K.B.-S.)
- ² Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP), Department of Infectious Diseases, Hvidovre Hospital, 2650 Hvidovre, Denmark; anna.offersgaard@regionh.dk (A.O.); anne.finne.pihl@regionh.dk (A.F.P.); jprentoe@sund.ku.dk (J.P.); jbukh@sund.ku.dk (J.B.); jgottwein@sund.ku.dk (J.M.G.)
- ³ Department of Immunology and Microbiology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, 2200 Copenhagen, Denmark
- * Correspondence: katarzyna.grzyb@ug.edu.pl

Received: 23 April 2020; Accepted: 6 June 2020; Published: 10 June 2020



Abstract: Hepatitis C virus (HCV) infection with associated chronic liver diseases is a major health problem worldwide. Here, we designed hepatitis B virus (HBV) small surface antigen (sHBsAg) virus-like particles (VLPs) presenting different epitopes derived from the HCV E2 glycoprotein (residues 412–425, 434–446, 502–520, and 523–535 of isolate H77C). Epitopes were selected based on their amino acid sequence conservation and were previously reported as targets of HCV neutralizing antibodies. Chimeric VLPs obtained in the *Leishmania tarentolae* expression system, in combination with the adjuvant Addavax, were used to immunize mice. Although all VLPs induced strong humoral responses, only antibodies directed against HCV 412–425 and 523–535 epitopes were able to react with the native E1E2 glycoprotein complexes of different HCV genotypes in ELISA. Neutralization assays against genotype 1–6 cell culture infectious HCV (HCVcc), revealed that only VLPs carrying the 412–425 epitope induced efficient HCV cross-neutralizing antibodies, but with isolate specific variations in efficacy that could not necessarily be explained by differences in epitope sequences. In contrast, antibodies targeting 434–446, 502–520, and 523–535 epitopes were not neutralizing HCVcc, highlighting the importance of conformational antibodies for efficient virus neutralization. Thus, 412–425 remains the most promising linear E2 epitope for further bivalent, rationally designed vaccine research.

Keywords: hepatitis C virus; vaccine; virus like particles (VLPs); HBV small surface antigen (sHBsAg)

1. Introduction

Hepatitis C virus (HCV) poses a serious medical problem as the number of new infections continues to be on the rise. Thus, there are at least 2 million acute infections annually, and in 80% of these individuals chronic hepatitis will develop [1]. Over time this has resulted in at least 70 million people chronically infected with HCV worldwide with a significant risk for progression to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [1]. In recent years, new antiviral therapies based on direct-acting antivirals

(DAAs) have been devised [2]. However, due to poor diagnostic coverage and high treatment cost, only a minor fraction of HCV-infected individuals will receive DAA therapy. In addition, emerging resistance to DAAs is expected to compromise treatment efficacy [3,4]. Thus, development of an effective prophylactic vaccine against HCV is required to control this deadly virus.

While both neutralizing antibodies and T cells contribute to spontaneous clearance of HCV infection [5,6], most antiviral vaccines protect by neutralizing antibodies induced by whole virus or virus-like particle (VLP) antigens [7,8]. For HCV, neutralizing antibodies induced by a subunit envelope protein vaccine had protective effects in chimpanzees [9], while a viral vector-based vaccine inducing T cells did not protect against chronic HCV infection in chimpanzees and humans [10,11]. Thus, development of an HCV vaccine inducing antibodies is a current research focus.

The high genetic heterogeneity of HCV poses an obstacle for development of an anti-HCV vaccine. At present, we can distinguish six major HCV genotypes with proven epidemiological relevance, while more recently genotypes 7 and 8 have been reported in a few individuals in central Africa and India, respectively [12,13]. Further, there are at least 90 HCV subtypes [14]. Genotypes 1, 2, and 3 are distributed across the globe with genotype 1 being the most common worldwide. Among genotype 1 isolates, subtypes 1a and 1b are most prevalent with predominance of subtype 1b. Genotype 4 is most common in the Middle East and Central and North Africa, genotype 5 in South Africa, and genotype 6 in Southeast Asia [12,13,15,16].

As the prime target of host neutralizing antibodies, the HCV envelope glycoproteins E1 and E2 located on the surface of the viral particle show extensive genetic heterogeneity, in particular in the hypervariable region 1 (HVR1) of E2. E1 and E2 form a covalent heterodimer embedded in the lipid envelope of the virus particle and play a crucial role in the infection process by interacting with the HCV-entry receptors, including tetraspanin CD81 [17]. In view of the high variability of E1E2, an effective vaccine should preferentially raise neutralizing antibodies against genetically conserved regions of the E1E2 heterodimer to elicit antibodies able to neutralize different HCV strains [18,19].

A number of relatively conserved epitopes able to induce cross-neutralizing antibodies have been identified, including two well-defined CD81-binding regions on E2; residues 412–423 (epitope I) (all E2 positions are assigned using H77C polyprotein numbering) [18,20,21], previously proposed as the target for anti-HCV therapeutic antibodies, and residues 434–446 (epitope II) [22,23]. Downstream of the epitope II sequence there are additional neutralizing epitopes, spanning residues 502–520 and residues 523–535 (epitope III), which also play a key role in HCV cell entry by influencing interactions between the viral particle and the CD81 receptor [24–27]. These regions offer interesting targets for rational vaccine design.

Although synthetic peptides can trigger immune responses, peptide vaccines are generally weakly immunogenic and require carriers for delivery [28,29]. Recently, there has been an increased interest in VLPs as platforms for immunogen exposition. VLP-based vaccines have several advantages over conventional immunogens. First, due to their virus-like appearance and highly organized structure, VLPs are effective as immunostimulants as they are able to elicit both humoral and cellular responses. Second, they can easily be produced in heterologous expression systems to large quantities and can easily be purified. Finally, VLPs do not contain virus genetic material and are considered safe in comparison to replicating vectors [30].

One of the best-characterized VLP-forming proteins is the hepatitis B virus (HBV) small surface antigen (sHBsAg). Yeast-derived sHBsAg forms particles of 22 nm in diameter and is currently used worldwide as the commercial recombinant hepatitis B virus vaccine. The sHBsAg tertiary structure features a highly conserved, hydrophilic loop containing major B-cell epitopes, also known as the “a”-determinant [31,32]. Because of its immunogenic potential, sHBsAg has been applied as an antigen carrier to deliver foreign sequences to induce humoral and cellular immune responses [33–38]. At the outset of this study, proof-of-concept was obtained that sHBsAg particles could be used as carriers of small HCV epitopes inserted into the antigenic external hydrophilic loop to induce strong and specific antibody responses [38–40].

In the present study, we designed a panel of sHBsAg VLPs with epitopes derived from the HCV E2 glycoprotein inserted into the “a”-determinant. The E2 epitopes were selected due to their relative sequence conservation and since they were reported to be targets of HCV neutralizing antibodies. The particles were produced in a non-conventional, cost-efficient *Leishmania tarentolae* expression system, purified by ultracentrifugation, and then used to immunize mice. This study is a follow-up of our previously published work in which we described the expression of chimeric sHBsAg particles carrying the highly conserved HCV 412–425 epitope and characterized binding of vaccine-induced antibodies to denatured HCV genotype 1–6 E2 glycoproteins [39]. In this study, we widened the panel of tested HCV E2 epitopes and evaluated the ability of vaccine-induced antibodies to bind native HCV genotype 1–6 E1E2 complexes and their potential to cross-neutralize cell culture infectious HCV (HCVcc) of genotype 1–6.

2. Materials and Methods

2.1. Plasmids

Figure 1 summarizes the construction of the chimeric genes for HBV/HCV particle generation. The regions of the HCV E2 glycoprotein expressing residues 412–425, 434–446, 502–520, and 523–535 (isolate H77C, GenBank accession no. AF011751 [41]) were inserted in the HBV subtype adw2 sHBsAg (GenBank accession no. AF397207.1). Insertions of the HCV E2 epitopes into the hydrophilic loop of the sHBsAg protein were performed at position I110/S117 (Δ 111–116)—for construct sHBsAg_434–446; at position P127/A128—for constructs sHBsAg_502–520 and sHBsAg_523–535; or at both positions—for constructs sHBsAg_434–446_523–535, sHBsAg_434–446_412–425, and sHBsAg_502–520_523–535. Additionally, constructs carrying epitope 502–520 had the cysteine residues at positions 503 and 508 substituted with alanine (C503A and C508A). Construction of the chimeric gene coding for construct sHBsAg_412–425 has been described earlier [39].

The constructs were obtained by gene synthesis using *L. tarentolae*-adapted codons (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Synthesized genes were ligated into the BglII–NotI restriction sites in the pLEXSY_I-blecherry3 vector (Jena Bioscience, Jena, Germany).

For expression of HCV E2 glycoprotein in human epithelial kidney (HEK) 293 cells for ELISA, we used plasmids coding for full-length E1E2, derived from HCV genotypes (isolates): 1a(H77C) [41]; 1b(12.6); 2a(2.4); 2b(1.1); 3a(1.9); 4a(21.16); 5a(14.4); and 6a(5.8) [42].

2.2. *Leishmania tarentolae* Cultivation and Protein Expression

The chimeric sHBsAg-based proteins were expressed using the inducible LEXSY expression system in accordance with the manufacturer’s instructions (Jena Bioscience). Briefly, the plasmids were transfected into *L. tarentolae* cells by electroporation. The transfected cells were selected with bleomycin (100 μ g/mL) in suspension culture. Subsequently, recombinant cell lines were cultivated in 25 cm² tissue culture flasks filled with 10 mL of selective medium supplemented with hemin protected from light at 26 °C. The T7 promoter driven transcription was induced by adding tetracycline to the final concentration of 15 μ g/mL. The cells were grown in agitated culture, in 500 mL shake flasks for 72 h at 26 °C, aiming at a final optical density of 4–5 at 600 nm (OD₆₀₀).

2.3. SDS-PAGE and Western Blot

An analysis of the particle expression was carried out by SDS-PAGE of *Leishmania tarentolae* cell lysates using 4–12% gradient Bis–Tris gels in MES SDS running buffer. After electrophoresis, proteins were transferred onto a PVDF membrane by electroblotting, and subsequently the membranes were blocked overnight at 4 °C with 3% nonfat milk in TBST [TBS buffer, 0.1% (*v/v*) Tween-20]. Following blocking, the membranes were incubated for 1 h at room temperature (RT) with primary anti-HBsAg antibodies diluted in 3% nonfat milk in TBST, washed with TBST, and then incubated with goat anti-rabbit secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology,

Dallas, TX, USA). The results were obtained through development in the substrate for enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific).

2.4. Cell Lysis and Ultracentrifugation

One hundred milliliters of tetracycline-induced cell culture were centrifuged at 4 °C, 8800× *g* for 15 min. The cell pellet was immediately resuspended in 10 mL of ice-cold lysis buffer [PBS buffer, 0.6% (*v/v*) Tween-20]. The cells were sonicated, and the suspension clarified by centrifugation at 4 °C, 8000 rpm, for 35 min; the supernatant was left for 16–24 h at RT to form particles. Subsequently, the lysate was layered on an OptiPrep (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) gradient formed in ultra-clear tubes [2 mL of 30% (*v/v*) OptiPrep, 2 mL 24% (*v/v*) OptiPrep, 1.5 mL 18% (*v/v*) OptiPrep, 1.5 mL 12% (*v/v*) OptiPrep, and 1.5 mL 6% (*v/v*) OptiPrep in PBS] and ultracentrifuged at 90,000× *g* for 16 h at 4 °C. Then, 500 µL fractions were harvested and analyzed by a western blot using anti-HBsAg rabbit polyclonal antibodies (OriGene, Rockville, MD, USA). Fraction purity was analyzed by SDS-PAGE with Coomassie R-250 staining. The fractions with the highest number of particles were pooled, and protein concentration was measured by Bradford assay. Finally, the OptiPrep solution was replaced with PBS using Amicon Ultra 100 K centrifugal filter units (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). Additionally, samples containing sHBsAg_{434–446} particles were normalized against sHBsAg_{412–425} protein using anti-HBsAg rabbit polyclonal antibodies (OriGene). These samples were used for further analysis and immunization.

2.5. Electron Microscopy

For visualization of the particles, the OptiPrep gradient fractions were diluted 1:5 in PBS and deposited on carbon-coated 200 mesh nickel grids. Negative staining was performed using 2% uranyl acetate. Following the staining, the samples were analyzed using a transmission electron microscope (University of Gdańsk, Gdańsk, Poland).

2.6. Immunization Protocol

Groups of 6 female BALB/c mice, 6–8 weeks of age, were immunized subcutaneously with squalene-based oil-in-water nanoemulsion adjuvant (Addavax, InvivoGen). The mice were immunized with 15 µg of protein on day 0, and with 10 µg on days 14 and 28. The mice used as negative controls were immunized with PBS-adjuvant mixture alone. All experiments on animals were conducted by an accredited company (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland), in accordance with the current guidelines for animal experimentation. The protocols were approved by the Local Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Science and Technology in Bydgoszcz (Permit Number: 38/2018). All procedures were performed under isoflurane anesthesia, and all effort was taken to minimize suffering.

2.7. Analysis of the Antibody Response by ELISA

Mouse sera were collected two weeks after the last immunization and pooled according to experimental groups. The antibody response against HCV E2 epitopes was measured by direct solid-phase ELISA. Pre-blocked, streptavidin-coated plates (Thermo Scientific) were incubated with biotinylated peptides at 5 µg/mL (JPT-Innovative Peptide Solutions, Berlin, Germany) for 16 h at 4 °C. Following the coating and washing, serially diluted mouse sera were added to the wells and incubated for 1 h at RT. Goat anti-mouse secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) were used for detection. Similarly, the antibody response against sHBsAg protein was tested using ELISA plates coated with *Pichia pastoris*-derived sHBsAg protein at 5 µg/mL (OriGene, Rockville, MD, USA). The plates were then blocked for 2 h with 3% (*w/v*) BSA in PBST [PBS buffer, 0.05% (*v/v*) Tween-20], and serially diluted mouse sera were added to the wells as described above.

For testing serum cross-reactivity to E1E2 complexes, HEK293 cells were transfected with plasmids expressing glycoproteins E1E2 derived from different HCV genotypes. The cells were washed with

PBS buffer and lysed in lysis buffer (PBS buffer, 0.5% Triton X-100) 72 h after transfection. The clarified cell lysates were normalized against each other using anti-E2 goat polyclonal antibodies (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and later used to perform ELISA in denatured/reduced and native conditions. For the denatured ELISA, the HEK293 cell lysates were first diluted 10× in PBS buffer containing 50 mM DTT and 2% SDS and incubated for 10 min at 100 °C; for the native ELISA, the HEK293 cell lysates were diluted 10× in PBS alone. Next, the cell lysates were moved onto ELISA plates precoated with *Galanthus nivalis* lectin (GNA) and incubated for 16 h at 4 °C. Following that, the plates were blocked in PBST with 3% BSA and used immediately or stored at −20 °C. The pooled mouse sera were tested in 1:1000 PSB dilutions containing 0.3% BSA. Finally, the binding of the antibodies to the recombinant proteins was detected by goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies diluted to 1:2500 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and the 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine substrate.

2.8. IgG Purification from Mouse Sera

IgGs were isolated from mouse serum using NAb Protein G Spin Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Briefly, 300 µL of pooled mouse sera was transferred into the spin columns and incubated for 30 min at RT. Subsequently, purified IgGs were eluted from the resin with low pH elution buffer and concentrated using Amicon Ultra 100 K centrifugal filter units (Merck Millipore, Burlington, MA, USA).

2.9. Virus Stocks for HCVcc Neutralization Assay

HCVcc virus stocks with sequence confirmed E1 and E2 were produced in Huh7.5 cells in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (P/S) as previously described [43]. As HCVcc, JFH1-based HCV recombinants with Core-NS2 of the following genotypes (isolates) and specified cell culture adaptive substitutions were used: 1a(TN) with R1408W [44], 1b(J4) with F886L and Q1496L [43], 2a(J6) [45], 2b(J8) [43], 3a(S52) with I793S and K1404Q [43], 4a(ED43) with T827A and T977S [46], 5a(SA13) with A1022G and K1119R [47], and 6a(HK6a) with F350S and N417T [43].

2.10. HCVcc Neutralization Assay

The cell-based in vitro HCV neutralization assay was done as previously described [47] with modifications. Briefly, 7×10^4 Huh7.5 cells were plated per well in a poly-D-lysine-coated 96-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark) in DMEM supplemented with FBS and P/S. The next day, a 96-well pre-plate with virus and antibody mixes was prepared. The amount of virus stock yielding counts of 20–100 focus forming units (FFU)/well in pilot assays was diluted in medium to a total volume of 7 µL and mixed with 3 µL serially diluted purified IgG; for virus-only wells, 3 µL medium was added. Virus/antibody mixes were incubated at 37 °C and 5% CO₂ for 1.5 h. Subsequently, medium was added to a total volume of 40 µL per well and the solution was transferred to the cell plate. After 4.5 h incubation at 37 °C and 5% CO₂, cells were washed with PBS and incubated with fresh medium. Each antibody concentration was tested in triplicates. At least 6 virus-only wells and negative control wells without virus and antibody mixes were included in each assay. At 48 h post-infection, cells were fixed with methanol and incubated with PBS containing 0.5% (*w/v*) BSA and 0.1% (*w/v*) skimmed milk for 1 h and subsequently incubated with AffiniPure Fab Fragment Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno Research, West Grove, USA) diluted in PBS at 100 µg/mL for 1 h and immunohistochemically stained. Antibodies were diluted in PBS containing 0.5% (*w/v*) BSA and 0.1% (*w/v*) skimmed milk; the primary antibody 9E10⁴² was diluted 1:5000, and the secondary antibody ECL anti-mouse IgG HRP-linked whole antibody (GE Healthcare, Amersham, UK) was diluted 1:500; both were incubated overnight at 4 °C and visualized with Pierce™ DAB Substrate Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). FFU were counted and neutralization was evaluated as described [48]. Briefly, an ImmunoSpot series 5 UV analyzer (CTL Europe GmbH, Bonn, Germany) and customized software were used for

automated counting of FFU. Percentage of neutralization was calculated by relating the number of FFU in each well to the mean number of FFU in virus-only wells.

3. Results

3.1. Expression of the Chimeric sHBsAg-Based Particles

The sequences coding for HCV (genotype 1a, isolate H77C [41]) E2 glycoprotein regions spanning residues 412–425, 434–446, 502–520, and 523–535 were inserted individually or in combinations into the sequence of the major antigenic loop of HBV sHBsAg protein at positions corresponding with amino acids I110/S117 (Δ 111–116) and P127/A128 (Figure 1a,b), previously reported to support peptide insertions without an impact on particle formation. Additionally, cysteine residue substitution (C→A) in epitope 502–520 was performed in order to minimize the risk of tertiary conformation disturbance.

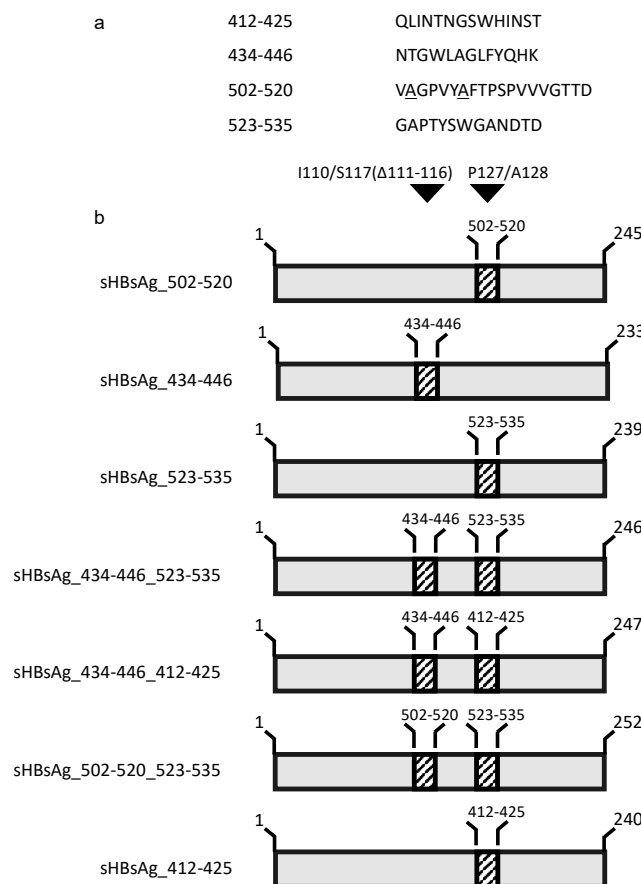


Figure 1. Construction of chimeric proteins. (a) Epitope sequences were derived from the hepatitis C virus (HCV) isolate H77C (GenBank accession no. AF011751). The underlined alanine corresponds to the substituted cysteine. (b) Recombinant constructs were generated by insertion of the sequences coding for HCV E2 epitopes into the sequence coding for the hydrophilic loop of the hepatitis B virus (HBV) small surface antigen (sHBsAg) protein at positions I110/S117(Δ 111–116) and/or P127/A128—insertion sites are marked with black arrows.

Chimeric VLPs were produced in high-density cell cultures using the tetracycline-inducible *Leishmania tarentolae* expression system. The expression of proteins was confirmed by SDS-PAGE of cell lysates, followed by a western blot with sHBsAg-specific antibodies (Figure 2a). In reducing conditions, the molecular masses of monomers of the chimeric proteins fell in the range of 27–35 kDa. The difference in the molecular masses of the monomers was probably associated not only with the insertion of the HCV E2-derived epitopes, but also with the molecular mass of the additional N-glycans. In comparison

to the wild-type sHBsAg, chimeric particles carrying the 412–425 epitope contain two additional glycosylation sites at positions N417 and N423. The chimeric particles exposing the 523–535 epitope contain one additional glycosylation site at position N532. For all chimeric proteins, multimers of higher molecular mass were also detected. Notably, during cultivation of the recombinant *Leishmania tarentolae* cells, we consistently observed a lower protein level for sHBsAg_434–446 in comparison to those of other chimeric proteins and the sHBsAg wild-type (wt) control. This finding is in agreement with the poor growth kinetics indicated by relatively low OD₆₀₀ of the sHBsAg_434–446 *Leishmania tarentolae* culture reached after 72h of induction, in comparison to the other recombinant cell cultures (Table 1).

Table 1. OD₆₀₀ of *Leishmania tarentolae* cell cultures. The measurement was performed for *L. tarentolae* recombinant cell lines expressing chimeric proteins 72 h after tetracycline induction. The data represent the mean values from a minimum of three independent procedures.

	OD ₆₀₀
sHBsAg_502–520	4.9
sHBsAg_434–446	2.4
sHBsAg_523–535	4.8
sHBsAg_434–446_523–535	4.8
sHBsAg_434–446_412–425	4.5
sHBsAg_502–520_523–535	5.0
sHBsAg_412–425	5.3
sHBsAg_wt	4.9

The chimeric VLPs were concentrated and partially purified from the cell lysate by ultracentrifugation on an OptiPrep gradient. Most of the sHBsAg protein monomer was distributed in fractions 9–13 (Figure 2b). The figure represents an example of the sHBsAg protein distribution in the OptiPrep gradient for sHBsAg_wt and two chimeric VLPs: sHBsAg_434–446 and sHBsAg_434–446_412–425. All other chimeric VLPs demonstrated analogous sHBsAg distribution profiles after gradient ultracentrifugation (Figure S1). Particle assembly was confirmed by transmission electron microscopy. The sHBsAg-positive fractions showed spherical particles approximately 20–30 nm in diameter (Figure 2c). In summary, although some differences in the particle expression level were observed, we were able to confirm sHBsAg-based chimeric protein production and particle formation for all designed VLPs.

3.2. Immunogenicity of the Chimeric sHBsAg-Based Particles

To investigate immunogenicity, eight groups of BALB/c mice were immunized subcutaneously with fractions containing different VLPs. All mice were immunized using the squalene-based Addavax adjuvant, an MF59 analogue, the latter being licensed in Europe for human use. After mouse immunizations, we found strong and specific antibody responses against biotinylated peptides, corresponding with the E2 sequence exposed on the surface of the chimeric VLPs. Antibody titers approaching 5×10^4 were observed for sera from all mouse groups (Figure 3a–d). The results evidenced that immunization with particles carrying single and double foreign epitopes could elicit a strong and specific antibody response against all exposed HCV epitopes.

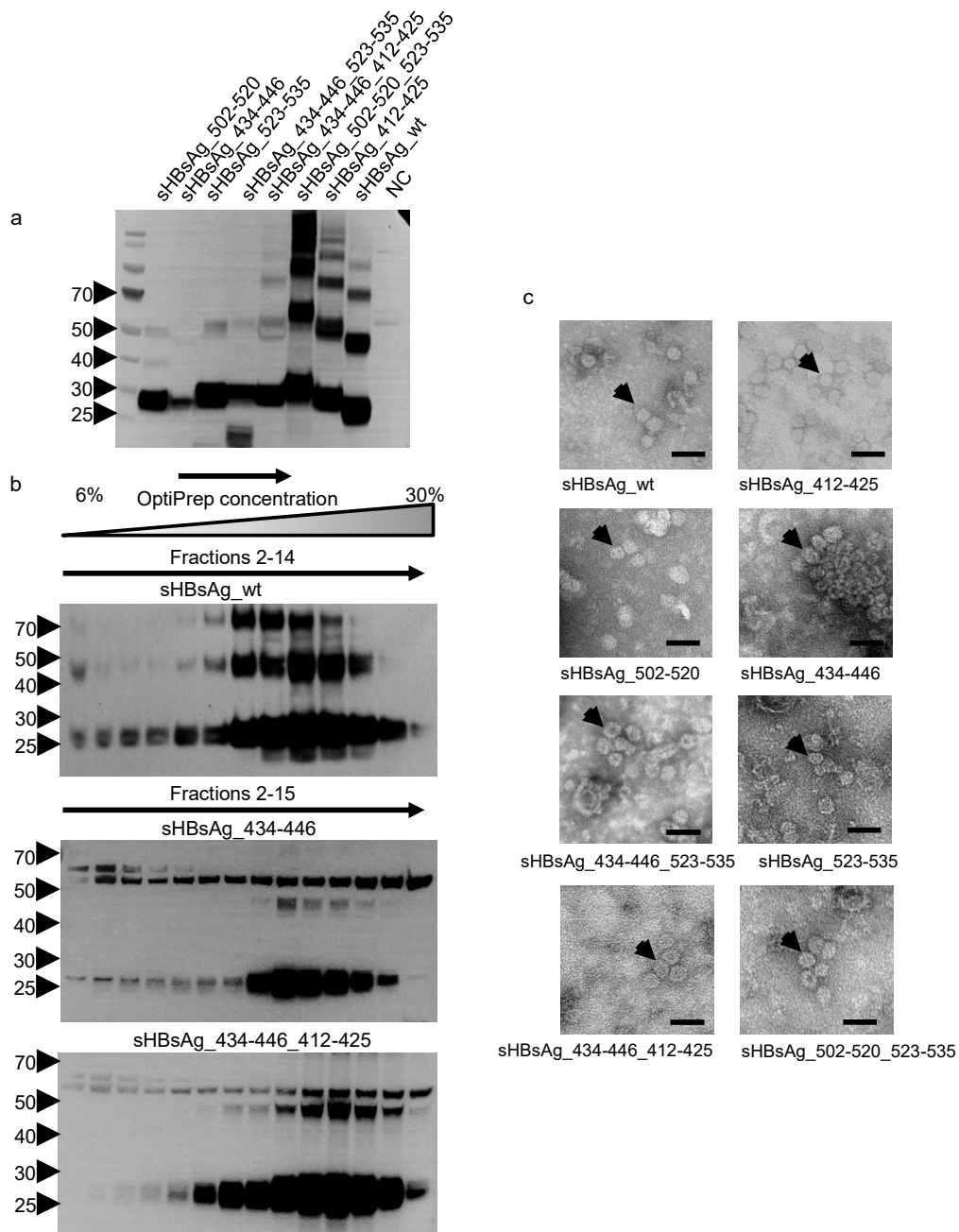


Figure 2. Expression and characterization of the chimeric proteins. **(a)** Western blot analysis of the chimeric proteins expressed in *L. tarentolae*. Cell lysates were separated using SDS-PAGE and detected with the anti-HBsAg antibody. The lysate from wild-type *L. tarentolae* cells was used as the negative control (NC). Bands of higher molecular mass correspond with the multimeric forms of the proteins. On the left protein ladder, the molecular weight in kDa is given. **(b)** In order to concentrate and partially purify the chimeric particles, lysates from the *L. tarentolae* cell cultures expressing chimeric proteins were placed on top of an OptiPrep density gradient. Seventeen fractions of 0.5 mL were harvested from top to bottom. The aliquots of fractions 2–15 were then analyzed using a western blot with anti-HBsAg antibodies. On the left protein ladder, the molecular weight in kDa is given. **(c)** Electron micrographs of chimeric sHBsAg-based particles. After concentration on the Optiprep density gradient, the chimeric particles were stained with uranyl acetate and analyzed using electron microscopy. Observed particles were approximately 20–30 nm in diameter. Black arrows: Chimeric virus-like particles (VLPs). Scale bar: 50 nm.

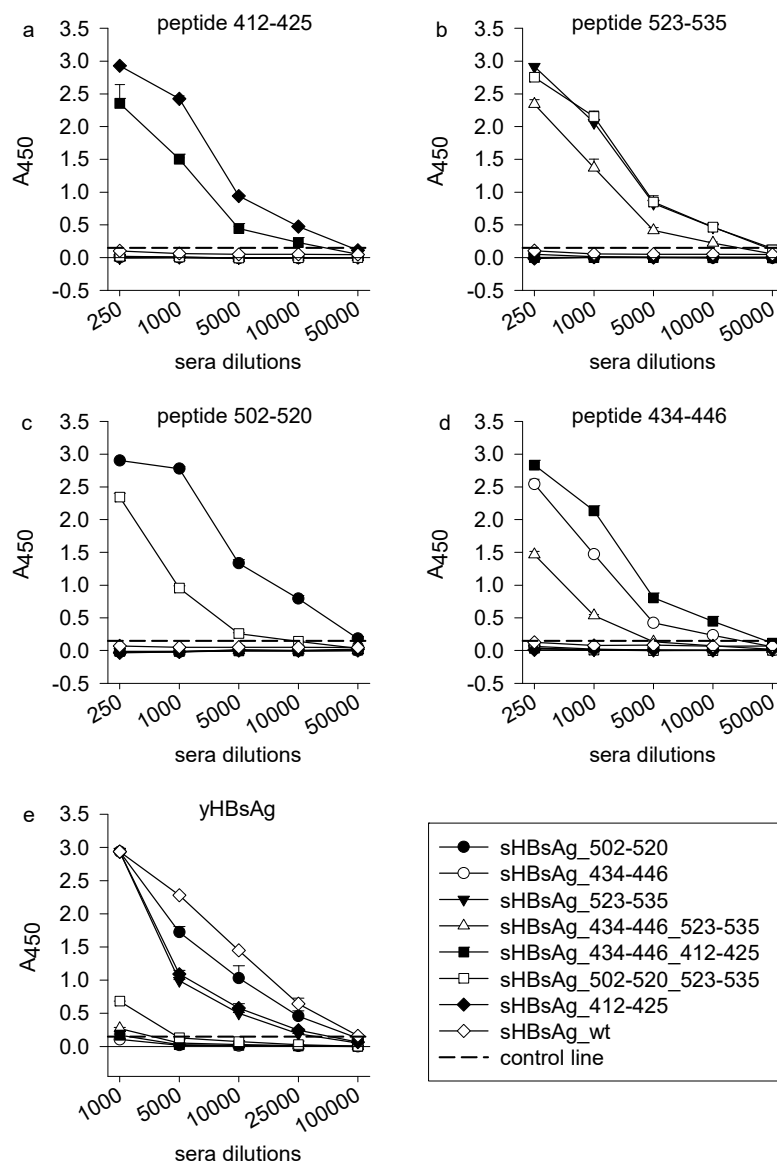


Figure 3. Immunization with chimeric sHBsAg-based particles elicited specific antibody responses in mice. (a–d) For analysis of binding of immune sera to HCV peptides, streptavidin-coated microplates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of biotinylated synthetic peptides covering epitopes 412–425, 523–535, 502–520, and 434–446 of HCV E2. (e) For analysis of binding of immune sera to yeast-derived sHBsAg (yHBsAg), ELISA plates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of purified sHBsAg protein derived from *Pichia pastoris*. The dilution factors of the mouse sera are shown on axis x . The mean A_{450} values are shown on axis y . The background signal from the negative control mouse sera was subtracted from the obtained results. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line represents the cutoff value (three times the mean background value).

A detailed serum characterization showed strong cross-reactivity to purified yeast-derived sHBsAg protein (yHBsAg) for the sera collected from the mice immunized with the sHBsAg_{502–520}, sHBsAg_{523–535}, and sHBsAg_{412–425} VLPs (Figure 3e), with the antibody endpoint titer comparable to that of wild-type sHBsAg VLPs. Weaker or no responses were observed following immunization using sHBsAg_{434–446} and all VLPs exposing two epitopes (sHBsAg_{434–446_523–535}, sHBsAg_{434–446_412–425}, and sHBsAg_{502–520_523–535}).

a		b	
412–425		412–425	
>1a (H77C)	QLINTNGSWHINST	>1a (H77C)	QLINTNGSWHINST
>1b (12.6)	. .V.R.	>1a (TN)	. .V.R.
>2a (2.4)S.R.	>1b (J4)	. .V.R.
>2b (1.1)	S.R.	>2a (J6)	. .V.R.
>3a (1.9)	. .V.R.	>2b (J8)	Y.R.
>4a (21.16)S.R.	>3a (S52)	. .V.R.
>5a (14.4)	. . .QNGS. . . .R.	>4a (ED43)S.R.
>6a (5.8)R.	>5a (SA13)R.
		>6a (HK6a) TR.
434–446		434–446	
>1a (H77C)	NTGWLAGLFYQHK	>1a (H77C)	NTGWLAGLFYQHK
>1b (12.6)	. . .F. .A. . .VRN	>1a (TN)I. . . .H. .
>2a (2.4)	. . .F. .S. . .TQR	>1b (J4)	Q. .FF. A. . .A. .
>2b (1.1)	Q. .F. .S. . .VNN	>2a (J6)	H. .FI. S. . .T.S
>3a (1.9)	. . .FI. . . .Y. .	>2b (J8)	Q. .FM. S. . .T.R
>4a (21.16)	. . .F.HYS	>3a (S52)	. . .FI. . . .Y. .
>5a (14.4)	K. .FI. . .M. VY. .	>4a (ED43)	. . .F. .S. . .T. .
>6a (5.8)	Q. .FI. S. . .FN. .	>5a (SA13)	Q. .FV. . .L. Y. .
		>6a (HK6a)	Q. .FITS. . .AKN
502–520		502–520	
>1a (H77C)	VCGPVYCFTSPVVVGTTD	>1a (H77C)	VCGPVYCFTSPVVVGTTD
>1b (12.6)	>1a (TN)
>2a (2.4)	>1b (J4)
>2b (1.1)	>2a (J6)
>3a (1.9)	>2b (J8)
>4a (21.16)	>3a (S52)
>5a (14.4)	>4a (ED43)
>6a (5.8)	>5a (SA13)
		>6a (HK6a)
523–535		523–535	
>1a (H77C)	GAPTYSWGANDTD	>1a (H77C)	GAPTYSWGANDTD
>1b (12.6)T. .E. E. .	>1a (TN)
>2a (2.4)	.V.E. E. .	>1b (J4)	.V.E. E. .
>2b (1.1)	.L.E. E. .	>2a (J6)T. .E. E. .
>3a (1.9)	.V. . .T. . .E. .	>2b (J8)	.V. . .T. .E. E. .
>4a (21.16)	.V. . .N. .E. E. .	>3a (S52)	.K. . .N. .E. E. .
>5a (14.4)	.Y. . .N. .E. . .	>4a (ED43)	.V. . .T. .E. E. .
>6a (5.8)	.N. . .T. .E. E. .	>5a (SA13)	.N.E. E. .
		>6a (HK6a)	.I. . .N. .E. E. .

Figure 4. Amino acid alignment showing the sequence conservation of the regions 412–425, 434–446, 502–520, and 523–535 for full-length E1E2 (a) and HCVcc isolates (b) used in this study. The sequence derived from the HCV genotype 1a isolate H77C (GenBank accession number AF011751) is used as the reference and indicated on the top of each alignment. Other sequences are designated according to genotype (isolate). Amino acids conserved in reference to the H77C sequence are marked with dots. For 6a (HK6a), the boxed threonine is a cell culture adaptive substitution.

Finally, we evaluated the neutralizing potency of IgG purified from the mouse sera against genotypes 1–6 HCVcc. As shown in Figure 5, a neutralizing effect was only observed for antibodies derived from the mice immunized with VLPs carrying the 412–425 epitope (sHBsAg_412–425 and sHBsAg_434–446_412–425). These antibodies showed the most potent neutralization efficacy against genotype 1a, 1b, 4a, and 5a viruses, with 80–100% neutralization at the highest IgG concentrations. In addition, they were able to neutralize genotype 2a and 2b viruses with lower efficacy, approaching ~60% neutralization at the highest IgG concentrations. In contrast, for genotype 3a and 6a viruses, less than 50% neutralization was observed at the highest concentrations tested. For genotype 6a viruses, this is likely explained by the essential cell culture adaptive substitution N417T in the 412–425 region (Figure 4b) [43].

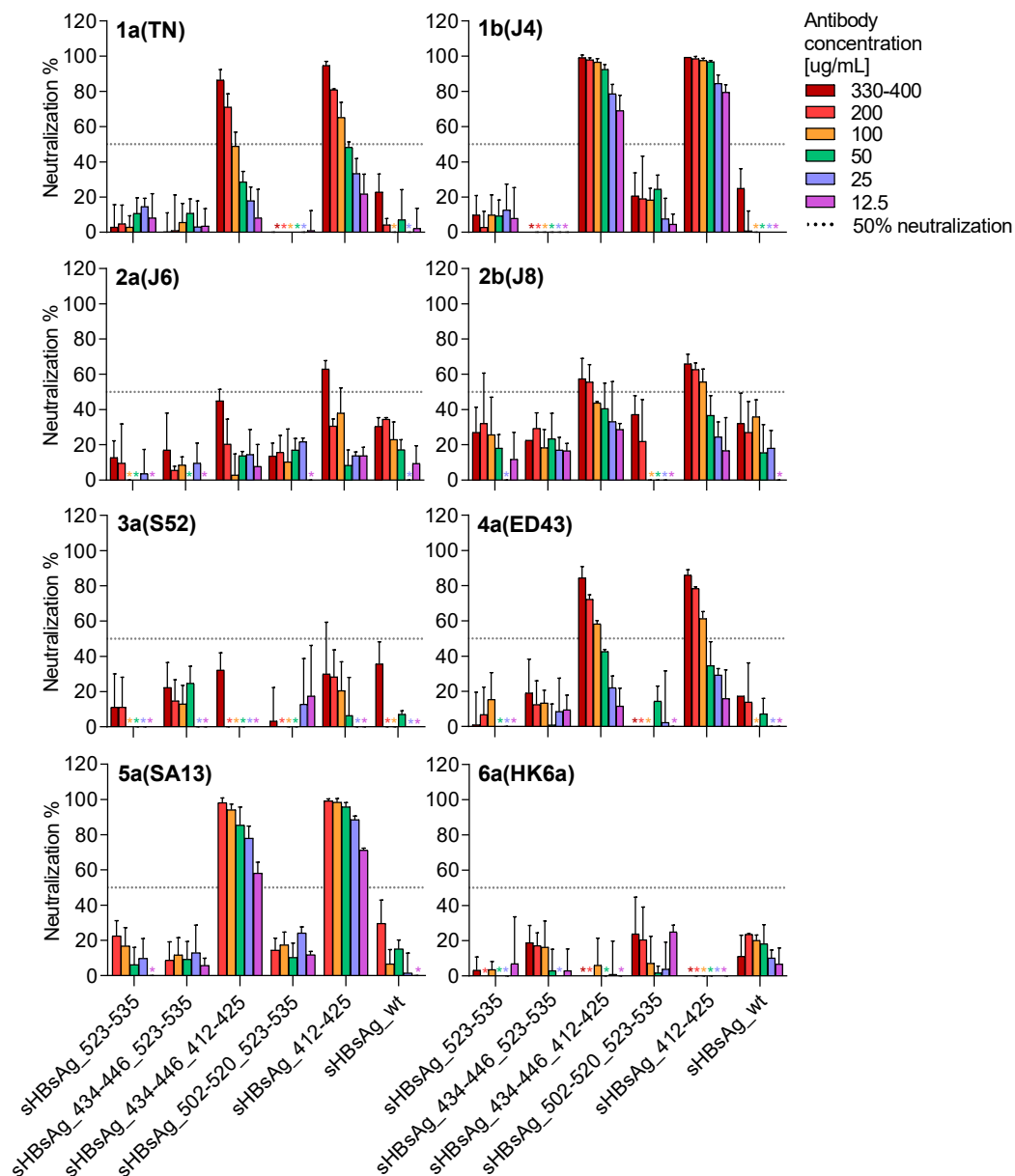


Figure 5. Chimeric VLP-induced antibodies cross-neutralized different HCV genotypes. Viruses were incubated with IgGs purified from the sera of immunized mice and pooled for each experimental group. The antibodies were pre-incubated with viruses of HCV genotypes (isolates) 1a (TN), 1b (J4), 2a (J6), 2b (J8), 3a (S52), 4a (ED43), 5a (SA13), and 6a (HK6a) for 1.5 h, followed by incubation of Huh7.5 cells with antibody-virus mixes for 4.5 h. The neutralization effect (%) was determined relative to cultures infected with the respective viruses in the absence of antibodies. The data represent the mean values from three technical replicates and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line marks 50% virus neutralization. Neutralization values of $\leq 0\%$ are not shown; *, asterisks are added in cases where error bars and neutralization values are $\leq 0\%$.

Thus, immunogenicity studies revealed that all designed VLPs were immunogenic, as they were eliciting antibodies recognizing specifically the HCV E2 epitope used for immunization. However, only sera from mice immunized with VLPs carrying epitopes 412–425 and 523–535 were able to recognize native E1E2 heterodimers and only VLPs with epitope 412–425 were capable of eliciting a strong HCV cross-neutralizing antibody response.

4. Discussion

We developed a panel of sHBsAg-based VLPs carrying moderately to highly conserved and immunogenic epitopes derived from the HCV E2 glycoprotein using the economically attractive *Leishmania tarentolae* expression system. Following immunization with the adjuvant Addavax, which is similar to the MF59 adjuvant licensed for human use in Europe, VLPs carrying the 412–425 epitope elicited potent cross-neutralizing IgGs with isolate specific neutralization differences, suggesting differences in epitope accessibility on HCVcc.

Previously, chimeric sHBsAg-based VLPs were developed carrying the HCV E2 HVR1 [38,40]. This approach might be problematic due to the high variability of the HVR1 protein sequence. Considering the high genetic diversity and structural flexibility of HCV E2, efforts should be made to target immune responses to conserved epitopes. Therefore, we here explored several HCV E2 epitopes as potential vaccine antigens.

Epitope I (residues 412–423) is an important target for broadly neutralizing antibodies and has been proposed as the target of antibody-based therapy [18,20,21]. Our results highlight the ability of epitope I to induce HCV cross-reactive antibodies. In previous research, we found sera of sHBsAg_{412–425}-immunized mice to bind E2 glycoproteins derived from different HCV genotypes under denaturing conditions by western blotting [39]. Here, we demonstrated that sera induced by immunization with VLPs carrying epitope I recognized E1E2 complexes derived from different genotypes under native conditions by ELISA, suggesting that epitope I is accessible in the native E1E2 complexes. Most importantly, purified IgG targeting epitope I showed an impressive HCV cross-neutralization potency.

While genotype 2a and 2b viruses showed comparatively low neutralization sensitivity, we observed highly efficient neutralization of genotype 1a, 1b, 4a, and 5a viruses. It should be noted that although the antibodies directed against the 412–425 epitope failed to recognize 5a (14.4) E1E2 in the native ELISA, they effectively neutralized 5a (SA13) HCVcc only differing at one residue in the 412–425 epitope from H77C. Observed neutralization efficacies were comparable to those reported for efficient human monoclonal antibodies [49]. In contrast, antibodies to epitope I failed to neutralize genotype 3a and 6a viruses. For the 6a virus, the lack of neutralization sensitivity can most probably be explained by the presence of the “glycan shift” substitution N417T, which is critical for cell culture adaptation, also of another genotype 6a isolate [50]. It was previously described that a single substitution N417S or N417T resulted in a shift of the N-glycosylation site from N417 to N415 and effectively prevented recognition of epitope I by some antibodies [20,51,52]. Future neutralization studies with genotype 6a HCVpp not depending on this cell culture adaptive substitution could prove whether genotype 6a isolates with native epitope I sequence are neutralized by sHBsAg_{412–425}-induced antibodies.

Interestingly, our data suggest that epitope I might be shielded in the studied genotype 3a virus and to a lesser extent in the genotype 2a and 2b viruses, as the efficiently neutralized 1a virus had the same epitope I sequence as the 3a virus, and the efficiently neutralized 1b virus had the same epitope I sequence as the 2a virus. This hypothesis is supported by the finding that AP33 Fab fragments, targeting epitope I, neutralized the 1b virus used in this study with high efficacy and the studied 2a and 2b viruses with lower efficacy, while no significant neutralization of the used 3a virus was observed (Prentoe, personal communication). It has previously been reported that HCV envelope features, such as HVR1-mediated epitope protection, determined differences in neutralization susceptibility rather than just sequence diversity [53]. Future research possibly involving structural analysis will be required to prove the hypothesis on differential shielding of epitope I in different HCV isolates. Moreover, in future research, it would be interesting to investigate if these observed effects are genotype or isolate specific, by developing and/or using already developed HCVcc, preferably without cell culture adaptive substitutions in the envelope proteins.

We investigated immunogenicity of three additional relatively conserved epitopes localized in the E2 CD81-binding region comprising residues 434–446, 502–520, and 523–535. Each of these epitopes has previously been described as important for binding of both neutralizing and non-neutralizing

anti-HCV antibodies. However, most of these antibodies were described to be conformation-sensitive and recognized discontinuous epitopes located within the CD81 binding region [22,26,54,55]. Similarly, we found that these epitopes were immunogenic and that antibodies targeting these epitopes recognized synthetic peptides and, except for antibodies targeting epitope 434–446, also denatured E1E2. In contrast, antibodies targeting these epitopes were less efficient in recognizing E1E2 in native ELISA and were not neutralizing HCVcc. This suggests that residues 434–446, 502–520, and 523–535 might not be accessible in the E1E2 complex and on HCVcc and thus, induction of antibodies targeting conformational epitopes covering these regions might be required for efficient virus neutralization. The role of antibodies binding residues 434–446 (epitope II) is still under debate. It was reported that such antibodies enhanced HCV neutralization mediated by antibodies targeting epitope I in a synergistic manner [56,57]. On the other hand, it was also suggested that epitope II might be associated with non-neutralizing antibodies mediating antibody-interference by hindering binding of neutralizing antibodies targeting epitope I. Thus, depletion of epitope II-specific antibodies from the serum samples collected from HCV-positive patients [58,59] as well as E1E2 immunized chimpanzees [59] and humans [60] improved neutralizing activity of antibodies targeting epitope I [58–60].

Residues 523–535 (epitope III) localize to the C-terminal part of the CD81 binding loop and are an important target for human conformation-sensitive, broadly neutralizing antibodies [61]. Even though antibodies induced by VLPs carrying epitope 523–535 were binding native E1E2 of several isolates, they failed to neutralize HCVcc. Thus, also according to prior evidence, antibodies targeting conformational but not linear epitopes within this region might be required for efficient neutralization [62]. Moreover, the 523–535 region is suggested to adopt different conformations [63,64], which might influence epitope accessibility.

The less well characterized residues 502–520 were proposed as a possible fusion peptide [65], and, more recently, to be of importance for interaction with HCV entry receptors [26]. Antibodies induced by VLPs carrying residues 502–520 were binding denatured but not native E1E2 of all tested isolates and failed to neutralize HCVcc. This could be explained by poor accessibility of the 502–520 epitope, as it is located within the E2 β -sandwich structure [25,26]. In line with this hypothesis, antibodies targeting this region were detected after animal immunizations using a subunit vaccine, but were not induced during natural infection of chimpanzees and humans [24]. It is also possible that C503A and C508A substitutions in the 502–520 epitope (Figure 1) hindered the binding of the sHBsAg_502–520 VLP-elicited antibodies to the native E1E2 heterodimer.

The obtained results proved that exposition of a single epitope on the sHBsAg particle does not necessarily disturb the ability of chimeric particles to induce an immune response against the carrier protein. Thus, sera from mice immunized with most VLPs exposing a single epitope yielded titers of anti-sHBsAg antibodies that were comparable to that of the sera from mice immunized with the wild-type sHBsAg VLPs. This phenomenon is consistent with previously published data [34,38–40]. In contrast, insertion of the 434–446 epitope reduced the particle's ability to elicit sHBsAg-specific antibodies. This might be caused by changes in the carrier protein conformation or overall particle formation. This hypothesis is supported by our observation that sHBsAg proteins including HCV residues 434–446 at position P127/A128 were unable to assemble into VLPs (unpublished data). Even though this hindrance was overcome by insertion at position I110/S117 (Δ 111–116), growth of *Leishmania tarentolae* cells expressing sHBsAg_434–446 and expression of these VLPs was significantly reduced compared to the other VLPs (Figure 2a, Table 1). In addition, inclusion of two HCV epitopes into the hydrophilic loop of sHBsAg interfered strongly with the antibody response elicited against the carrier protein. Thus, if an sHBsAg-based VLP vaccine should feature different HCV epitopes and protect against both HCV and HBV, a mixture of VLPs carrying single HCV epitopes might be more suitable than exposure of different epitopes on the surface of a single VLP.

A recent study by Wei et al. [66] also explored immunogenicity of sHBsAg-based VLPs carrying different HCV epitopes (residues 313–327 in E1 as well as 412–423, 523–535, and HVR1 in E2). Less than 50% neutralization of genotype 1a, 1b, and 2a HCVcc in comparison to pre-immunization control

serum was observed for serum from mice immunized with single VLPs. The fact that Wei et al. observed limited neutralization with antibodies induced by epitope III might be explained by different presentation of the 523–535 epitope on the surface of the VLPs, due to the insertion of a HIS-tag. However, direct comparison of our results with the study by Wei et al. is hindered due to the lack of specification of the dilutions of mouse sera used for HCVcc neutralization and use of serum instead of purified IgG in neutralization assays, which might be problematic, as interfering serum components might perturb assay results [67].

In this study, we have shown that sHBsAg-based VLPs are able to successfully present different linear HCV epitopes. Elicited antibodies specifically target linear epitopes within the E2 glycoprotein and could in the future be used in studies addressing epitope accessibility for different HCV isolates. Among all tested VLPs, only those comprising 412–425 or 523–535 epitopes were able to induce antibodies recognizing native E1E2 complexes. An HCV neutralization effect was only observed for antibodies induced by VLPs carrying the 412–425 epitope. Although epitope I is suggested to be hidden from the humoral immune response in HCV-infected individuals [68], chimeric particles carrying this epitope elicited high titers of cross-reactive and cross-neutralizing antibodies against HCV while preserving anti-sHBsAg immunity. Interestingly, isolate-specific differences in neutralization efficacy of the antibodies elicited using epitope I suggested isolate-specific epitope accessibility. Future in vivo studies could potentially verify the effectiveness of vaccine-induced immunity; however, at present there are no robust immunocompetent animal models permissive for HCV [15]. In light of the data from the present study, region 412–425 derived from the HCV E2 glycoprotein remains the most promising epitope for further sHBsAg-based bivalent prophylactic vaccine research. In conclusion, vaccination with sHBsAg_412–425 VLPs in combination with additional antigen capable of inducing conformation-dependent antibodies would be beneficial for successful development of a pan-genotypic vaccine against HCV.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-393X/8/2/294/s1>, Figure S1: OptiPrep density gradient lysates from the *Leishmania tarentolae* cell cultures expressing chimeric proteins.

Author Contributions: Conceptualization, A.C. and K.G.; methodology, A.C., A.O., A.F.P. and J.P.; validation, J.M.G. and K.G.; formal analysis, A.C., K.G., A.O. and J.M.G.; investigation, A.C. and A.O.; resources, K.B.-S., J.B. and J.M.G.; data curation, A.C., A.O. and J.M.G.; writing—original draft preparation, A.C., K.G., A.O. and J.M.G.; writing—review and editing, A.C., K.G., J.M.G., A.O., A.F.P., J.P., J.B. and K.B.-S.; supervision, K.G. and J.M.G.; project administration, A.C., K.G., J.B. and J.M.G.; funding acquisition, A.C., K.G., A.O., J.B. and J.M.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported by The National Science Centre grants no. UMO-2016/23/N/NZ6/02503 (A.C) and UMO-2017/27/B/NZ6/01403 (K.G), PhD stipends from the Candys Foundation and PhD bonuses from the University of Copenhagen (A.O, A.F.P), and grants from the Novo Nordisk Foundation (J.B, J.M.G), The Danish Innovation Fund (J.B, J.M.G), The Region H Foundation (J.B, J.M.G), and The Toyota Foundation (A.O, J.M.G).

Acknowledgments: We would like to thank Arvind Patel (University of Glasgow), Jonathan Ball (University of Nottingham), and Charles Rice (The Rockefeller Center, USA) for providing reagents. We are also grateful to Grażyna Peszyńska-Sularz, Monika Dmochowska, and Beata Muszyńska (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk) for animal care, Malwina Richert and Dorota Łuszczek (University of Gdańsk) for assistance in the electron microscopy analysis, Lotte Mikkelsen, Pia Pedersen, and Anna-Louise Sørensen (Copenhagen University Hospital, Hvidovre) for general laboratory assistance, and Bjarne Ø. Lindhardt (Copenhagen University Hospital, Hvidovre) and Carsten Geisler (University of Copenhagen) for their support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. World Health Organization. *Global Hepatitis Report*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2017; ISBN 978-92-4-156545-5.
2. Spengler, U. Direct antiviral agents (DAAs)—A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol. Ther.* **2018**, *183*, 118–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Pawlotsky, J.-M. Retreatment of hepatitis C virus-infected patients with direct-acting antiviral failures. *Semin. Liver Dis.* **2019**, *39*, 354–368. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sarrazin, C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J. Hepatol.* **2016**, *64*, 486–504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Kinchen, V.J.; Cox, A.L.; Bailey, J.R. Can broadly neutralizing monoclonal antibodies lead us to a hepatitis C virus vaccine? *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 854–864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Fuerst, T.R.; Pierce, B.G.; Keck, Z.-Y.; Fong, S.K.H. Designing a B cell-based vaccine against a highly variable hepatitis C virus. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Fauvelle, C.; Colpitts, C.C.; Keck, Z.-Y.; Pierce, B.G.; Fong, S.K.H.; Baumert, T.F. Hepatitis C virus vaccine candidates inducing protective neutralizing antibodies. *Expert Rev. Vaccines* **2016**, *15*, 1535–1544. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Plotkin, S.A.; Plotkin, S.L. The development of vaccines: How the past led to the future. *Nat. Rev. Microbiol.* **2011**, *9*, 889–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Choo, Q.L.; Kuo, G.; Ralston, R.; Weiner, A.; Chien, D.; Van Nest, G.; Han, J.; Berger, K.; Thudium, K.; Kuo, C. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 1294–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Swadling, L.; Capone, S.; Antrobus, R.D.; Brown, A.; Richardson, R.; Newell, E.W.; Halliday, J.; Kelly, C.; Bowen, D.; Fergusson, J.; et al. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts and sustains functional HCV specific T-cell memory. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 261ra153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Trial Evaluating Experimental Hepatitis C Vaccine Concludes|NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Available online: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/trial-evaluating-experimental-hepatitis-c-vaccine-concludes> (accessed on 26 November 2019).
12. Smith, D.B.; Bukh, J.; Kuiken, C.; Muerhoff, A.S.; Rice, C.M.; Stapleton, J.T.; Simmonds, P. Expanded classification of hepatitis C virus into 7 genotypes and 67 subtypes: Updated criteria and genotype assignment web resource. *Hepatology* **2014**, *59*, 318–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Borgia, S.M.; Hedskog, C.; Parhy, B.; Hyland, R.H.; Stamm, L.M.; Brainard, D.M.; Subramanian, M.G.; McHutchison, J.G.; Mo, H.; Svarovskaia, E.; et al. Identification of a novel hepatitis C virus genotype from Punjab, India: Expanding classification of hepatitis C virus into 8 genotypes. *J. Infect. Dis.* **2018**, *218*, 1722–1729. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Simmonds, P.; Becher, P.; Bukh, J.; Gould, E.A.; Meyers, G.; Monath, T.; Muerhoff, S.; Pletnev, A.; Rico-Hesse, R.; Smith, D.B.; et al. ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2–3. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Bukh, J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J. Hepatol.* **2016**, *65*, S2–S21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Messina, J.P.; Humphreys, I.; Flaxman, A.; Brown, A.; Cooke, G.S.; Pybus, O.G.; Barnes, E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **2015**, *61*, 77–87. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Pileri, P.; Uematsu, Y.; Campagnoli, S.; Galli, G.; Falugi, F.; Petracca, R.; Weiner, A.J.; Houghton, M.; Rosa, D.; Grandi, G.; et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* **1998**, *282*, 938–941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Aleman, F.; Tzarum, N.; Kong, L.; Nagy, K.; Zhu, J.; Wilson, I.A.; Law, M. Immunogenetic and structural analysis of a class of HCV broadly neutralizing antibodies and their precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7569–7574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Pierce, B.G.; Keck, Z.-Y.; Lau, P.; Fauvelle, C.; Gowthaman, R.; Baumert, T.F.; Fuerst, T.R.; Mariuzza, R.A.; Fong, S.K.H. Global mapping of antibody recognition of the hepatitis C virus E2 glycoprotein: Implications for vaccine design. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, E6946–E6954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Chung, R.T.; Gordon, F.D.; Curry, M.P.; Schiano, T.D.; Emre, S.; Corey, K.; Markmann, J.F.; Hertl, M.; Pomposelli, J.J.; Pomfret, E.A.; et al. Human monoclonal antibody MBL-HCV1 delays HCV viral rebound following liver transplantation: A randomized controlled study. *Am. J. Transplant.* **2013**, *13*, 1047–1054. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Owsianka, A.; Tarr, A.W.; Juttla, V.S.; Lavillette, D.; Bartosch, B.; Cosset, F.-L.; Ball, J.K.; Patel, A.H. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J. Virol.* **2005**, *79*, 11095–11104. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Krey, T.; Meola, A.; Keck, Z.; Damier-Piolle, L.; Fount, S.K.H.; Rey, F.A. Structural basis of HCV neutralization by human monoclonal antibodies resistant to viral neutralization escape. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Keck, Z.-Y.; Wang, Y.; Lau, P.; Lund, G.; Rangarajan, S.; Fauvelle, C.; Liao, G.C.; Holtsberg, F.W.; Warfield, K.L.; Aman, M.J.; et al. Affinity maturation of a broadly neutralizing human monoclonal antibody that prevents acute hepatitis C virus infection in mice. *Hepatology* **2016**, *64*, 1922–1933. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Kachko, A.; Kochneva, G.; Sivolobova, G.; Grazhdantseva, A.; Lupan, T.; Zubkova, I.; Wells, F.; Merchlinsky, M.; Williams, O.; Watanabe, H.; et al. New neutralizing antibody epitopes in hepatitis C virus envelope glycoproteins are revealed by dissecting peptide recognition profiles. *Vaccine* **2011**, *30*, 69–77. [[CrossRef](#)]
25. Kong, L.; Giang, E.; Nieuwma, T.; Kadam, R.U.; Cogburn, K.E.; Hua, Y.; Dai, X.; Stanfield, R.L.; Burton, D.R.; Ward, A.B.; et al. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* **2013**, *342*, 1090–1094. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lavie, M.; Sarrazin, S.; Montserret, R.; Descamps, V.; Baumert, T.F.; Duverlie, G.; Séron, K.; Penin, F.; Dubuisson, J. Identification of conserved residues in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 that modulate virus dependence on CD81 and SRB1 entry factors. *J. Virol.* **2014**, *88*, 10584–10597. [[CrossRef](#)]
27. Owsianka, A.M.; Timms, J.M.; Tarr, A.W.; Brown, R.J.P.; Hickling, T.P.; Szejek, A.; Bienkowska-Szewczyk, K.; Thomson, B.J.; Patel, A.H.; Ball, J.K. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J. Virol.* **2006**, *80*, 8695–8704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Li, W.; Joshi, M.D.; Singhanian, S.; Ramsey, K.H.; Murthy, A.K. Peptide vaccine: Progress and challenges. *Vaccines* **2014**, *2*, 515–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Marintcheva, B. Chapter 8—Viruses as tools for vaccine development. In *Harnessing the Power of Viruses*; Marintcheva, B., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2018; pp. 217–242, ISBN 978-0-12-810514-6.
30. Roldão, A.; Mellado, M.C.M.; Castilho, L.R.; Carrondo, M.J.T.; Alves, P.M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* **2010**, *9*, 1149–1176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Bruss, V.; Gerhardt, E.; Vieluf, K.; Wunderlich, G. Functions of the large hepatitis B virus surface protein in viral particle morphogenesis. *Intervirology* **1996**, *39*, 23–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Gavilanes, F.; Gonzalez-Ros, J.M.; Peterson, D.L. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 7770–7777. [[PubMed](#)]
33. Cheong, W.-S.; Reiseger, J.; Turner, S.J.; Boyd, R.; Netter, H.-J. Chimeric virus-like particles for the delivery of an inserted conserved influenza A-specific CTL epitope. *Antivir. Res.* **2009**, *81*, 113–122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cheong, W.-S.; Drummer, H.E.; Netter, H.-J. Delivery of a foreign epitope by sharing amino acid residues with the carrier matrix. *J. Virol. Methods* **2009**, *158*, 35–40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Delpyroux, F.; Chenciner, N.; Lim, A.; Malpièce, Y.; Blondel, B.; Crainic, R.; van der Werf, S.; Streeck, R.E. A poliovirus neutralization epitope expressed on hybrid hepatitis B surface antigen particles. *Science* **1986**, *233*, 472–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Kotiw, M.; Johnson, M.; Pandey, M.; Fry, S.; Hazell, S.L.; Netter, H.J.; Good, M.F.; Olive, C. Immunological response to parenteral vaccination with recombinant hepatitis B virus surface antigen virus-like particles expressing *Helicobacter pylori* KatA epitopes in a murine *H. pylori* challenge model. *Clin. Vaccine Immunol.* **2012**, *19*, 268–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Patient, R.; Hourieux, C.; Vaudin, P.; Pagès, J.-C.; Roingeard, P. Chimeric hepatitis B and C viruses envelope proteins can form subviral particles: Implications for the design of new vaccine strategies. *New Biotechnol.* **2009**, *25*, 226–234. [[CrossRef](#)]
38. Viethier, P.T.K.; Boo, I.; Drummer, H.E.; Netter, H.-J. Immunizations with chimeric hepatitis B virus-like particles to induce potential anti-hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Antivir. Ther.* **2007**, *12*, 477–487.
39. Czarnota, A.; Tyborowska, J.; Peszyńska-Sularz, G.; Gromadzka, B.; Bieńkowska-Szewczyk, K.; Grzyb, K. Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb. Cell Fact.* **2016**, *15*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Netter, H.J.; Macnaughton, T.B.; Woo, W.P.; Tindle, R.; Gowans, E.J. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J. Virol.* **2001**, *75*, 2130–2141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

41. Yanagi, M.; Purcell, R.H.; Emerson, S.U.; Bukh, J. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 8738–8743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Lavillette, D.; Tarr, A.W.; Voisset, C.; Donot, P.; Bartosch, B.; Bain, C.; Patel, A.H.; Dubuisson, J.; Ball, J.K.; Cosset, F.-L. Characterization of host-range and cell entry properties of the major genotypes and subtypes of hepatitis C virus. *Hepatology* **2005**, *41*, 265–274. [[CrossRef](#)]
43. Gottwein, J.M.; Scheel, T.K.H.; Jensen, T.B.; Lademann, J.B.; Prentoe, J.C.; Knudsen, M.L.; Hoegh, A.M.; Bukh, J. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: Role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* **2009**, *49*, 364–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Scheel, T.K.H.; Gottwein, J.M.; Carlsen, T.H.R.; Li, Y.-P.; Jensen, T.B.; Spengler, U.; Weis, N.; Bukh, J. Efficient culture adaptation of hepatitis C virus recombinants with genotype-specific Core-NS2 by using previously identified mutations. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2891–2906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lindenbach, B.D.; Evans, M.J.; Syder, A.J.; Wölk, B.; Tellinghuisen, T.L.; Liu, C.C.; Maruyama, T.; Hynes, R.O.; Burton, D.R.; McKeating, J.A.; et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **2005**, *309*, 623–626. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Scheel, T.K.H.; Gottwein, J.M.; Jensen, T.B.; Prentoe, J.C.; Hoegh, A.M.; Alter, H.J.; Eugen-Olsen, J.; Bukh, J. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 997–1002. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Jensen, T.B.; Gottwein, J.M.; Scheel, T.K.H.; Hoegh, A.M.; Eugen-Olsen, J.; Bukh, J. Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: Failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J. Infect. Dis.* **2008**, *198*, 1756–1765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Gottwein, J.M.; Scheel, T.K.H.; Callendret, B.; Li, Y.-P.; Eccleston, H.B.; Engle, R.E.; Govindarajan, S.; Satterfield, W.; Purcell, R.H.; Walker, C.M.; et al. Novel infectious cDNA clones of hepatitis C virus genotype 3a (strain S52) and 4a (strain ED43): Genetic analyses and In Vivo pathogenesis studies. *J. Virol.* **2010**, *84*, 5277–5293. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Carlsen, T.H.R.; Pedersen, J.; Prentoe, J.C.; Giang, E.; Keck, Z.-Y.; Mikkelsen, L.S.; Law, M.; Fong, S.K.H.; Bukh, J. Breadth of neutralization and synergy of clinically relevant human monoclonal antibodies against HCV genotypes 1a, 1b, 2a, 2b, 2c, and 3a. *Hepatology* **2014**, *60*, 1551–1562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Pham, L.V.; Ramirez, S.; Gottwein, J.M.; Fahnøe, U.; Li, Y.-P.; Pedersen, J.; Bukh, J. HCV genotype 6a escape from and resistance to Velpatasvir, Pibrentasvir, and Sofosbuvir in robust infectious cell culture models. *Gastroenterology* **2018**, *154*, 2194–2208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Li, Y.; Pierce, B.G.; Wang, Q.; Keck, Z.-Y.; Fuerst, T.R.; Fong, S.K.H.; Mariuzza, R.A. Structural basis for penetration of the glycan shield of hepatitis C virus E2 glycoprotein by a broadly neutralizing human antibody. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 10117–10125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Pantua, H.; Diao, J.; Ultsch, M.; Hazen, M.; Mathieu, M.; McCutcheon, K.; Takeda, K.; Date, S.; Cheung, T.K.; Phung, Q.; et al. Glycan shifting on hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 1899–1914. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Prentoe, J.; Velázquez-Moctezuma, R.; Fong, S.K.H.; Law, M.; Bukh, J. Hypervariable region 1 shielding of hepatitis C virus is a main contributor to genotypic differences in neutralization sensitivity. *Hepatology* **2016**, *64*, 1881–1892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Keck, Z.-Y.; Li, T.-K.; Xia, J.; Bartosch, B.; Cosset, F.-L.; Dubuisson, J.; Fong, S.K.H. Analysis of a highly flexible conformational immunogenic domain A in hepatitis C virus E2. *J. Virol.* **2005**, *79*, 13199–13208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Giang, E.; Dorner, M.; Prentoe, J.C.; Dreux, M.; Evans, M.J.; Bukh, J.; Rice, C.M.; Ploss, A.; Burton, D.R.; Law, M. Human broadly neutralizing antibodies to the envelope glycoprotein complex of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 6205–6210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tarr, A.W.; Urbanowicz, R.A.; Jayaraj, D.; Brown, R.J.P.; McKeating, J.A.; Irving, W.L.; Ball, J.K. Naturally occurring antibodies that recognize linear epitopes in the amino terminus of the hepatitis C virus E2 protein confer noninterfering, additive neutralization. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2739–2749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

57. Keck, Z.; Wang, W.; Wang, Y.; Lau, P.; Carlsen, T.H.R.; Prentoe, J.; Xia, J.; Patel, A.H.; Bukh, J.; Fong, S.K.H. Cooperativity in virus neutralization by human monoclonal antibodies to two adjacent regions located at the amino terminus of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J. Virol.* **2013**, *87*, 37–51. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Zhang, P.; Wu, C.G.; Mihalik, K.; Virata-Theimer, M.L.; Yu, M.W.; Alter, H.J.; Feinstone, S.M. Hepatitis C virus epitope-specific neutralizing antibodies in Igs prepared from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 8449–8454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zhang, P.; Zhong, L.; Struble, E.B.; Watanabe, H.; Kachko, A.; Mihalik, K.; Virata-Theimer, M.L.; Alter, H.J.; Feinstone, S.; Major, M. Depletion of interfering antibodies in chronic hepatitis C patients and vaccinated chimpanzees reveals broad cross-genotype neutralizing activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 7537–7541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kachko, A.; Frey, S.E.; Sirota, L.; Ray, R.; Wells, F.; Zubkova, I.; Zhang, P.; Major, M.E. Antibodies to an interfering epitope in hepatitis C virus E2 can mask vaccine-induced neutralizing activity. *Hepatology* **2015**, *62*, 1670–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Tzarum, N.; Wilson, I.A.; Law, M. The neutralizing face of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *Front. Immunol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Ball, J.K.; Tarr, A.W.; McKeating, J.A. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antivir. Res.* **2014**, *105*, 100–111. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Vasiliauskaitė, I.; Owsianka, A.; England, P.; Khan, A.G.; Cole, S.; Bankwitz, D.; Fong, S.K.H.; Pietschmann, T.; Marcotrigiano, J.; Rey, F.A.; et al. Conformational flexibility in the immunoglobulin-like domain of the hepatitis C virus glycoprotein E2. *mBio* **2017**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Khan, A.G.; Whidby, J.; Miller, M.T.; Scarborough, H.; Zatorski, A.V.; Cygan, A.; Price, A.A.; Yost, S.A.; Bohannon, C.D.; Jacob, J.; et al. Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature* **2014**, *509*, 381–384. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Krey, T.; d’Alayer, J.; Kikuti, C.M.; Saulnier, A.; Damier-Piolle, L.; Petitpas, I.; Johansson, D.X.; Tawar, R.G.; Baron, B.; Robert, B.; et al. The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, e1000762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Wei, S.; Lei, Y.; Yang, J.; Wang, X.; Shu, F.; Wei, X.; Lin, F.; Li, B.; Cui, Y.; Zhang, H.; et al. Neutralization effects of antibody elicited by chimeric HBV S antigen viral-like particles presenting HCV neutralization epitopes. *Vaccine* **2018**, *36*, 2273–2281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Tarr, A.W.; Backx, M.; Hamed, M.R.; Urbanowicz, R.A.; McClure, C.P.; Brown, R.J.P.; Ball, J.K. Immunization with a synthetic consensus hepatitis C virus E2 glycoprotein ectodomain elicits virus-neutralizing antibodies. *Antivir. Res.* **2018**, *160*, 25–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Tarr, A.W.; Owsianka, A.M.; Jayaraj, D.; Brown, R.J.P.; Hickling, T.P.; Irving, W.L.; Patel, A.H.; Ball, J.K. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 2991–3001. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



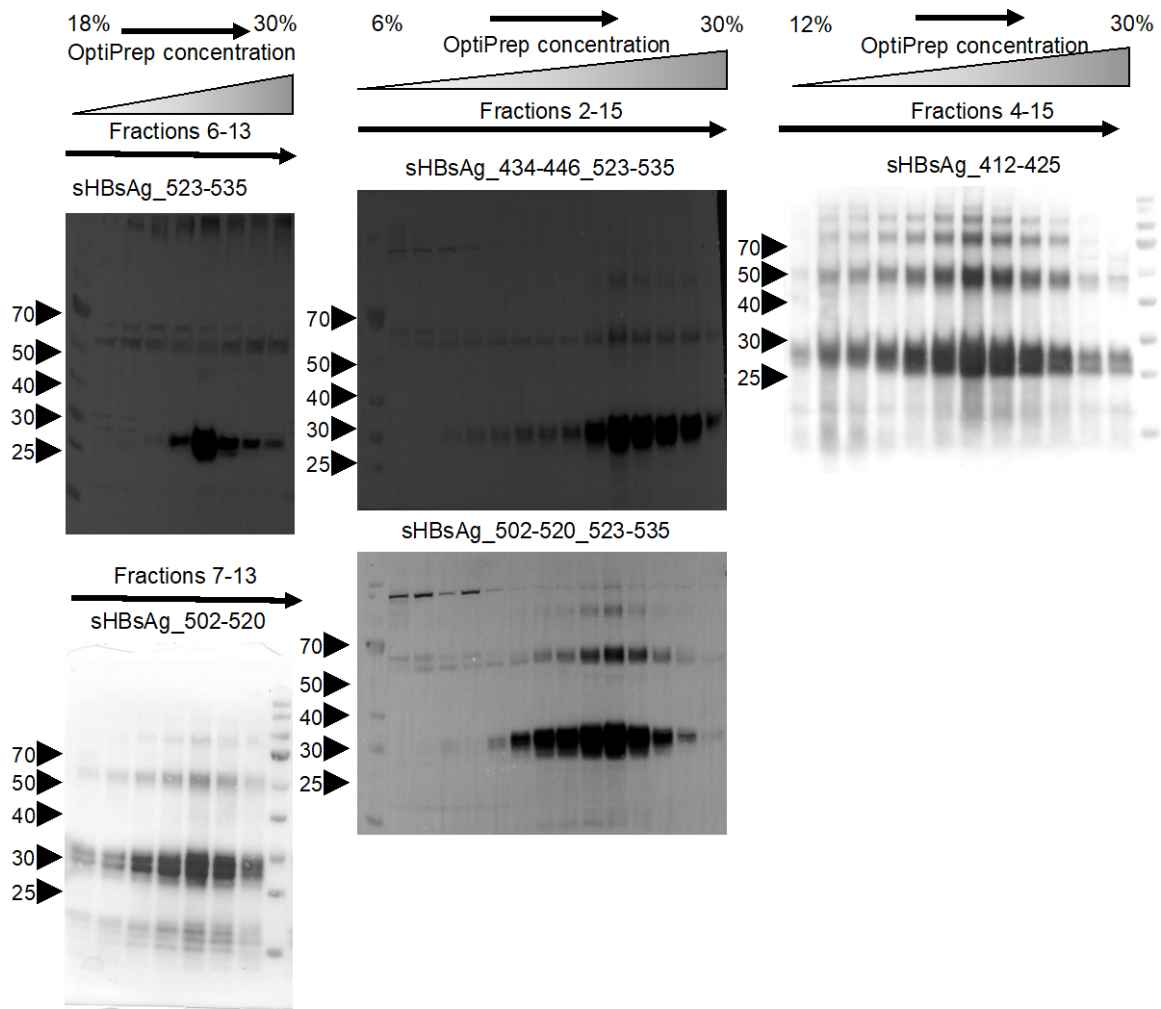



Figure S1. OptiPrep density gradient lysates from the *L. tarentolae* cell cultures expressing chimeric proteins. Seventeen fractions of 0.5 mL were harvested from top to bottom. The aliquots were then analyzed using western blot with anti-HBsAg antibodies. On the left, protein ladder, the molecular weight in kDa is given.



Effect of Glycan Shift on Antibodies against Hepatitis C Virus E2 412–425 Epitope Elicited by Chimeric sHBsAg-Based Virus-Like Particles

 Anna Czarnota,^a  Anna Offersgaard,^{b,c}  Ania Owsianka,^d  Garazi Peña Alzua,^{b,c}  Jens Bukh,^{b,c}  Judith Margarete Gottwein,^{b,c}
 Arvind H. Patel,^d  Krystyna Bienkowska-Szewczyk,^a  Katarzyna Grzyb^a

^aLaboratory of Virus Molecular Biology, Intercollegiate Faculty of Biotechnology of the University of Gdańsk and Medical University of Gdańsk, Gdańsk, Poland

^bCopenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP), Department of Infectious Diseases, Copenhagen University Hospital—Hvidovre, Hvidovre, Denmark

^cDepartment of Immunology and Microbiology, Faculty of Health and Medical Sciences, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark

^dMRC-University of Glasgow Centre for Virus Research, Glasgow, United Kingdom

ABSTRACT Two of the most important mechanisms of hepatitis C virus (HCV) immune evasion are the high variability of the amino acid sequence and epitope shielding via heavy glycosylation of the envelope (E) proteins. Previously, we showed that chimeric sHBsAg (hepatitis B virus [HBV] small surface antigen)-based virus-like particles (VLPs) carrying highly conserved epitope I from the HCV E2 glycoprotein (sHBsAg_{412–425}) elicit broadly neutralizing antibodies (bnAbs). However, many reports have identified escape mutations for such bnAbs that shift the N-glycosylation site from N417 to N415. This shift effectively masks the recognition of epitope I by antibodies raised against the wild-type glycoprotein. To investigate if glycan-shift-mediated immune evasion could be overcome by targeted vaccination strategies, we designed sHBsAg-based VLPs carrying epitope I with an N417S change (sHBsAg_{N417S}). Studies in BALB/c mice revealed that both sHBsAg_{412–425} and sHBsAg_{N417S} VLPs were immunogenic, eliciting antibodies that recognized peptides encompassing epitope I regardless of the N417S change. However, we observed substantial differences in E1E2 glycoprotein binding and cell culture-derived HCV (HCVcc) neutralization between the sera elicited by sHBsAg_{412–425} and those elicited by sHBsAg_{N417S} VLPs. Our results suggest a complex interplay among antibodies targeting epitope I, the E1E2 glycosylation status, and the epitope or global E1E2 conformation. Additionally, we observed striking similarities in the E1E2 glycoprotein binding patterns and HCVcc neutralization between sHBsAg_{412–425} sera and AP33, suggesting that the immunization of mice with sHBsAg_{412–425} VLPs can elicit AP33-like antibodies. This study emphasizes the role of antibodies against epitope I and represents an initial effort toward designing an antigen that elicits an immune response against epitope I with a glycan shift change.

IMPORTANCE Epitope I, located within amino acids 412 to 423 of the HCV E2 glycoprotein, is an important target for an epitope-based HCV vaccine. One interesting feature of epitope I is the N417 glycosylation site, where a single change to S417 or T417 can shift the glycosylation site to position N415. This shift can effectively prevent the binding of broadly neutralizing antibodies targeting epitope I. Aiming to overcome glycan-shift-mediated immune evasion, we constructed sHBsAg_{N417S} VLPs carrying E2 epitope I, with N417S, and compared them with VLPs carrying wild-type epitope I. We show that antibodies elicited by the sHBsAg-based VLPs presenting two variants of the 412–425 epitope targeted two distinct glycan variants of the HCV E1E2 heterodimer. Our study suggests that due to the conformational flexibility of the E2 glycoprotein and epitope I, future vaccine antigens should elicit antibodies targeting more than one conformation and glycosylation variant of the 412–423 epitope.

Editor Saumitra Das, Indian Institute of Science Bangalore

Copyright © 2023 Czarnota et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Anna Czarnota, anna.czarnota@phdstud.ug.edu.pl, or Katarzyna Grzyb, katarzyna.grzyb@ug.edu.pl. The authors declare no conflict of interest.

Received 4 October 2022

Accepted 12 January 2023

KEYWORDS glycan shift, hepatitis B virus, hepatitis C virus, vaccines, virus-like particles

It is estimated that at least 58 million individuals worldwide are chronically infected with hepatitis C virus (HCV), resulting in increased risks of chronic liver disease and hepatocellular carcinoma, causing about 300,000 deaths, annually (1). In recent years, new antiviral therapies based on direct-acting antivirals (DAAs) have been introduced (2). However, due to poor diagnostic coverage and high treatment costs, it has become apparent that in many countries, only a small fraction of HCV-infected individuals will receive DAA therapy. In addition, reinfections among people who inject drugs are common, and emerging resistance to DAAs is expected to compromise treatment efficacy (3, 4). Thus, the development of an effective prophylactic vaccine against HCV is required to control the spread of this virus (5, 6) and to support disease elimination efforts. Such a vaccine should ideally generate broadly neutralizing antibodies (bnAbs) able to prevent infection caused by various circulating genotypes and subtypes of HCV. However, the high genetic heterogeneity and conformational flexibility of the envelope glycoproteins of HCV pose a major obstacle to effective vaccine design (5, 7).

The prime targets of host neutralizing antibodies, the HCV envelope glycoproteins E1 and E2, located on the surface of the viral particle, show extensive genetic heterogeneity, particularly in the hypervariable regions localized in the E2 glycoprotein (8, 9). Thus, an effective vaccine should preferentially raise neutralizing antibodies against genetically conserved regions of the E1E2 heterodimer to elicit bnAbs (7, 10, 11).

The most important linear neutralizing HCV epitope and, thus, an important vaccine target is the antigenic domain comprising epitope I located within amino acids (aa) 412 to 423 of the E2 glycoprotein (412–423 epitope). This region is involved in HCV binding to the CD81 entry receptor (12, 13) and is conserved among over 5,500 E2 sequences in the GenBank database (14). However, Tarr et al. highlighted the low immunogenicity of the 412–423 epitope in natural infection, as the prevalence of antibodies against epitope I in sera from HCV-infected patients was only 2.5% (15). Therefore, the efficient presentation of the 412–423 epitope to the immune system should be an important goal for HCV vaccine design. We previously showed that the expression of amino acids 412 to 425, encompassing the 412–423 epitope, on the hepatitis B virus (HBV) small surface antigen (sHBsAg) elicited high levels of bnAbs against HCV (16).

One interesting feature of epitope I is the N417 glycosylation site, defined by the canonical N-X-S/T glycosylation signal sequence, where a single change to S417 or T417 can shift the glycosylation site to position N415 (17). Several monoclonal antibodies (mAbs) targeting epitope I have been isolated from rodents and humans, including mouse AP33 (12, 14, 18), rat 3/11 (18, 19), human HCV1 (20) and HC33.1 (21), as well as humanized MRCT10.v362 and hu5B3.v3 (17). However, the N-linked glycan shift can effectively prevent the binding of the broadly neutralizing AP33, the humanized counterparts, and HCV1 to epitope I (14, 17). Furthermore, HCV escape variants carrying N417S/T glycan shift changes were selected during treatment with mAbs targeting epitope I (22, 23).

To investigate if glycan-shift-mediated immune evasion could be overcome by targeted vaccination strategies, we constructed sHBsAg_{N417S} virus-like particles (VLPs) carrying E2 aa 412 to 425, comprising epitope I, with the N417S change (QLINT**S**GSWHINST [change indicated in boldface type]), thereby introducing a glycan shift into the epitope. These particles were compared with previously described sHBsAg_{412–425} VLPs presenting the wild-type 412–425 epitope (QLINTNGSWHINST) on the surface of sHBsAg VLPs (24). In this study, we compared the binding of antibodies elicited by the sHBsAg_{N417S} and sHBsAg_{412–425} VLPs to HCV peptides and native HCV E1E2 complexes with and without the N417S change and tested the impact of the N417S change on the neutralization of cell culture-infectious HCV (HCVcc). Moreover, we compared the E1E2 binding

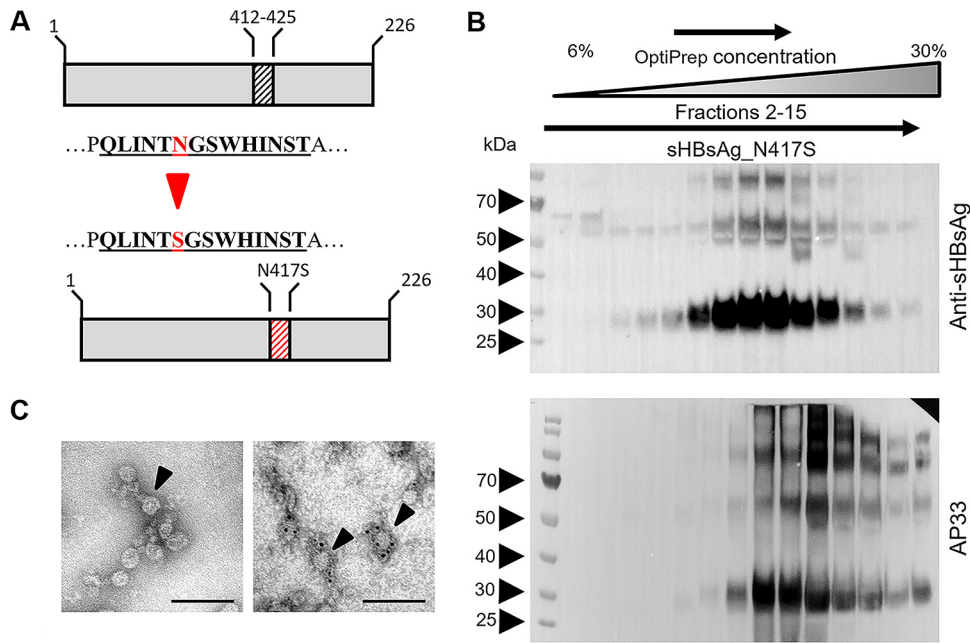


FIG 1 Construction of chimeric proteins. (A) The 412–425 sequence was derived from HCV isolate H77C (GenBank accession no. AF011751) and comprises epitope I (aa 412 to 423) with two additional amino acids, S424 and T425. The N417S epitope was generated by an N417 substitution with S in the 412–425 epitope; changed amino acids are marked in red. Chimeric constructs were generated by the insertion of the sequences coding for HCV E2 epitopes into the sequence coding for the hydrophilic loop of the sHBsAg protein at position P127/A128. (B) To concentrate and partially purify the chimeric particles, lysates from *L. tarentolae* cell cultures expressing chimeric proteins were placed on top of an OptiPrep density gradient. Seventeen fractions of 0.5 mL were harvested from top to bottom. Aliquots of fractions 2 to 15 were then analyzed using Western blotting with anti-sHBsAg pAb or AP33. On the left protein ladder, the molecular weight in kilodaltons is given. (C) Electron micrographs of chimeric sHBsAg-based particles. (Left) After concentration on the OptiPrep density gradient, the chimeric particles were stained with uranyl acetate and analyzed using electron microscopy. The observed particles were approximately 20 to 30 nm in diameter. (Right) The binding of AP33 to the N417S epitope was studied by immunogold labeling using secondary goat anti-mouse antibodies conjugated with 6-nm gold particles. Black arrowheads indicate chimeric VLPs. Bars, 100 nm.

pattern of the antibodies elicited by the sHBsAg-based VLPs to that of well-characterized, broadly neutralizing mAbs.

RESULTS

Expression and characterization of chimeric sHBsAg-based particles. The construction, expression, and characterization of the sHBsAg_{412–425} VLPs were described previously (16, 24). In short, the sequence coding for the HCV (genotype 1a isolate H77C [25]) E2 glycoprotein region spanning residues 412 to 425 was inserted into the sequence of the major antigenic loop of the HBV sHBsAg protein at positions corresponding to amino acid P127/A128. The addition of amino acids S424 and T425 to epitope I (aa 412 to 423) retained the natural N2 glycosylation site at N423. For the generation of sHBsAg_{N417S} VLPs, a single point mutation was introduced into the sequence coding for the 412–425 epitope, changing asparagine (N417) to serine (S417) (Fig. 1A).

Chimeric VLPs were produced in high-density cell cultures using the tetracycline-inducible *Leishmania tarentolae* expression system and in mammalian HEK293F cells. The sHBsAg_{N417S} VLPs were concentrated and partially purified from the cell lysate by ultracentrifugation on an OptiPrep gradient. The expression of proteins was confirmed by SDS-PAGE of the gradient fractions followed by Western blotting with sHBsAg-specific antibodies. The molecular mass of the sHBsAg_{N417S} monomer was approximately 30 kDa, and most of the sHBsAg_{N417S} protein was distributed in fractions 8 to 11 (Fig. 1B). Particle assembly was confirmed by transmission electron microscopy. The sHBsAg-positive fractions showed spherical particles approximately 25 nm in diameter (Fig. 1C, left). Additionally, immunogold labeling of the sHBsAg_{N417S} particles with

AP33 revealed the selective labeling of the VLPs, strongly suggesting that despite the N417S change, the presented epitope was successfully recognized by AP33 (Fig. 1B and C, right; see also Fig. S1A in the supplemental material).

To test the glycosylation status of the *L. tarentolae*-derived VLPs, we treated them with peptide *N*-glycosidase F (PNGase F) and endo- β -*N*-acetylglucosaminidase Hf (endo Hf) (Fig. S1B). We observed a shift in the migration patterns for the samples treated with PNGase F; however, they were unaffected by endo Hf. This suggests that VLPs produced in the *L. tarentolae* system are composed of complex and not hybrid or high-mannose glycans. Similar results were observed for VLPs produced in human embryonic kidney HEK293F cells (Fig. S1B).

To further characterize sHBsAg_N417S VLPs, we used the following HCV E2 412–423 epitope-specific antibodies: AP33, which is unable to recognize the E2 glycoprotein carrying the N417S change (17, 26), and HC33.1, which binds E2 with the N-glycosylation site at either N417 or N415, with a higher affinity for the N415 variant (27). Interestingly, sHBsAg_N417S VLPs were recognized by AP33 with the same efficiency as that for sHBsAg_412–425 VLPs in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), with no cross-reactivity with sHBsAg particles (Fig. 2). Similarly, HC33.1 bound both sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S particles, with no differences in affinity being observed between the two (Fig. 2). Similar results were obtained for sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S VLPs expressed in mammalian HEK293F cells (Fig. S2).

In summary, we were able to confirm sHBsAg_N417S chimeric protein production and VLP formation. Additionally, we observed that AP33, which was sensitive to the E2 N417S change, unexpectedly bound to sHBsAg_N417S VLPs and sHBsAg_412–425 VLPs with similar efficiencies.

Immunogenicity of the chimeric sHBsAg-based particles. To investigate immunogenicity, 4 groups of 6 BALB/c mice were immunized subcutaneously with sHBsAg_412–425, sHBsAg_N417S, or wild-type sHBsAg (sHBsAg_wt) VLPs or phosphate-buffered saline (PBS). All mice were immunized using the squalene-based AddaVax adjuvant, an analog of MF59, which is licensed in Europe for human use. After mouse immunizations, we found that both sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S VLPs elicited strong and specific antibody responses against biotinylated peptides corresponding to both wild-type E2 412–425 (412–425:WT) and E2 412–425 with the N417S change (412–425:N417S). Similar antibody titers of between 5×10^4 and 10^5 were observed for sera obtained after immunization with either of the constructs (Fig. 3A). These results showed that immunization with VLPs carrying E2 412–425 with or without the glycan shift could elicit an antibody response against the corresponding linear peptide regardless of the N417S change.

Detailed serum characterization showed that similar to the sHBsAg_412–425 VLPs, sHBsAg_N417S VLPs elicited an antibody response against purified yeast-derived sHBsAg protein (yHBsAg), with an antibody titer comparable to that of wild-type sHBsAg VLPs (Fig. 3B). These results confirmed that the insertion of E2 412–425 with or without N417 did not interfere with sHBsAg immunogenicity.

We next tested the reactivity of sera from the immunized mice against mammalian cell-expressed E1E2 complexes derived from genotype 1a (H77C) with or without the N417S change (E1E2:N417S and E1E2:WT, respectively) by ELISAs. Under native conditions (Fig. 4A), sera from mice immunized with sHBsAg_412–425 showed significantly reduced binding to E1E2:N417S in comparison to binding to E1E2:WT. This binding loss could be partially recovered by the incubation of sHBsAg_412–425 sera with denatured/reduced E1E2:N417S (Fig. 4B). A similar binding pattern was observed for AP33 (Fig. 4A and B). Sera from mice immunized with sHBsAg_N417S failed to recognize E1E2:WT but exhibited strong binding to E1E2:N417S under both native and denatured/reduced conditions (Fig. 4A and B). These results suggested that despite the reactivity of both sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S sera to the synthetic linear peptides, their ability to recognize the full-length E1E2 glycoproteins was determined by the presence of the N417S change.

To test the impact of the N-linked glycans on serum binding, we performed Western blotting with E1E2 complexes treated with PNGase F. sHBsAg_412–425 sera

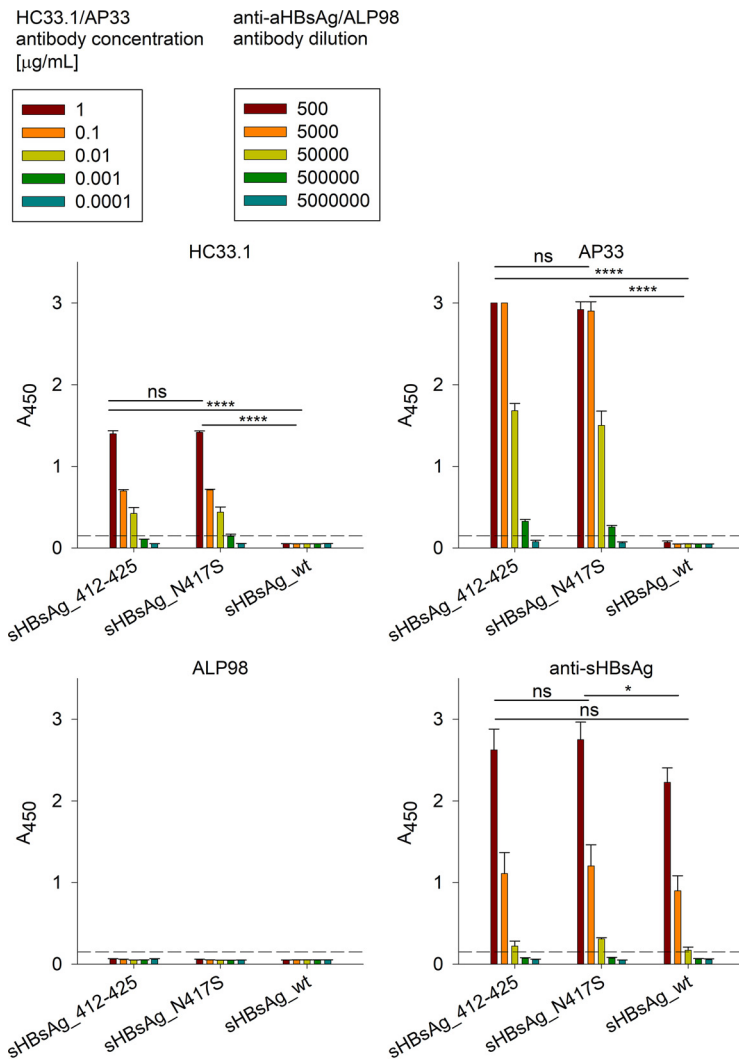


FIG 2 Recognition of VLPs by a panel of antibodies. ELISA plates were coated with partially purified sHBsAg_412–425, sHBsAg_N417S, and sHBsAg_wt VLPs, as depicted on the x axis. VLPs were probed with serial dilutions of epitope I-specific AP33/HC33.1 and anti-sHBsAg pAb. mAb ALP98 was used as a negative control. Data were analyzed using two-way analysis of variance (ANOVA) (ns [not significant], $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0001$). The mean A_{450} values are shown on the y axis. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations.

recognized glycosylated and nonglycosylated E1E2:WT and, with reduced affinity, E1E2:N417S (Fig. 5A). A similar binding pattern was observed for AP33 (Fig. 5B). For sHBsAg_N417S sera, we observed weak binding to E1E2:WT only when treated with PNGase F (Fig. 5C). Together, these data are in keeping with those shown in Fig. 4 showing sHBsAg_412–425 serum and AP33 binding to denatured/reduced E1E2: N417S, and they confirm that N-linked glycosylation at position N415 influences serum and mAb reactivities.

Next, we performed a competitive ELISA in which mouse immune sera, AP33, and mAb ALP98 were preincubated with the 412–425:WT or 412–425:N417S peptide and transferred to microtiter plates coated with E1E2:WT (Fig. 6). We observed that the binding of sHBsAg_412–425 sera and AP33 to E1E2:WT was specifically inhibited by the 412–425:WT (Fig. 6A) and 412–425:N417S (Fig. 6B) peptides. Additionally, we performed a competitive ELISA with the 412–425:W420R peptide (Fig. 6C) in which W420, an essential contact residue for AP33 and CD81 receptor binding (28), was replaced by R. As expected, no inhibition of sHBsAg_412–425 sera and AP33 by the 412–425:W420R peptide was

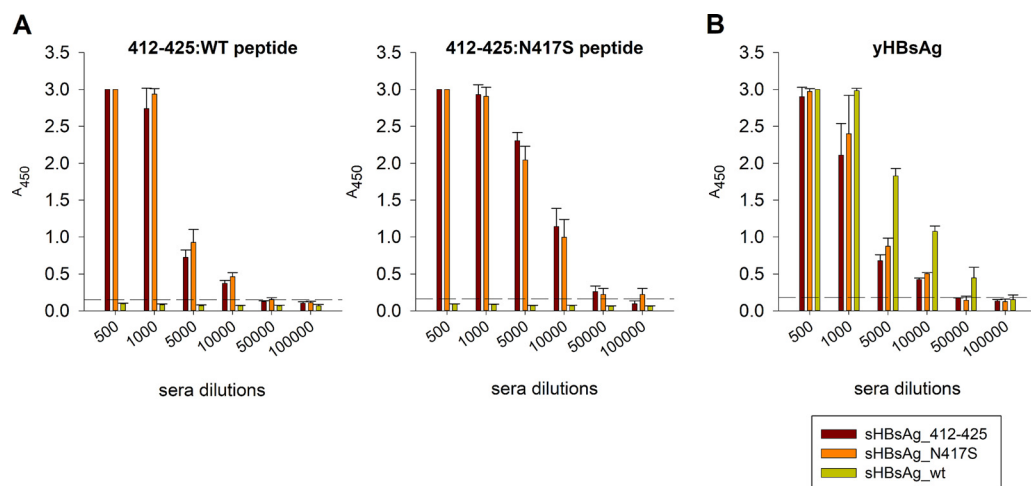


FIG 3 Analysis of antibodies elicited in mice following immunization with chimeric sHBsAg-based particles. (A) To analyze the binding of immune sera, streptavidin-coated microplates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ biotinylated synthetic peptides covering the HCV E2 412–425 and 412–425:N417S epitopes. (B) For analysis of the binding of immune sera to yeast-derived sHBsAg (yHBsAg), ELISA plates were coated with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ purified sHBsAg protein derived from *P. pastoris*. The dilution factors of the mouse sera are shown on the *x* axis. The mean A_{450} values are shown on the *y* axis. The background signal from the negative-control mouse sera was subtracted from the obtained results. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line represents the cutoff value (three times the mean background value).

observed. Consistent with the data in Fig. 4 and 5, the sHBsAg_N417S sera failed to bind E1E2:WT. As expected, the peptides did not affect the binding of the control mAb ALP98, which recognizes a different linear epitope on the E2 glycoprotein (29), to E1E2:WT. When testing the inhibition of sHBsAg_N417S serum binding to E1E2:N417S (Fig. S3), we observed specific inhibition by both the 412–425:WT and 412–425:N417S peptides, and similar to the sHBsAg_412–425 serum, sHBsAg_N417S serum binding was not inhibited by the 412–425:W420R peptide. These results provided additional support for the similarities in binding patterns between the sHBsAg_412–425 sera and AP33.

To further compare sHBsAg_412–425 sera and AP33, we evaluated binding to a panel of E1E2 (genotype 1a H77C) mutants (Fig. 7) in which each residue across the 412–423 epitope was individually replaced by alanine. As shown previously (21, 30, 31), the binding of AP33 to E1E2 was abolished by alanine substitution of L413, G418, or W420 and reduced by alanine substitution of N415 (Fig. 7A). The binding profile of the sHBsAg_412–425 serum antibodies was similar to that of AP33, as their binding to E1E2 was abrogated by the same four mutations (Fig. 7B). This finding indicated that vaccination with 412–425_sHBsAg VLPs elicited AP33-like antibodies. As expected, sHBsAg_N417S serum was not reactive to the panel, except to E1E2 with the N417A change (Fig. 7C). For comparison, we performed an assay using mAb HC33.1. We observed that HC33.1 binding was hindered by alanine substitutions at L413, G418, and W420, which is in line with previously reported data (21, 30) (Fig. 7D). These results showed that antibodies elicited by sHBsAg_N417S VLPs have an E1E2 binding pattern different from those of AP33 and HC33.1. ALP98, which recognizes a different E2 epitope, was used as a positive control (Fig. 7E).

Finally, we evaluated the neutralizing potency of IgG purified from sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S mouse sera against HCVcc with or without the N417S/T change (Fig. 8). As previously reported, antibodies derived from mice immunized with sHBsAg_412–425 VLPs efficiently neutralized HCVcc lacking the glycan shift change, Jc1: WT (Fig. 8A), SA13:WT (16), and H77:WT (Fig. 8B), whereas no neutralization effect was observed for recombinants carrying an N417 change, Jc1:N417S (Fig. 8A), H77:N417S, and HK6a:N417T (Fig. 8B). Corresponding results were observed for AP33, with efficient neutralization of Jc1:WT, H77:WT, and SA13:WT; reduced potency against H77:N417S; and no neutralization of Jc1:N417S and HK6a:N417T. On the other hand, sHBsAg_N417S

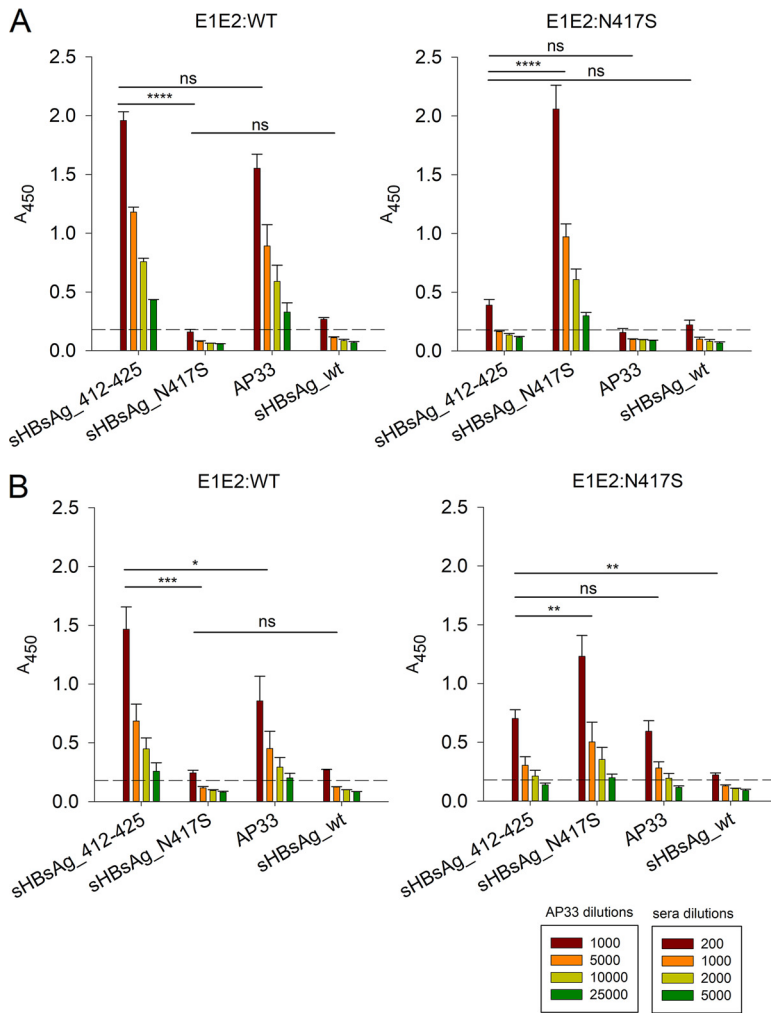


FIG 4 Reactivity of immune sera to E1E2 complexes with and without the N417S change expressed in mammalian cells. For the analysis of the binding of immune sera to E1E2 heterodimers expressed in mammalian cells, GNA-coated ELISA plates were incubated with native (A) or reduced/denatured (B) E1E2-containing cell lysates. The mean A_{450} values are shown on the y axis. Data were analyzed using two-way ANOVA (ns, $P > 0.05$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$). Data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line represents the cutoff value (three times the mean background value).

antibodies neutralized the Jc1:N417S virus carrying the N417S change to some extent at the highest IgG concentration tested (Fig. 8A); however, they did not show any neutralizing efficacy against H77:N417S and HK6a:N417T HCVcc (Fig. 8B). As expected, antibodies elicited by sHBsAg_N417S VLPs did not recognize viruses lacking the glycan shift change, Jc1:WT, H77:WT, or SA13:WT.

These findings confirmed that sHBsAg_N417S VLPs are immunogenic and elicit antibodies that specifically bind E1E2:N417S but appear to have limited neutralizing activity against HCVcc with the N417S glycan shift mutation, observed only in the context of certain virus isolates. Additionally, we described a high degree of similarity between AP33 and antibodies elicited by sHBsAg_412–425 VLPs.

DISCUSSION

HCV E2 epitope I is a highly conserved, linear epitope targeted by several bnAbs and, thus, is an interesting target for rationally designed vaccines against this deadly pathogen. However, antibodies toward epitope I were reported to be found in only

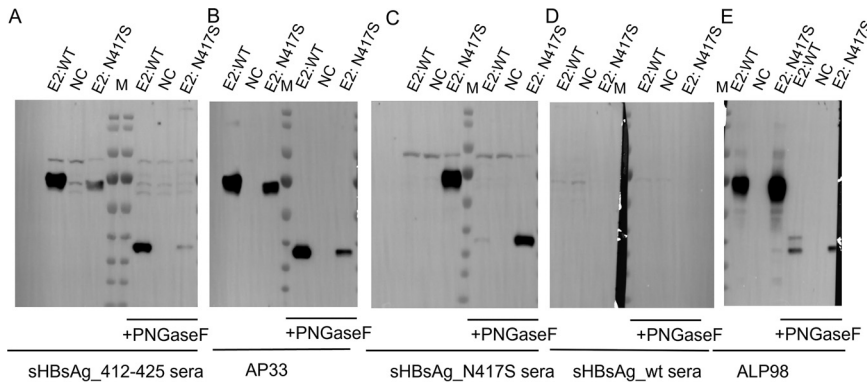


FIG 5 Reactivity of immune sera to E1E2 complexes treated with glycosidase. The E1E2 heterodimers with and without the N417S change were treated with endoglycosidase PNGase F. After overnight incubation, Western blotting under reducing conditions with mouse immune sera was performed (A and C). AP33 was used as a reference antibody (B), and sHBsAg_wt sera used as a negative control (D). ALP98, which binds to a different linear epitope on the E2 glycoprotein and was not affected by the N417S change, was used as a positive control (E). NC, negative control. Non-transfected HEK293 cell lysate is marked as NC. The protein ladder is marked with M, and the molecular weight in kDa is given.

a low percentage of chronically infected individuals (15, 21). If epitope I is to be used as a future vaccine antigen, it should be efficiently presented to the immune system. Over the years, several broadly neutralizing monoclonal antibodies targeting this region have been reported in humans and animal models, including mouse AP33 (12, 13, 18), human HC33.1 (21), rat 3/11 (19), and human HCV1 (20). HCV1 was tested in the clinic as a potential HCV treatment in infected patients undergoing liver transplantation; however, several days after HCV1 infusion, patients experienced viral rebound, with the virus population showing escape variants consistently associated with the N417 change that cause the glycan shift escape mechanism (22, 23). Similar viral evasion was observed for *in vitro* selection with AP33, where prolonged incubation of HCVcc-infected cells with AP33 resulted in the occurrence of

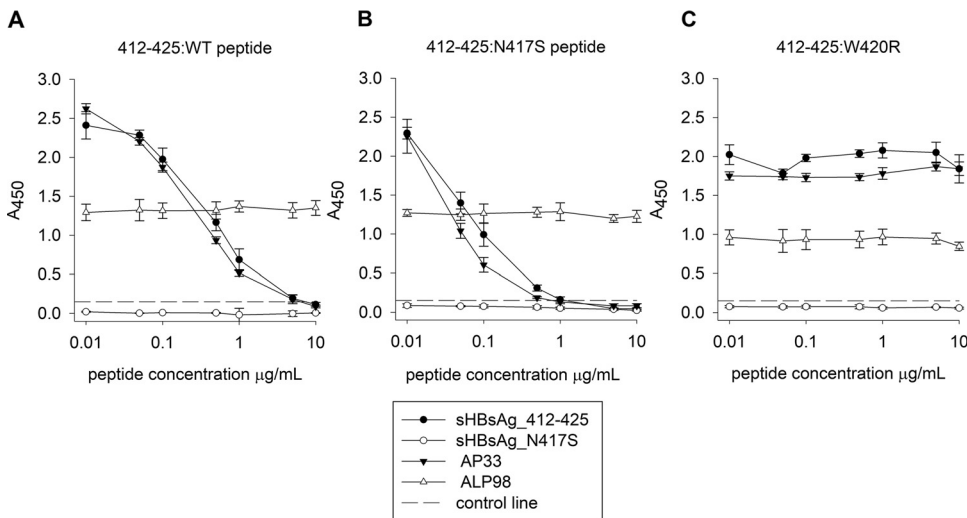


FIG 6 Immune serum binding to E1E2 complexes in a peptide competition ELISA. The sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S sera and monoclonal antibodies AP33 and ALP98 were preincubated with serial dilutions of the peptide E2 epitopes 412–425:WT (A), 412–425:N417S (B), and 412–425:W420R (C). AP33 was used as a reference antibody, and ALP98 was used as a control. The antibody-peptide mix was then tested for reactivity against E1E2:WT by a GNA capture ELISA. The peptide concentrations are shown on the x axis. The mean A_{450} values are shown on the y axis. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line represents the cutoff value (three times the mean background value).

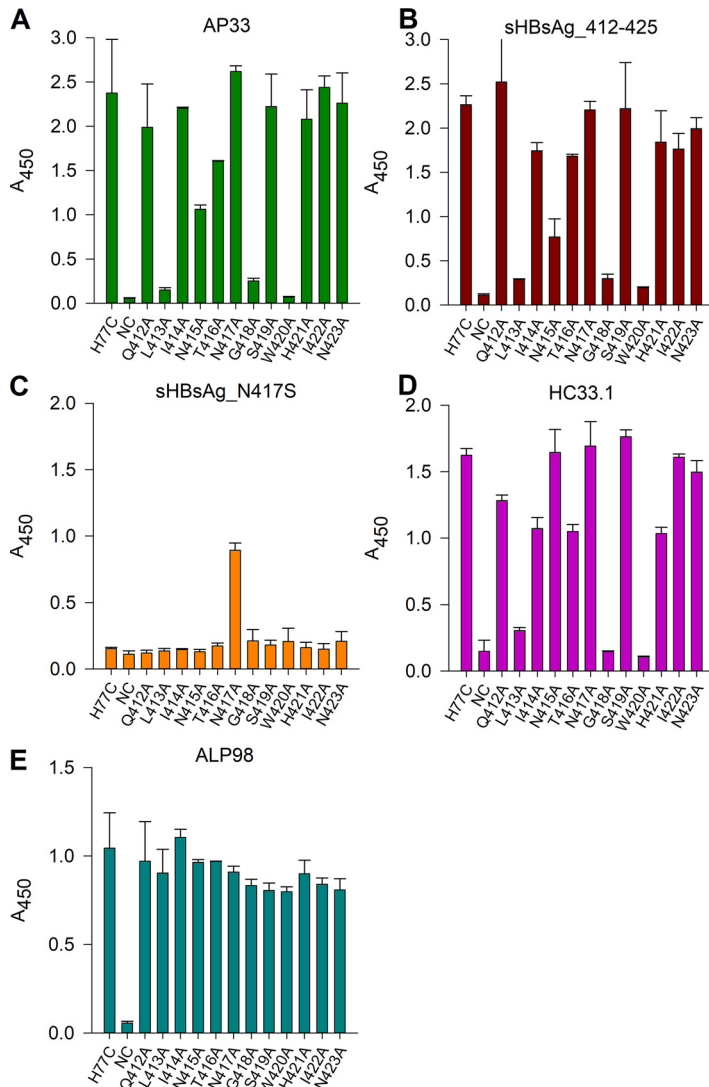


FIG 7 Reactivity of immune sera to a panel of E1E2 complex mutants in which residues across the 412–425 epitope were individually replaced by alanine. E1E2 heterodimer mutants were expressed in HEK293 cells, captured using GNA-coated ELISA plates, and probed with AP33 (diluted 1:2,500) (A), sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S sera (diluted 1:500) (B and C), HC33.1 (2 μg/mL) (D) and ALP98 (diluted 1:1,000) (E). The mean A₄₅₀ values are shown on the y axis. The substitution introduced into the E1E2 complex is annotated on the x axis according to the amino acid occurring within the H77C sequence, and the amino acid position is numbered relative to the H77C polyprotein chain. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations.

N417S/T changes, with N417S becoming dominant (17). Moreover, a previous analysis by Cowton et al. (31) via the HCV-GLUE database showed that N417S/T can be detected at a low frequency for the majority of HCV genotypes. These findings suggest that future vaccines targeting epitope I should be accompanied by antigens capable of overcoming N417-associated immune evasion mechanisms.

In this study, we designed sHBsAg-based VLPs presenting HCV E2 epitope I with the N417S change, shifting the N-glycosylation site from N417 to N415. We observed that despite the N415/N417 change, by ELISAs and immunogold staining, AP33 still bound the 412–425:N417S epitope presented on the surface of the sHBsAg-based VLPs with the same efficiency as that for the 412–425:WT epitope. This could be explained by the fact that the presentation of the 412–425:N417S epitope on the VLPs is conformationally different from its presentation in the context of the native E1E2 glycoprotein complex. The same AP33 binding was observed for sHBsAg_N417S VLPs expressed in HEK293F

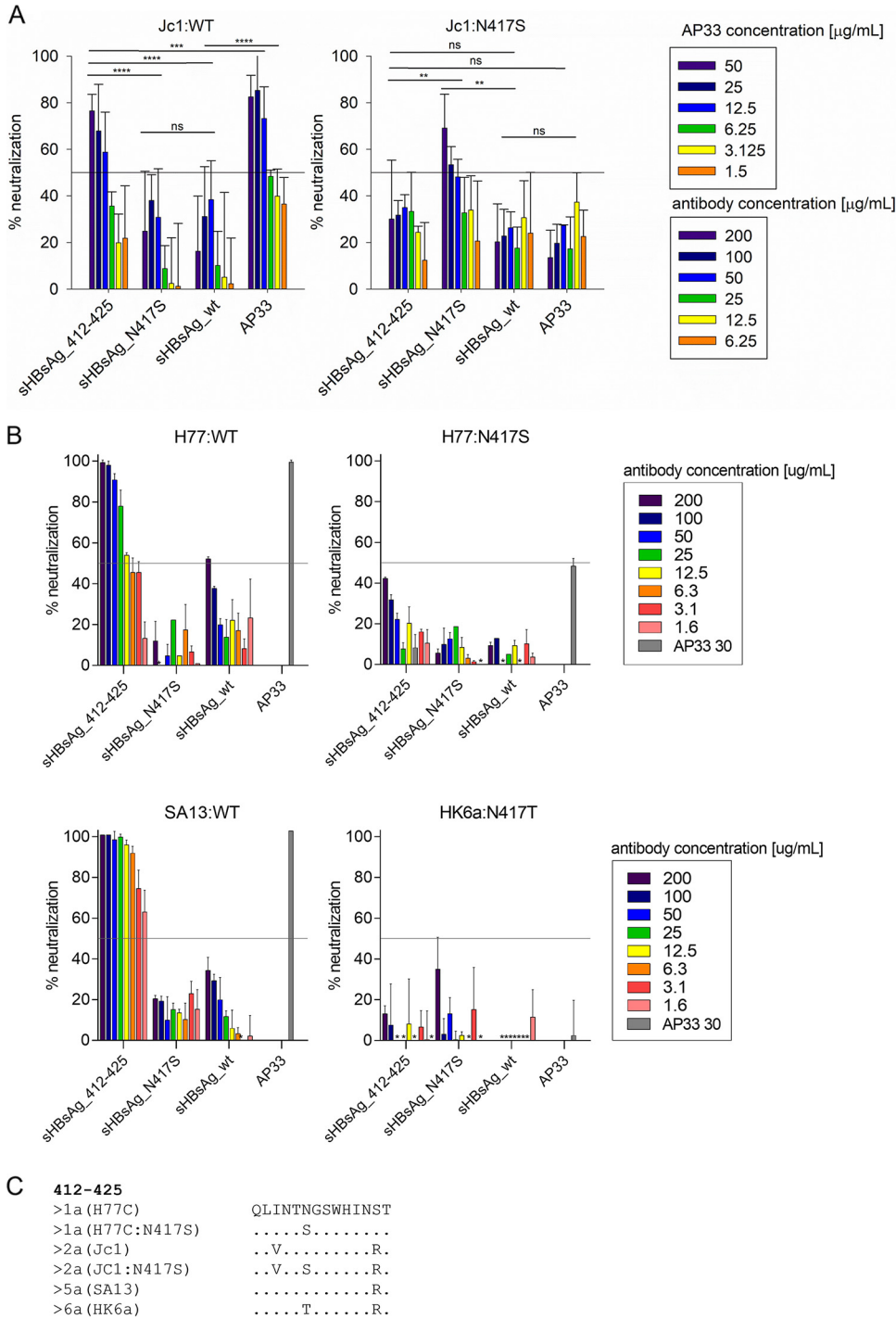


FIG 8 Chimeric VLP-induced antibodies neutralized HCVcc depending on the presence of the glycan shift change. Viruses were incubated with IgG purified from the sera of immunized mice and pooled for each experimental group. The neutralization effect (percent) was determined relative to cultures infected with the respective viruses in the absence of antibodies. (A) The antibodies were preincubated with wild-type HCV genotype 2a (Jc1:WT) or Jc1 with the N417S change (Jc1:N417S). The data represent the mean values from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. Data were analyzed using two-way ANOVA (ns, $P > 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$; ****, $P < 0.0001$). (B) The antibodies were preincubated with wild-type HCV genotype 1a (H77:WT), genotype 1a with the N417S change (H77:N417S), wild-type HCV genotype 5a (SA13:WT), or HCV genotype 6a with an N417T cell culture-adaptive change (HK6a:N417T). Each antibody concentration was evaluated in triplicate, and error bars indicate standard deviations. The solid horizontal line marks 50% virus neutralization. Neutralization values of $\leq 0\%$ are not shown (indicated by *). (C) Amino acid alignment showing the sequence conservation of the region spanning aa 412 to 425. The sequence derived from HCV genotype 1a isolate H77C (GenBank accession no. AF011751) is used as the reference. Other sequences are designated according to genotype (isolate). Amino acids conserved relative to the H77C sequence are marked with dots.

mammalian cells, which minimizes the possibility that AP33 binding is caused by changes in the *Leishmania tarentolae* glycosylation pattern.

After immunization with the AddaVax adjuvant, antibodies elicited by both sHBsAg_{412–425} and sHBsAg_{N417S} VLPs showed dramatic differences in sensitivity to the E1E2 conformation and N-glycosylation status. sHBsAg_{412–425} sera, like AP33, bound efficiently to E1E2 with the N1 glycosylation site at N417 (E1E2:WT) under both native and denatured/reduced conditions; however, they failed to recognize native E1E2:N417S. This binding could be partially restored by incubating sHBsAg_{412–425} sera or AP33 with denatured/reduced E1E2:N417S, and this effect was not altered by additional deglycosylation. These results suggested that the lack of binding of sHBsAg_{412–425} mouse sera to E1E2 with the N417S glycan shift change was due to neither the presence of the N-glycosylation site at N415 nor the amino acid change in epitope I but was most likely due to conformational hindrance.

Crystal structures of E2 revealed that the 412–423 epitope sequence shows high conformational flexibility, appearing disordered (32, 33), and may adopt several distinct conformations (34). Crystal structures of the 412–423 epitope peptide in complex with AP33 (35, 36) or HCV1 (37) indicated that epitope I folds as a short β -hairpin loop, and whereas the side chains of N417 and N423 point away from the antibody, N415 is buried in the antibody-binding groove (35–37). Therefore, the N-glycan shift from N417 to N415 would create untenable steric clashes with antibodies binding the β -hairpin conformation, abolishing antibody recognition. Considering the above-described results, it is possible that N417S causes a conformational change within the epitope I sequence, resulting in steric hindrance between antibodies and the glycan chain at position N415.

The other possibility is that the N417S change affects the global E1E2 conformation by limiting the accessibility of epitope I to AP33-like antibodies. In line with this hypothesis, previous studies have shown that amino acid changes within the 412–423 epitope or in the adjacent regions can result in global conformational changes in the HCV envelope heterodimer (38, 39). Similarly, global E1E2 conformation shifts were observed for HCVcc with selected N-glycans removed, resulting in neutralization sensitivity changes that could not simply be explained by the “glycan shield” model (40). Thus, N417S may induce a conformational change in native E1E2, which could lead to reduced epitope accessibility or recognition.

On the other hand, we showed that sHBsAg_{N417S} VLPs were capable of eliciting antibodies specifically recognizing E1E2 with the N417S change but not with the wild-type E2 sequence. mAb HC33.1, isolated from an HCV-infected blood donor, was previously developed and characterized (21, 27). HC33.1 can bind and neutralize E1E2 with a glycosylation site (N1) at N415 (i.e., E1E2:N417S) as well as with N1 at N417 albeit with lower sensitivity than E2 with the glycan shift change, suggesting that the N417/N415 glycosylation shift actually enhanced its binding (27). HC33.1 recognizes the 412–423 epitope in a semiextended β -sheet conformation, which allows N415 exposure to the solvent and, thus, does not hinder binding (30). In contrast, for sHBsAg_{N417S} sera, we observed binding to E1E2:N417S under both native and denatured/reduced conditions, but the sera showed no binding to native E1E2:WT. Additionally, unlike sHBsAg_{412–425} serum binding to E1E2:N417S, the binding of the sHBsAg_{N417S} sera to E1E2:WT could not be restored by E1E2 denaturation. However, weak sHBsAg_{N417S} serum binding to E1E2:WT was restored by PNGase F treatment, which cleaves N-glycan chains at asparagine residues. Furthermore, in alanine scanning, sHBsAg_{N417S} sera efficiently recognized only E1E2 with the introduced N417A change. This change effectively removes the E2 N1 glycosylation site. For HC33.1, we observed a previously reported binding pattern, with a crucial role of residues L413, G418, and W420 (21, 30, 31). These results show that antibodies elicited by sHBsAg_{N417S} VLPs have an E1E2 binding pattern different from that of HC33.1. The recognition of E1E2:WT treated with glycosidase and the E1E2:N417A alanine mutant by sHBsAg_{N417S} sera suggests that the binding of the antibodies elicited by the sHBsAg_{N417S} VLPs is at least partially restricted by the presence of the N-glycan at N417, which is not the case for HC33.1.

Our results suggest that immunization with sHBsAg_{412–425} VLPs elicits antibodies with an E1E2 binding pattern similar to that of AP33. The reactivity of the sera to E1E2 glycoproteins containing alanine changes across the 412–423 epitope showed that

L413, N415, G418, and W420 were crucial binding residues for antibodies elicited by sHBsAg_412–425 and AP33 (12, 31, 36). Moreover, in peptide competition ELISAs, we showed that the binding of both sHBsAg_412–425 sera and AP33 to E1E2 was inhibited by 412–425:WT and 412–425:N417S but not by the 412–425:W420R peptide.

The results from the neutralization assay further emphasized the differences in sHBsAg_412–425 and sHBsAg_N417S serum binding to E1E2. As reported previously, antibodies elicited by sHBsAg_412–425 showed limited neutralization of isolates derived from genotype 2a (16). However, at high concentrations, antibodies purified from sHBsAg_412–425 sera successfully neutralized Jc1:WT HCVcc. The efficient neutralization of H77:WT HCVcc and the neutralization-sensitive SA13:WT HCVcc was further observed. As described previously for AP33 (13, 15, 26, 36), sHBsAg_412–425 sera did not neutralize H77, Jc1, or HK6a HCVcc carrying a glycan shift change. Although sHBsAg_N417S sera showed robust binding to E1E2:N417S, the antibodies appeared to be nonneutralizing or weakly neutralizing, depending on the specific strain of the analyzed HCVcc. sHBsAg_N417S antibodies showed a neutralizing effect against Jc1:N417S at high concentrations but failed to neutralize other variants carrying an N417 glycan shift change, H77:N417S and HK6a:N417T HCVcc. Comparing epitope I sequences of H77:N417S, Jc1:N417S, and HK6a:N417T, there are minor differences. Thus, it is possible that determinants either within or outside epitope I might influence the global E1E2 or epitope I conformation and antibody accessibility, resulting in differences in susceptibility to neutralization by sHBsAg_N417S-induced antibodies among the strains of the analyzed HCVcc.

As native epitope I presented in the hydrophilic loop of the sHBsAg-based VLPs efficiently induced bnAbs and epitope I with the N417 change induced E1E2:N417S-binding antibodies, future studies should focus on enhancing the titer and breadth of neutralizing antibodies elicited by antigens carrying epitope I with an N417 glycan shift change. This could be achieved by structure-based design of future antigens focusing on the stabilization of epitope I in the favorable conformation, resulting in neutralizing antibodies binding both wild-type epitope I and epitope I with the N417S change.

In this study, we have shown that antibodies elicited by sHBsAg-based VLPs presenting two variants of the 412–425 epitope targeted two distinct glycan variants of the HCV E1E2 heterodimer. Additionally, we observed striking similarities in the E2 glycoprotein binding patterns and HCVcc neutralization between sHBsAg_412–425 sera and AP33, suggesting that mouse immunization with sHBsAg_412–425 VLPs can elicit favorable broadly neutralizing AP33-like antibodies. Along with sequence variability and protein conformational flexibility, glycan shifting has been proposed as a mechanism of virus immune evasion (41–45), and the structural flexibility of the 412–423 epitope has been suggested as an immune evasion strategy (17, 30, 35–37, 46, 47). Constant changes allow HCV to escape binding by neutralizing antibodies or even to impede the induction of antibodies targeting epitope I by reducing its antigenicity. Additionally, the N417/N415 glycan shift contributes to immune evasion by inhibiting antibodies with affinity for the 412–423 epitope presented in the wild-type, β -hairpin conformation (30). The conformational flexibility of E1E2 and epitope I suggests that future epitope I-based vaccine antigens should elicit antibodies targeting more than one conformation and glycosylation variant of the 412–423 epitope.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids. Figure 1 summarizes the construction of the chimeric genes for sHBsAg_N417S particle generation. The region of the HCV E2 glycoprotein spanning residues 412 to 425 (isolate H77C [GenBank accession no. [AF011751](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF011751)] [25]) with a single-point A1591G substitution resulting in the N417S change (numbering is according to isolate H77C) was inserted into HBV subtype adw2 sHBsAg (GenBank accession no. [AF397207.1](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF397207.1)). Insertions of the HCV E2 epitopes into the hydrophilic loop of the sHBsAg protein were performed at position P127/A128. The construction of the chimeric genes coding for the sHBsAg_412–425 and sHBsAg_wt constructs was previously described (24).

The constructs were obtained by gene synthesis using *L. tarentolae*-adapted codons (Thermo Scientific). Synthesized genes were ligated into the BglIII-NotI restriction sites in the pLEXSY_I-blecherry3 vector (Jena Bioscience).

For the expression of the HCV wild-type E1E2 glycoprotein in HEK293 cells for ELISAs, we used

plasmids coding for full-length E1E2 derived from HCV genotype 1a (H77C) (25). For E1E2 with the N417S change, we introduced a single-point A1591G substitution into the sequence, coding for full-length E1E2, using a site-directed mutagenesis kit (QuikChange Lightning; Agilent). Mutagenesis accuracy was confirmed by sequencing.

Plasmids encoding alanine substitution mutants of genotype 1a strain H77C E1E2 were previously described (18).

***Leishmania tarentolae* cultivation and protein expression.** The chimeric sHBsAg-based proteins were expressed using the inducible Lexy expression system according to the manufacturer's instructions (Jena Bioscience). Briefly, the plasmids were transfected into *L. tarentolae* cells by electroporation. The transfected cells were selected with bleomycin (100 μ g/mL) in suspension culture. Subsequently, recombinant cell lines were cultivated in 25-cm² tissue culture flasks filled with 10 mL of selective medium supplemented with hemin, protected from light at 26°C. T7 promoter-driven transcription was induced by the addition of tetracycline to a final concentration of 15 μ g/mL. The cells were grown in agitated culture for 72 h at 26°C, aiming for a final optical density at 600 nm of 4 to 5.

Cell lysis and ultracentrifugation. Fifty milliliters of the tetracycline-treated cell culture was centrifuged at 4°C at 8,000 rpm for 15 min. The cell pellet was immediately resuspended in 5 mL of ice-cold lysis buffer (PBS buffer, 0.6% [vol/vol] Tween 20). The cells were sonicated, and the suspension was clarified by centrifugation at 4°C at 8,000 rpm for 35 min. The supernatant was left for 16 to 24 h at room temperature (RT) to form particles. Subsequently, the lysate was layered onto an OptiPrep (Sigma-Aldrich) gradient formed in ultraclear tubes (2 mL of 30% [vol/vol] OptiPrep, 2 mL of 24% [vol/vol] OptiPrep, 1.5 mL of 18% [vol/vol] OptiPrep, 1.5 mL of 12% [vol/vol] OptiPrep, and 1.5 mL of 6% [vol/vol] OptiPrep in PBS) and ultracentrifuged at 27,000 rpm for 16 h at 4°C. Next, 500- μ L fractions were harvested and analyzed by Western blotting using anti-sHBsAg rabbit polyclonal antibodies (pAbs) (OriGene). The purity of the fractions was analyzed by SDS-PAGE with Coomassie R-250 staining. The fractions with the highest numbers of particles were pooled, and the protein concentration was measured by the Bradford assay (Bio-Rad). Finally, the OptiPrep solution was replaced with PBS using Amicon Ultra 100 kDa MWCO centrifugal units (Merck Millipore). These samples were used for further analysis and immunization.

SDS-PAGE and Western blot analysis. Analysis of the particle distribution after ultracentrifugation was carried out by SDS-PAGE using 4-to-12% gradient Bis-Tris gels in morpholineethanesulfonic acid (MES)-SDS running buffer. After electrophoresis, proteins were transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane by electroblotting, and subsequently, the membranes were blocked overnight at 4°C with 3% nonfat milk in TBST (Tris-buffered saline, 0.1% [vol/vol] Tween 20). After blocking, the membranes were incubated for 1 h at RT with anti-sHBsAg pAb (OriGene) or mAb AP33 diluted in 0.3% nonfat milk in TBST, washed with TBST, and then incubated with secondary horseradish peroxidase (HRP)-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The results were developed using substrate for enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific).

ELISAs with VLPs. To compare AP33 binding to sHBsAg_{412–425} and sHBsAg_{N417S} VLPs by ELISAs, 96-well high-binding plates were preincubated with partially purified sHBsAg_{412–425}, sHBsAg_{N41S}, and sHBsAg_{wt} VLPs. Each well was then blocked with 3% (wt/vol) bovine serum albumin (BSA) in PBST (PBS buffer, 0.05% [vol/vol] Tween 20) for 2 h at RT. Primary mouse AP33, HC33.1, and ALP98 antibodies and anti-sHBsAg pAb were diluted in PBST with 0.3% (wt/vol) BSA, and serial dilutions were added to the wells. After washing, primary antibodies were detected with secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology). The reaction with the tetramethylbenzidine (TMB) substrate was stopped with 0.5 M H₂SO₄, and the signal intensity at 450 nm was measured using a plate reader.

Electron microscopy. For visualization of the particles, the OptiPrep gradient fractions were diluted 1:5 in PBS and deposited onto carbon-coated 200-mesh nickel grids. Negative staining was performed using 2% uranyl acetate. After staining, the samples were analyzed using a transmission electron microscope (University of Gdańsk, Poland). For immunogold labeling, sHBsAg_{N417S} particles deposited onto the grids were fixed using 1% (vol/vol) glutaraldehyde. Next, the grids were layered on top of AP33 antibodies diluted 1:40 in incubation buffer (PBS buffer, 0.1% [vol/vol] BSA-c (Aurion)) and incubated at 4°C for 16 h. After incubation with primary antibodies, the grids were washed six times using incubation buffer for 5 min at RT. Labeling was performed with goat anti-mouse IgG conjugated with 6-nm gold particles (Aurion), diluted 1:80 in incubation buffer, and left for 2 h at RT. After washing, the grids were stained with uranyl acetate, dried, and analyzed using a transmission electron microscope (University of Gdańsk, Poland).

Immunization protocol. Groups of 6 female BALB/c mice, 6 to 8 weeks of age, were immunized subcutaneously with a squalene-based oil-in-water nanoemulsion adjuvant (AddaVax; InvivoGen). The mice were immunized with 15 μ g of protein on day 0 and 10 μ g on days 14 and 28. The mice used as negative controls were immunized with the PBS-adjuvant mixture alone. All experiments on animals were conducted by an accredited company (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk). The protocols were approved by the Local Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Science and Technology in Bydgoszcz (permit no. 38/2018). All procedures were performed under isoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

Analysis of the antibody response by an ELISA. Mouse sera were collected 2 weeks after the last immunization and pooled according to experimental groups. The antibody response against HCV E2 epitopes was measured by a direct solid-phase ELISA. Preblocked streptavidin-coated plates (Thermo Scientific) were incubated with biotinylated peptides at 5 μ g/mL (GenScript) for 16 h at 4°C. After coating and washing, serially diluted mouse sera were added to the wells and incubated for 1 h at RT. Goat anti-mouse secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used for detection. Similarly, the antibody response against sHBsAg protein was evaluated using ELISA plates coated with

Pichia pastoris-derived sHBsAg protein at 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (OriGene). The plates were then blocked for 2 h with 3% (wt/vol) BSA in PBST, and serially diluted mouse sera were added to the wells as described above.

To test serum reactivity to E1E2 complexes, HEK293 cells were transfected with plasmids expressing wild-type E1E2 glycoproteins (E1E2:WT) and E1E2 glycoproteins with the N417S change (E1E2:N417S). Additionally, for the evaluation of serum binding to E1E2 alanine-scanning mutants, plasmids encoding alanine substitution mutants of genotype 1a strain H77C E1E2 were used to transfect HEK293 cells. Seventy-two hours after transfection, the cells were washed with PBS buffer and lysed in lysis buffer (PBS buffer, 0.5% Triton X-100). The clarified cell lysates were normalized against each other using mouse ALP98 and later used to perform ELISAs under denatured/reduced and native conditions. For the denatured ELISA, the HEK293 cell lysates were first diluted 50-fold in PBS buffer containing 50 mM dithiothreitol (DTT) and 2% SDS and incubated for 10 min at 100°C; for the native ELISA, the HEK293 cell lysates were diluted 50-fold in PBS alone. Next, the cell lysates were transferred to ELISA plates precoated with *Galanthus nivalis* lectin (GNA) and incubated for 16 h at 4°C. Next, the plates were blocked in PBST with 3% BSA and either used immediately or stored at -20°C . The pooled mouse sera were diluted in PBST containing 0.3% BSA. Finally, the binding of the antibodies to the recombinant proteins was detected by goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies diluted to 1:2,500 (Santa Cruz Biotechnology) and the TMB substrate.

E1E2 PNGase F treatment. The E1E2 heterodimers with or without N417 expressed in HEK293 cells were divided into two equal groups: one for digestion with PNGase F and one for the undigested control. The digestions were conducted for 16 h under native conditions at 37°C in the buffer provided by the manufacturer (New England BioLabs). The digested samples and the controls were separated by SDS-PAGE as described above and analyzed by Western blotting using mouse sera (diluted 1:1,000), AP33 (diluted 1:2,500), and ALP98 (diluted 1:1,500). Goat anti-mouse secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used for detection. The results were developed using substrate for enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific).

Treatment of chimeric VLPs with PNGase F and endo Hf. The sHBsAg-based VLPs were divided into two equal groups: one for digestion with PNGase F or endo Hf and one for the undigested control. The digestions were conducted as described above. The digested samples and the controls were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using anti-sHBsAg pAb. Goat anti-rabbit secondary HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used for detection. The results were developed using substrate for enhanced chemiluminescence (Thermo Scientific).

Peptide competition ELISA. Peptides corresponding to wild-type epitope I (412–425:WT) or epitope I with the N417S (412–425:N417S) or the W420R (412–425:W420R) change, dissolved in PBS, were preincubated at concentrations of 10, 5, 1, 0.5, 0.1, 0.05 and 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with pooled mouse sera (1:500), AP33 (1:2,500), or APL98 (1:1,000) at RT for 1 h. The peptide-antibody mix was then tested for reactivity against GNA-captured E1E2:WT and E1E2:N417S by an ELISA, as described above.

IgG purification from mouse sera. IgGs were isolated from mouse sera using the NAb protein G spin kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 300 μL of pooled mouse serum was transferred into spin columns and incubated for 30 min at RT. Subsequently, purified IgGs were eluted from the resin with low-pH elution buffer and concentrated using Amicon Ultra 100K centrifugal units (Merck Millipore).

Virus stocks and neutralization assay for HCVcc genotype 2a. To generate the Jc1:N417 mutant, the A1590G substitution resulting in the N417S change was introduced into the Jc1 E2 sequence (48) using the QuikChange Lightning site-directed mutagenesis kit (Agilent) and PCR primers introducing the mutation (Genomed). The sequence of Jc1:N417S was confirmed by E2 DNA sequencing (Genomed). HCVcc stocks were produced in Huh7.5 cells in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin-streptomycin (P/S).

The antibody neutralization assay was performed using Huh7-J20 cells, and virus infectivity levels were determined by a secreted alkaline phosphatase (SEAP) reporter assay, as described previously (49, 50). Briefly, Huh7-J20 cells were plated at a density of 2×10^4 cells per well in a 96-well plate. In addition, ~ 250 focus-forming units (FFU) of virus were preincubated at 37°C for 1.5 h with serial dilutions of the tested antibodies prior to infection of cells. At 3h postinfection, the inoculum was replaced with fresh medium and incubated for 48 h. Infectivity was determined by measuring the SEAP activity released into the medium. Controls included noninfected cells and cells infected with the virus in the absence of the antibodies.

Virus stocks and neutralization assay for HCVcc genotypes 1a, 5a, and 6a. JFH1-based HCV recombinants with core-NS2 of the following genotypes (isolates) and the specified cell culture-adaptive changes were used: 1a (H77) with V787A and Q1247L (H77:WT) (51), 1a (H77) with the N417S change (H77:N417S) (39), 5a (SA13) with A1022G and K1119R (SA13:WT) (52), and 6a (HK6a) with F350S and N417T (HK6a:N417T) (53). HCVcc stocks were produced in Huh7.5 cells as described previously (53), and the envelope protein sequences were confirmed by Sanger sequencing. The cell-based *in vitro* HCV neutralization assay was performed as previously described (16, 52). Briefly, 7×10^3 Huh7.5 cells per well were plated into a 96-well plate (Nunc) the day prior to infection. Virus-antibody mixes were prepared in a preplate. A volume of the virus stock resulting in counts of 50 to 180 FFU/well in pilot assays was added in a total volume of 7 μL per well and mixed with 3 μL of serially diluted purified IgG; for assays with H77:WT and H77:N417S, these volumes were 14 μL and 6 μL , respectively. For virus-only wells, medium was added instead of diluted purified IgG. The virus-antibody mixes were incubated for 1.5 h at 37°C with 5% CO_2 . After incubation, medium was added to a total volume of 40 μL per well. The total volume was transferred to the cell plate and incubated at 37°C with 5% CO_2 for 4.5 h. Subsequently, the cells were washed with PBS, and fresh medium was added. Antibody dilutions were tested in triplicate. In each assay, at least six negative-control wells without virus and antibody and six virus-only wells were included. Cells were fixed with methanol after 48 h of incubation. After 10 min of incubation with 3% H_2O_2 , the plate was incubated for 1 h with BSK (PBS containing 0.5% [wt/vol] BSA and 0.1% [wt/vol]

skimmed milk). The plate was immunohistochemically stained with the primary antibody 9E10 (54) diluted 1:5,000 (in BSK) and ECL anti-mouse IgG HRP-linked whole secondary antibody (GE Healthcare-Amersham) diluted 1:500 (in BSK), both with incubation overnight at 4°C. FFU were visualized with a Bright-DAB solution kit (Immunologic) and counted automatically with an ImmunoSpot series 5 UV analyzer (CTL Europe GmbH) with customized software as previously described (55). The number of FFU in each well was related to the mean number of FFU in virus-only wells to calculate the percentage of neutralization.

Data availability. All relevant data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Steven Fong (Stanford University) for the kind gift of mAb HC33.1 and Ralf Bartenschlager (Heidelberg University) for the Jc1 construct. We are also grateful to Grażyna Peszyńska-Sularz, Monika Dmochowska, and Beata Muszyńska (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdańsk) for animal care and Magdalena Narajczyk and Dorota Łuszczek (University of Gdańsk) for assistance in the electron microscopy analysis.

We declare no competing interests.

Conceptualization, Anna Czarnota and Katarzyna Grzyb; methodology, Anna Czarnota, Anna Offersgaard, Ania Owsianka, and Garazi Peña Alzua; validation, Judith Margarete Gottwein, Arvind H. Patel, and Katarzyna Grzyb; formal analysis, Anna Czarnota, Ania Owsianka, Judith Margarete Gottwein, Arvind H. Patel, and Katarzyna Grzyb; investigation, Anna Czarnota, Anna Offersgaard, Ania Owsianka, and Garazi Peña Alzua; resources, Judith Margarete Gottwein, Jens Bukh, Arvind H. Patel, and Krystyna Bienkowska-Szewczyk; data curation, Anna Czarnota, Anna Offersgaard, and Judith Margarete Gottwein; writing—original draft preparation, Anna Czarnota and Katarzyna Grzyb; writing—review and editing, Anna Czarnota, Anna Offersgaard, Ania Owsianka, Jens Bukh, Judith Margarete Gottwein, Arvind H. Patel, Krystyna Bienkowska-Szewczyk, and Katarzyna Grzyb; supervision, Judith Margarete Gottwein and Katarzyna Grzyb; project administration, Anna Czarnota, Judith Margarete Gottwein, Arvind H. Patel, and Katarzyna Grzyb; funding acquisition, Anna Czarnota, Anna Offersgaard, Judith Margarete Gottwein, Arvind H. Patel, and Katarzyna Grzyb. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

This research was funded National Science Centre, Poland, grant no. UMO-2017/27/B/NZ6/01403 (Katarzyna Grzyb); the University of Gdańsk LiSMIDOS research project (Anna Czarnota); Ph.D. stipends and bonuses from the Candys Foundation and the University of Copenhagen (Anna Offersgaard); the Independent Research Fund Denmark (DFF)—Medical Sciences (Judith Margarete Gottwein); the Innovation Fund Denmark (Judith Margarete Gottwein); the Hvidovre Hospital Research Foundation (Judith Margarete Gottwein); the Læge Sofus Carl Emil Friis og Hustru Olga Doris Friis Foundation (Judith Margarete Gottwein); and the Toyota Foundation (Anna Offersgaard and Judith Margarete Gottwein). Ania Owsianka and Arvind H. Patel were supported by UK Medical Research Council grant MC_UU12014/2.

REFERENCES

1. World Health Organization. 2021. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240027077>. Retrieved 15 March 2022.
2. Spengler U. 2018. Direct antiviral agents (DAAs)—a new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol Ther* 183:118–126. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.10.009>.
3. Pawlotsky J-M. 2019. Retreatment of hepatitis C virus-infected patients with direct-acting antiviral failures. *Semin Liver Dis* 39:354–368. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1687823>.
4. Sarrazin C. 2016. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol* 64:486–504. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.09.011>.
5. Duncan JD, Urbanowicz RA, Tarr AW, Ball JK. 2020. Hepatitis C virus vaccine: challenges and prospects. *Vaccines (Basel)* 8:90. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010090>.
6. Bartenschlager R, Baumert TF, Bukh J, Houghton M, Lemon SM, Lindenbach BD, Lohmann V, Moradpour D, Pietschmann T, Rice CM, Thimme R, Wakita T. 2018. Critical challenges and emerging opportunities in hepatitis C virus research in an era of potent antiviral therapy: considerations for scientists

- and funding agencies. *Virus Res* 248:53–62. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2018.02.016>.
7. Kong L, Jackson KN, Wilson IA, Law M. 2015. Capitalizing on knowledge of hepatitis C virus neutralizing epitopes for rational vaccine design. *Curr Opin Virol* 11:148–157. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.04.001>.
 8. Prentoe J, Bukh J. 2018. Hypervariable region 1 in envelope protein 2 of hepatitis C virus: a linchpin in neutralizing antibody evasion and viral entry. *Front Immunol* 9:2146. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02146>.
 9. Prentoe J, Velázquez-Moctezuma R, Fong SKH, Law M, Bukh J. 2016. Hypervariable region 1 shielding of hepatitis C virus is a main contributor to genotypic differences in neutralization sensitivity. *Hepatology* 64:1881–1892. <https://doi.org/10.1002/hep.28705>.
 10. Aleman F, Tzarum N, Kong L, Nagy K, Zhu J, Wilson IA, Law M. 2018. Immunogenetic and structural analysis of a class of HCV broadly neutralizing antibodies and their precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:7569–7574. <https://doi.org/10.1073/pnas.1802378115>.
 11. Pierce BG, Keck Z-Y, Lau P, Fauvel C, Gowthaman R, Baumert TF, Fuerst TR, Mariuzza RA, Fong SKH. 2016. Global mapping of antibody recognition of the hepatitis C virus E2 glycoprotein: implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:E6946–E6954. <https://doi.org/10.1073/pnas.1614942113>.
 12. Owsianka A, Clayton RF, Loomis-Price LD, McKeating JA, Patel AH. 2001. Functional analysis of hepatitis C virus E2 glycoproteins and virus-like particles reveals structural dissimilarities between different forms of E2. *J Gen Virol* 82:1877–1883. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-1877>.
 13. Owsianka AM, Timms JM, Tarr AW, Brown RJP, Hickling TP, Szejewski A, Bienkowska-Szewczyk K, Thomson BJ, Patel AH, Ball JK. 2006. Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 80:8695–8704. <https://doi.org/10.1128/JVI.00271-06>.
 14. Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, Lavillette D, Bartosch B, Cosset F-L, Ball JK, Patel AH. 2005. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol* 79:11095–11104. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.17.11095-11104.2005>.
 15. Tarr AW, Owsianka AM, Jayaraj D, Brown RJP, Hickling TP, Irving WL, Patel AH, Ball JK. 2007. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J Gen Virol* 88:2991–3001. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83065-0>.
 16. Czarnota A, Offergaard A, Pihl AF, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM, Bienkowska-Szewczyk K, Grzyb K. 2020. Specific antibodies induced by immunization with hepatitis B virus-like particles carrying hepatitis C virus envelope glycoprotein 2 epitopes show differential neutralization efficiency. *Vaccines (Basel)* 8:294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>.
 17. Pantua H, Diao J, Ullsch M, Hazen M, Mathieu M, McCutcheon K, Takeda K, Date S, Cheung TK, Phung Q, Hass P, Arnott D, Hongo J-A, Matthews DJ, Brown A, Patel AH, Kelley RF, Eigenbrot C, Kapadia SB. 2013. Glycan shifting on hepatitis C virus (HCV) E2 glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. *J Mol Biol* 425:1899–1914. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.02.025>.
 18. Tarr AW, Owsianka AM, Timms JM, McClure CP, Brown RJP, Hickling TP, Pietschmann T, Bartenschlager R, Patel AH, Ball JK. 2006. Characterization of the hepatitis C virus E2 epitope defined by the broadly neutralizing monoclonal antibody AP33. *Hepatology* 43:592–601. <https://doi.org/10.1002/hep.21088>.
 19. Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, Higginbottom A, Levy S, McKeating JA. 1999. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 73:6235–6244. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.8.6235-6244.1999>.
 20. Broering TJ, Garrity KA, Boatright NK, Sloan SE, Sandor F, Thomas WD, Szabo G, Finberg RW, Ambrosino DM, Babcock GJ. 2009. Identification and characterization of broadly neutralizing human monoclonal antibodies directed against the E2 envelope glycoprotein of hepatitis C virus. *J Virol* 83:12473–12482. <https://doi.org/10.1128/JVI.01138-09>.
 21. Keck Z, Wang W, Wang Y, Lau P, Carlsen THR, Prentoe J, Xia J, Patel AH, Bukh J, Fong SKH. 2013. Cooperativity in virus neutralization by human monoclonal antibodies to two adjacent regions located at the amino terminus of hepatitis C virus E2 glycoprotein. *J Virol* 87:37–51. <https://doi.org/10.1128/JVI.01941-12>.
 22. Chung RT, Gordon FD, Curry MP, Schiano TD, Emre S, Corey K, Markmann JF, Hertl M, Pomposelli JJ, Pomfret EA, Florman S, Schilsky M, Broering TJ, Finberg RW, Szabo G, Zamore PD, Khettry U, Babcock GJ, Ambrosino DM, Leav B, Leney M, Smith HL, Molrine DC. 2013. Human monoclonal antibody MBL-HCV1 delays HCV viral rebound following liver transplantation: a randomized controlled study. *Am J Transplant* 13:1047–1054. <https://doi.org/10.1111/ajt.12083>.
 23. Morin TJ, Broering TJ, Leav BA, Blair BM, Rowley KJ, Boucher EN, Wang Y, Cheslock PS, Knauber M, Olsen DB, Ludmerer SW, Szabo G, Finberg RW, Purcell RH, Lanford RE, Ambrosino DM, Molrine DC, Babcock GJ. 2012. Human monoclonal antibody HCV1 effectively prevents and treats HCV infection in chimpanzees. *PLoS Pathog* 8:e1002895. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002895>.
 24. Czarnota A, Tyborowska J, Peszyńska-Sularz G, Gromadzka B, Bienkowska-Szewczyk K, Grzyb K. 2016. Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* 15:62. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>.
 25. Yanagi M, Purcell RH, Emerson SU, Bukh J. 1997. Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:8738–8743. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.16.8738>.
 26. Dhillon S, Witteveldt J, Gatherer D, Owsianka AM, Zeisel MB, Zahid MN, Rychłowska M, Fong SKH, Baumert TF, Angus AGN, Patel AH. 2010. Mutations within a conserved region of the hepatitis C virus E2 glycoprotein that influence virus-receptor interactions and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol* 84:5494–5507. <https://doi.org/10.1128/JVI.02153-09>.
 27. Keck Z, Angus AGN, Wang W, Lau P, Wang Y, Gatherer D, Patel AH, Fong SKH. 2014. Non-random escape pathways from a broadly neutralizing human monoclonal antibody map to a highly conserved region on the hepatitis C virus E2 glycoprotein encompassing amino acids 412–423. *PLoS Pathog* 10:e1004297. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004297>.
 28. Cowton VM, Angus AGN, Cole SJ, Markopoulou CK, Owsianka A, Dunlop JI, Gardner DE, Krey T, Patel AH. 2016. Role of conserved E2 residue W420 in receptor binding and hepatitis C virus infection. *J Virol* 90:7456–7468. <https://doi.org/10.1128/JVI.00685-16>.
 29. Clayton RF, Owsianka A, Aitken J, Graham S, Shella D, Patel AH. 2002. Analysis of antigenicity and topology of E2 glycoprotein present on recombinant hepatitis C virus-like particles. *J Virol* 76:7672–7682. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.15.7672-7682.2002>.
 30. Li Y, Pierce BG, Wang Q, Keck Z-Y, Fuerst TR, Fong SKH, Mariuzza RA. 2015. Structural basis for penetration of the glycan shield of hepatitis C virus E2 glycoprotein by a broadly neutralizing human antibody. *J Biol Chem* 290:10117–10125. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.643528>.
 31. Cowton VM, Singer JB, Gifford RJ, Patel AH. 2018. Predicting the effectiveness of hepatitis C virus neutralizing antibodies by bioinformatic analysis of conserved epitope residues using public sequence data. *Front Immunol* 9:1470. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01470>.
 32. Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M. 2013. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science* 342:1090–1094. <https://doi.org/10.1126/science.1243876>.
 33. Kumar A, Hossain RA, Yost SA, Bu W, Wang Y, Dearborn AD, Grakoui A, Cohen JI, Marcotrigiano J. 2021. Structural insights into hepatitis C virus receptor binding and entry. *Nature* 598:521–525. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03913-5>.
 34. Flyak AI, Ruiz S, Colbert M, Luong T, Crowe JE, Bailey JR, Bjorkman PJ. 2018. Broadly neutralizing antibodies against HCV use a CDRH3 disulfide motif to recognize an E2 glycoprotein site that can be targeted for vaccine design. *Cell Host Microbe* 24:703–716.e3. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.10.009>.
 35. Kong L, Giang E, Nieuwsma T, Robbins JB, Deller MC, Stanfield RL, Wilson IA, Law M. 2012. Structure of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 antigenic site 412 to 423 in complex with antibody AP33. *J Virol* 86:13085–13088. <https://doi.org/10.1128/JVI.01939-12>.
 36. Potter JA, Owsianka AM, Jeffery N, Matthews DJ, Keck Z-Y, Lau P, Fong SKH, Taylor GL, Patel AH. 2012. Toward a hepatitis C virus vaccine: the structural basis of hepatitis C virus neutralization by AP33, a broadly neutralizing antibody. *J Virol* 86:12923–12932. <https://doi.org/10.1128/JVI.02052-12>.
 37. Kong L, Giang E, Robbins JB, Stanfield RL, Burton DR, Wilson IA, Law M. 2012. Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:9499–9504. <https://doi.org/10.1073/pnas.1202924109>.
 38. Augestad EH, Castelli M, Clementi N, Ströh LJ, Krey T, Burioni R, Mancini N, Bukh J, Prentoe J. 2020. Global and local envelope protein dynamics of hepatitis C virus determine broad antibody sensitivity. *Sci Adv* 6:eabb5938. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5938>.

39. Alzua GP, Pihl AF, Offersgaard A, Velázquez-Moctezuma R, Duarte Hernandez CR, Augestad EH, Fahnøe U, Mathiesen CK, Krarup H, Law M, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM. 3 September 2022. Identification of novel neutralizing determinants for protection against hepatitis C virus. *Hepatology*.
40. Prentoe J, Velázquez-Moctezuma R, Augestad EH, Galli A, Wang R, Law M, Alter H, Bukh J. 2019. Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:10039–10047. <https://doi.org/10.1073/pnas.1822002116>.
41. Moore PL, Gray ES, Wibmer CK, Bhiman JN, Nonyane M, Sheward DJ, Hermanus T, Bajimaya S, Tumba NL, Abrahams M-R, Lambson BE, Ranchohe N, Ping L, Ngandu N, Abdool Karim Q, Abdool Karim SS, Swanstrom RI, Seaman MS, Williamson C, Morris L. 2012. Evolution of an HIV glycan-dependent broadly neutralizing antibody epitope through immune escape. *Nat Med* 18:1688–1692. <https://doi.org/10.1038/nm.2985>.
42. Charles TP, Burton SL, Arunachalam PS, Cottrell CA, Sewall LM, Bollimpelli VS, Gangadhara S, Dey AK, Ward AB, Shaw GM, Hunter E, Amara RR, Pulendran B, van Gils MJ, Derdeyn CA. 2021. The C3/465 glycan hole cluster in BG505 HIV-1 envelope is the major neutralizing target involved in preventing mucosal SHIV infection. *PLoS Pathog* 17:e1009257. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009257>.
43. Kim JJ, Lee I, Park S, Hwang M-W, Bae J-Y, Lee S, Heo J, Park MS, García-Sastre A, Park M-S. 2013. Genetic requirement for hemagglutinin glycosylation and its implications for influenza A H1N1 virus evolution. *J Virol* 87:7539–7549. <https://doi.org/10.1128/JVI.00373-13>.
44. Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, Hjorth CK, Dommer AC, Harbison AM, Fogarty CA, Barros EP, Taylor BC, McLellan JS, Fadda E, Amaro RE. 2020. Beyond shielding: the roles of glycans in the SARS-CoV-2 spike protein. *ACS Cent Sci* 6:1722–1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>.
45. Wagh K, Kreider EF, Li Y, Barbian HJ, Learn GH, Giorgi E, Hrabec PT, Decker TG, Smith AG, Gondim MV, Gillis L, Wandzilak J, Chuang G-Y, Rawi R, Cai F, Pellegrino P, Williams I, Overbaugh J, Gao F, Kwong PD, Haynes BF, Shaw GM, Borrow P, Seaman MS, Hahn BH, Korber B. 2018. Completeness of HIV-1 envelope glycan shield at transmission determines neutralization breadth. *Cell Rep* 25:893–908.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.09.087>.
46. Ströh LJ, Nagarathinam K, Krey T. 2018. Conformational flexibility in the CD81-binding site of the hepatitis C virus glycoprotein E2. *Front Immunol* 9:1396. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01396>.
47. Meola A, Tarr AW, England P, Meredith LW, McClure CP, Fong SKH, McKeating JA, Ball JK, Rey FA, Krey T. 2015. Structural flexibility of a conserved antigenic region in hepatitis C virus glycoprotein E2 recognized by broadly neutralizing antibodies. *J Virol* 89:2170–2181. <https://doi.org/10.1128/JVI.02190-14>.
48. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shavinskaya A, Kallis S, Steinmann E, Abid K, Negro F, Dreux M, Cosset F-L, Bartenschlager R. 2006. Construction and characterization of infectious intragenotypic and intergenotypic hepatitis C virus chimeras. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:7408–7413. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504877103>.
49. Iro M, Witteveldt J, Angus AGN, Woerz I, Kaul A, Bartenschlager R, Patel AH. 2009. A reporter cell line for rapid and sensitive evaluation of hepatitis C virus infectivity and replication. *Antiviral Res* 83:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.04.007>.
50. Krapchev VB, Rychłowska M, Chmielewska A, Zimmer K, Patel AH, Bienkowska-Szewczyk K. 2018. Recombinant Flag-tagged E1E2 glycoproteins from three hepatitis C virus genotypes are biologically functional and elicit cross-reactive neutralizing antibodies in mice. *Virology* 519:33–41. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.026>.
51. Scheel TKH, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, Eugen-Olsen J, Bukh J. 2008. Development of JFH1-based cell culture systems for hepatitis C virus genotype 4a and evidence for cross-genotype neutralization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:997–1002. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711044105>.
52. Jensen TB, Gottwein JM, Scheel TKH, Hoegh AM, Eugen-Olsen J, Bukh J. 2008. Highly efficient JFH1-based cell-culture system for hepatitis C virus genotype 5a: failure of homologous neutralizing-antibody treatment to control infection. *J Infect Dis* 198:1756–1765. <https://doi.org/10.1086/593021>.
53. Gottwein JM, Scheel TKH, Jensen TB, Lademann JB, Prentoe JC, Knudsen ML, Hoegh AM, Bukh J. 2009. Development and characterization of hepatitis C virus genotype 1-7 cell culture systems: role of CD81 and scavenger receptor class B type I and effect of antiviral drugs. *Hepatology* 49:364–377. <https://doi.org/10.1002/hep.22673>.
54. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Sci* 309:623–626. <https://doi.org/10.1126/science.1114016>.
55. Gottwein JM, Scheel TKH, Callendret B, Li Y-P, Eccleston HB, Engle RE, Govindarajan S, Satterfield W, Purcell RH, Walker CM, Bukh J. 2010. Novel infectious cDNA clones of hepatitis C virus genotype 3a (strain S52) and 4a (strain ED43): genetic analyses and in vivo pathogenesis studies. *J Virol* 84:5277–5293. <https://doi.org/10.1128/JVI.02667-09>.

Supplementary figures:

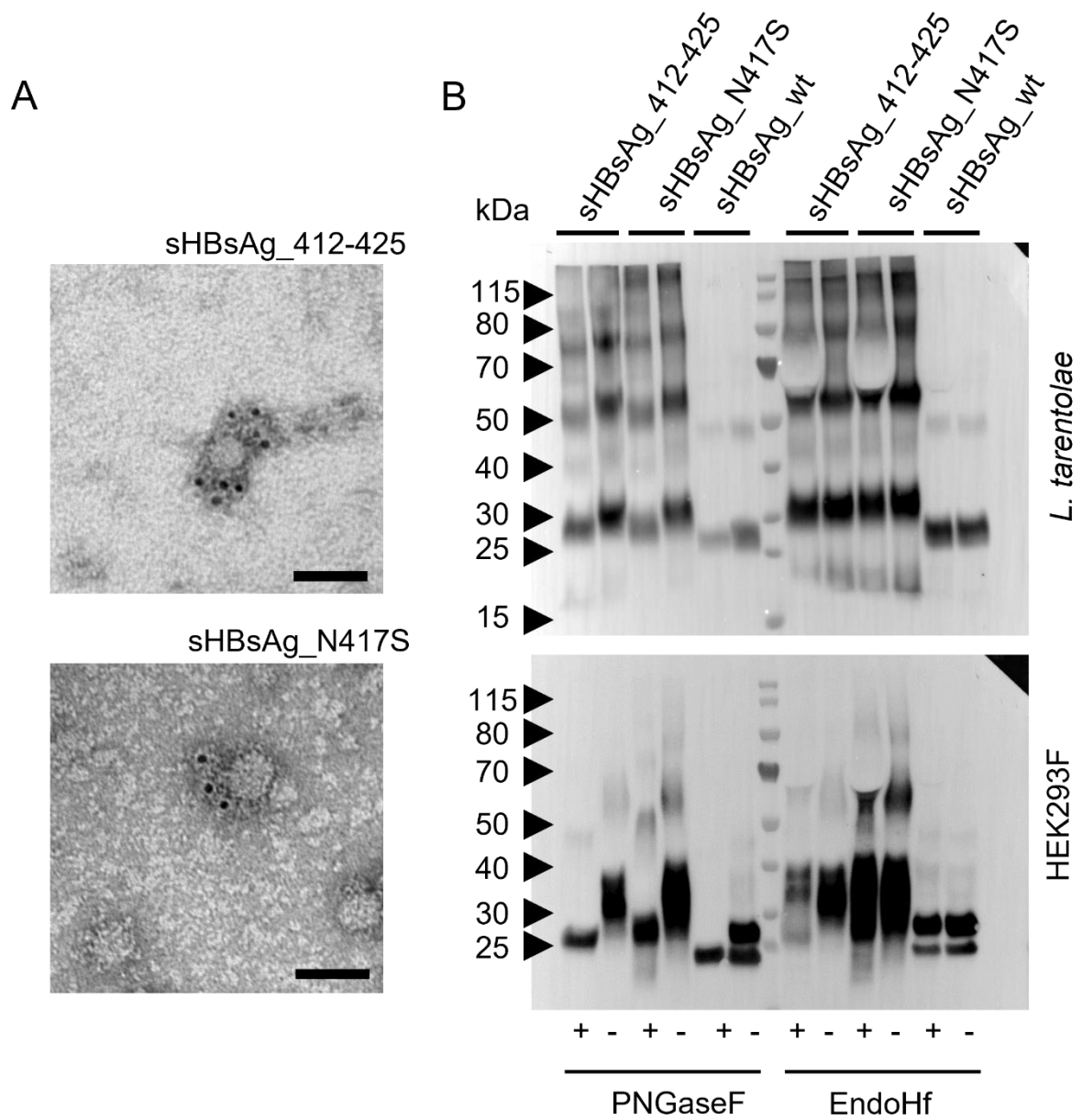


Fig. S1 (A) Immunogold labeling of the sHBsAg_412-425 and sHBsAg_N417S VLPs expressed in HEK293F cells with AP33. Secondary goat anti-mouse was conjugated with 6 nm gold particles. Scale bar: 50 nm. (B) Western blot analysis of the *L. tarentolae* and HEK293F-derived VLPs, treated with PNGaseF and EndoHf. pAb anti-sHBsAg were used for detection. On the left protein ladder, the molecular weight in kDa is given.

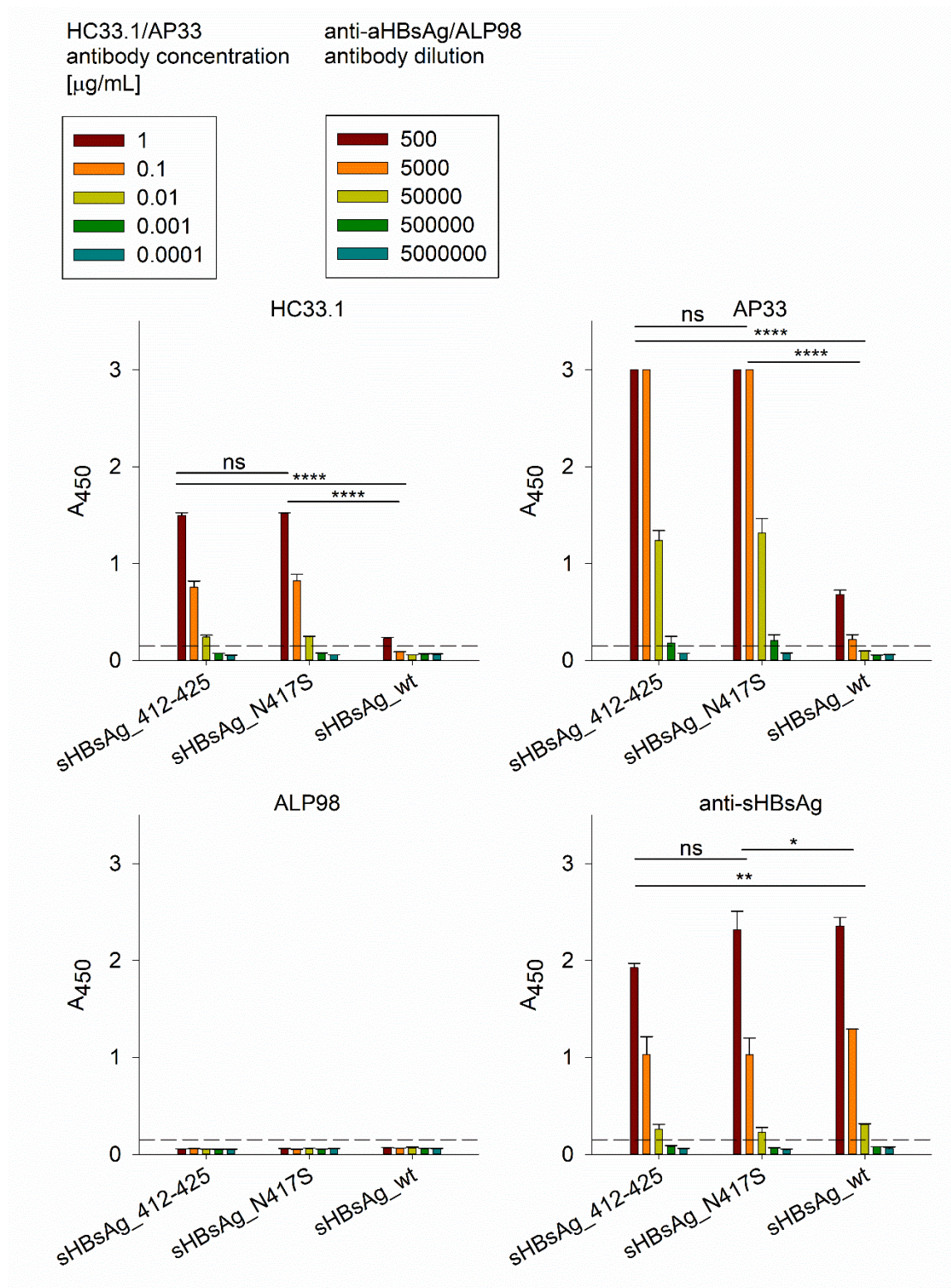


Fig. S2. Recognition of VLPs by a panel of antibodies. ELISA plates were coated with partially purified sHBsAg_412-425, sHBsAg_N417S and sHBsAg_wt VLPs as depicted on axis x. VLPs were probed with serial dilutions of epitope I specific AP33/HC33.1 and pAb anti-sHBsAg. mAb ALP98 was used as a negative control. Data was analyzed using two-way ANOVA (ns P

>0.05, *P<0.05, **P <0.01, ****P <0.0001). The mean A_{450} values are shown on axis y. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations.

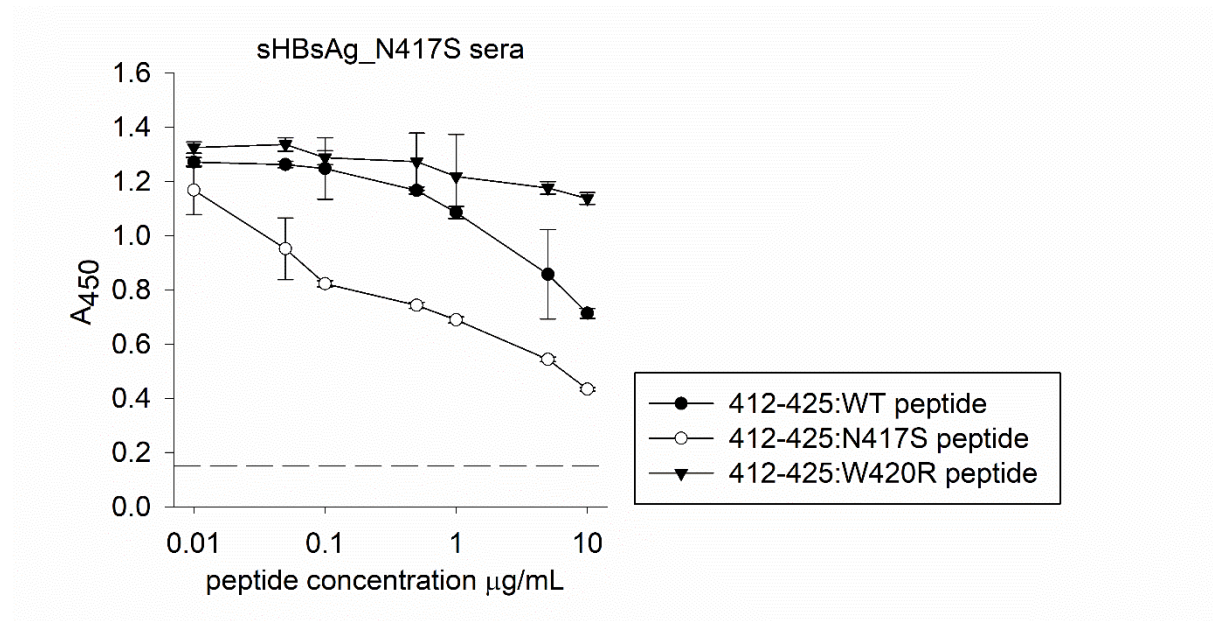


Fig. S3. sHBsAg_N417S sera binding to the E1E2:N417S complex in peptide competition ELISA. The sera sHBsAg_N417S sera was preincubated with serial dilutions of peptide E2 epitopes 412-425:WT, 412-425:N417S and 412-425:W420R. The sera/peptide mix was then tested for reactivity against E1E2:N417S in a GNA capture ELISA. The peptide concentration is shown on axis x. The mean A_{450} values are shown on axis y. The data represent the results from two independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations. The dashed horizontal line represents the cutoff value (three times the mean background value).

11. Załącznik 2.

Oświadczenia współautorów publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską.

Place/date. 31.01.2023r.
GDAŃSK


Anna Czarnota
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* **15**, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study design
- Experiments: *L. tarentolae* stable lines, VLPs purification, VLPs characterization, EM samples preparation, immunogen preparation, ELISpot, sera analysis (ELISA, E1E2 binding).
- Data analysis and interpretation
- Original draft preparation


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date. 31.01.2023r.
G. PANIK


Anna Czarnota
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*. 2020; 8(2):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study conceptualization
- Study methodology
- Formal analysis
- Investigation: DNA sequences design, cloning, stable lines in *L. tarentolae*, VLPs characterization and purification, EM samples preparation, preparation of samples for mouse immunization, sera analysis (peptide ELISA, ELISA with yHBsAg, sera binding to the panel of E1E2 glycoproteins).
- Data curation
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Project administration
- Funding acquisition


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... 31.01.2023r.
GDANSK


Anna Czarnota
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Microbiology Spectrum – Accepted Manuscript <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study conceptualization
- Study methodology
- Formal analysis
- Investigation: DNA sequences design, cloning, stable lines in *L. tarentolae*, VLPs production in HEK293 FreeStyle cell line, VLPs characterization and purification, EM samples preparation, immunogoldstaining, preparation of samples for mouse immunization, sera analysis (peptide ELISA, ELISA with yHBsAg, E1E2 ELISA, alanine scanning, competitive ELISA, gt2a HCVcc neutralization).
- Data curation
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Project administration
- Funding acquisition


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... 31. 01. 2023r.
GDANSK


Dr Katarzyna Grzyb
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* **15**, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study conceptualization
- Experiments: *L. tarentolae* stable lines, ELISpot
- Data analysis and interpretation
- Original draft preparation
- Funding acquisition
- Research supervision


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date..... 31.01.2023r.
GDAŃSK


Dr Katarzyna Grzyb
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*. 2020; 8(2):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study conceptualization
- Validation
- Formal analysis
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Research supervision
- Project administration
- Funding acquisition


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date. 31.01.2023 r.
GDAŃSK

Dr Katarzyna Grzyb
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Microbiology Spectrum – Accepted Manuscript <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study conceptualization
- Validation
- Formal analysis
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Research supervision
- Project administration
- Funding acquisition

K. Grzyb
.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... 31. 01. 2023 r.
GDAŃSK


Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* **15**, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Manuscript review and editing


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date. 31.01.2023r.
GDAŃSK


Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*. 2020; 8(2):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study resources
- Manuscript review and editing


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... 31.01.2023 r.
GDAŃSK


Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk
Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Microbiology Spectrum – Accepted Manuscript <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study resources
- Manuscript review and editing


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... 27.01.2023

Copenhagen,
Hvidovre, DK


Dr. Anna Offersgaard
Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP),
Department of Infectious Diseases,
Copenhagen University Hospital
Department of Immunology and Microbiology,
Faculty of Health and Medical Sciences,
University of Copenhagen

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*. 2020; 8(2):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study methodology
- Formal analysis
- Investigation: HCVcc neutralization
- Data curation
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Acquisition of funding


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date 27.01.2023

Copenhagen,
Hvidovre, DK

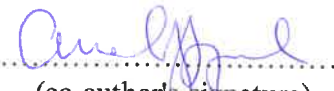
Dr. Anna Offersgaard
Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP),
Department of Infectious Diseases,
Copenhagen University Hospital
Department of Immunology and Microbiology,
Faculty of Health and Medical Sciences,
University of Copenhagen

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Microbiology Spectrum – Accepted Manuscript <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Study methodology
- Investigation: HCVcc neutralization
- Data curation
- Manuscript review and editing
- Funding acquisition


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date Hvidovre,

Copenhagen

26.01.2023

Prof. Judith Margarete Gottwein
Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP),
Department of Infectious Diseases,
Copenhagen University Hospital
Department of Immunology and Microbiology,
Faculty of Health and Medical Sciences,
University of Copenhagen

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. Microbiology Spectrum – Accepted Manuscript <https://doi.org/10.1128/spectrum.02546-22>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Validation
- Formal analysis
- Study resources
- Data curation
- Research supervision
- Manuscript review and editing
- Project administration
- Funding acquisition


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date.....

Hvidovre,
Copenhagen,

26.01.2023

Prof. Judith Margarete Gottwein
Copenhagen Hepatitis C Program (CO-HEP),
Department of Infectious Diseases,
Copenhagen University Hospital
Department of Immunology and Microbiology,
Faculty of Health and Medical Sciences,
University of Copenhagen
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Specific Antibodies Induced by Immunization with Hepatitis B Virus-Like Particles Carrying Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein 2 Epitopes Show Differential Neutralization Efficiency. *Vaccines*. 2020; 8(2):294. <https://doi.org/10.3390/vaccines8020294>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Validation
- Formal analysis
- Study resources
- Data curation
- Research supervision
- Original draft preparation
- Manuscript review and editing
- Project administration
- Funding acquisition

.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date... GDAŃSK 25.01.23r.

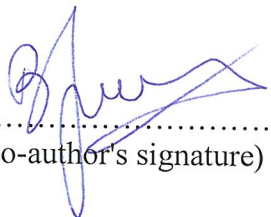
Beata Gromadzka
Zakład Szczepionek Rekombinowanych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Gdański
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* **15**, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Experiments: VLPs purification


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript

Place/date 27.01.2020

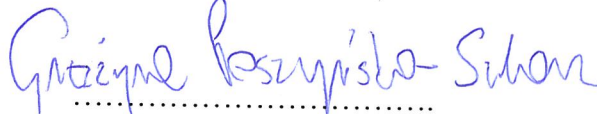
Grażyna Peszyńska-Sularz
Trójmiejska Akademicka Zwierzętarnia Doświadczalna
Gdański Uniwersytet Medyczny
(title, name and surname, affiliation)

Co-authorship statement

As a co-author of the publication*: Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb Cell Fact* **15**, 62 (2016). <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0460-4>

I declare that my own substantial contribution to this publication consists of**:

- Experiments: mouse vaccination


.....
(co-author's signature)

* provide title, journal, volume, year, pages

**e.g. development a research idea, creation of research hypothesis, development a research concept, making specific experiments and/or measurements (it's best to indicate which ones), interpretation of results, preparation of manuscript