



Ewa Szolajska

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Anny Czarnoty zatytułowanej „Chimeryczne, wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV jako potencjalna szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C”**

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed pod naukowym kierunkiem Pań prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk i dr Katarzyny Grzyb.

Projekt doktorski Pani Anny Czarnoty dotyczył opracowania szczepionki zapobiegającej zakażeniu wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), stanowiącemu jedno z największych zagrożeń epidemiologicznych w skali globalnej. Większość zakażeń HCV przechodzi w fazę chroniczną, która często ze względu na brak specyficznych objawów nie jest diagnozowana i może prowadzić do marskości wątroby oraz rozwoju raka wątrobowo-komórkowego (HCC, hepatocellular carcinoma). Intensywna praca wielu ośrodków naukowych i firm

Mimo, że upłynęło ponad 30 lat od zidentyfikowania tego groźnego patogenu, nie opracowano dotychczas szczepionki profilaktycznej, co jest spowodowane dużym zróżnicowaniem i zmiennością genetyczną wirusa. Dostępna jest terapia z wykorzystaniem leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (*direct-acting antivirals*, DAA). Zaletą terapii jest duża skuteczność, ale jej stosowanie związane jest z pojawianiem się lekoopornych wariantów wirusa, a wyleczenie nie gwarantuje trwałej odporności. Dodatkowo wysoki koszt terapii DAA jest czynnikiem ograniczającym powszechność jej stosowania. Mając to na uwadze należy wysoko ocenić trafność i aktualności wyboru tematyki projektu doktorskiego Pani Anny Czarnoty, ponieważ szczepienia profilaktyczne są najskuteczniejszą i opłacalną pod względem ekonomicznym metodą profilaktyki chorób zakaźnych.

Celem projektu doktorskiego było opracowanie potencjalnych szczepionek, w których jako immunogeny są wykorzystywane silnie konserwowane epitopy pochodzące z glikoproteiny E2 HCV, odgrywające kluczową rolę w procesie wnikania wirusa do komórki i będące celem dla przeciwciał neutralizujących. Zaproponowana strategia zakładała wykorzystanie jako nośnika wybranych epitopów antygenowych wirusa HCV dobrze scharakteryzowanego pod względem strukturalnym i immunogenności rekombinowanego białka powierzchniowego wirusa zapalenia wątroby typu B (SHBsAg), które samorzutnie tworzy nanostruktury wirusopodobne. Takie podejście jest zgodne z tendencjami współczesnej wakcynologii, która propaguje szczepionki oparte na niezakaźnych rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych (VLP) otrzymywanych w bezpiecznych i wystandaryzowanych warunkach ekspresji heterologicznej. Ogromną zaletą szczepionek VLP jest ich zdolność do uruchamiania zarówno humoralnej jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej, która czyni te cząstki uniwersalnymi kandydatami na szczepionki nowej generacji. Obecnie na świecie jest dopuszczonych do użycia kilka preparatów tego typu. Ostatnim, zarejestrowanym w ubiegłym roku w Kanadzie, jest otrzymywana w roślinach szczepionka przeciw COVID-19, zawierająca białko S wirusa SARS-CoV-2 w postaci VLP.

Rozprawa doktorska Pani Anny Czarnoty została przygotowana w formie zbioru trzech powiązanych tematycznie oryginalnych prac opublikowanych w renomowanych, specjalistycznych czasopismach naukowych z listy JCR. Prace ukazały się w *Microbial cell factories* (IF 4.063) w 2016 r., w *Vaccines* (IF 4.961) w 2020 r. oraz w *Microbiology Spectrum* (IF 7.171) w 2023 r. Doktorantka jest pierwszą autorką we wszystkich pracach. Wkład Pani Anny Czarnoty w ich powstaniu był wiodący. Dotyczył udziału w opracowywaniu koncepcji badań, wykonywaniu części eksperymentalnej, opracowaniu i interpretacji wyników oraz przygotowaniu manuskryptu.

Doktorantka wykazała się również aktywnością w pozyskiwaniu funduszy na badania, które były częściowo finansowane przez grant Preludium w ramach konkursu NCN. Fakt ten świadczy o samodzielności Kandydatki i zasługuje na duże uznanie.

Tytuł rozprawy dobrze odzwierciedla zawartą w niej treść. Napisane w języku polskim opracowanie ma poprawny układ, na który składają się: *Wykaz skrótów*; *Streszczenia* w języku polskim i angielskim; *Wstęp*; *Wykaz cytowanej literatury*; *Cele badań*; *Omówienie uzyskanych wyników badań*; *Wnioski końcowe*; *Osiągnięcia naukowe* oraz dwa *Załączniki*. Jeden zawierający pełną wersję publikacji składających się na rozprawę doktorską oraz drugi z oświadczeniami Doktorantki i współautorów publikacji, określające ich indywidualny wkład w powstanie prac.

Zawarty na 25 stronach *Wstęp* stanowi kompetentne wprowadzenie w tematykę rozprawy. Autorka przedstawiła w rozdziale dane literaturowe dotyczące odpowiedzi komórkowej oraz humoralnej układu immunologicznego w przebiegu zakażeń HCV z uwzględnieniem mechanizmów zaangażowanych w unikanie przez wirusa odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu. Przedstawiła również wyniki badań nad szczepionką przeciwko HCV, prowadzonych w różnych ośrodkach naukowych i firmach farmaceutycznych. Informacje te stanowiły racjonalną podstawę opracowania strategii konstrukcji potencjalnej szczepionki przeciwko HCV. Wprowadzenie teoretyczne zostało zilustrowane jedną tabelą i pięcioma starannie opracowanymi ilustracjami. Cytowane we *Wstępie* prace źródłowe zostały odpowiednio dobrane, co świadczy o dobrym przygotowaniu teoretycznym Pani Anny Czarnoty do realizowanych badań.

*Cele badań* Doktorantka przedstawiła w postaci precyzyjnie sformułowanych punktów oraz Ryciny obrazującej w estetycznej formie konstrukcję chimericznych cząstek sHBsAg.

Liczący 15 stron rozdział *Omówienie opublikowanych prac* zawiera opracowane w syntetycznej formie logicznie skonstruowane opisy wyników badań prezentowanych w każdej z publikacji, oraz klarownie sformułowane na ich podstawie wnioski.

*Wnioski końcowe* z przeprowadzonych badań zostały sformułowane w postaci zwięzłych stwierdzeń, które znajdują poparcie w wynikach prezentowanych w publikacjach.

Rozprawa jest bardzo starannie przygotowana zarówno pod względem merytorycznym jak i redakcyjnym. Sugerowałabym jedynie stosowanie sformułowania „produkcja” w miejsce „ekspresja białka” oraz konsekwentnie „cząstki” (nie cząsteczki) wirusopodobne.

Pani Anna Czarnota zrealizowała z sukcesem ambitne cele projektu doktorskiego wykorzystując różnorodne techniki z zakresu biologii molekularnej, nadprodukcji i oczyszczania białek rekombinowanych, biochemiczne i przede wszystkim zaawansowane metody immunologiczne. Świadczy to o dużych umiejętnościach praktycznych Kandydatki.

Celem pracy *Immunogenicity of Leishmania-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus* (Microbial cell factories, 2016) było otrzymanie oraz zbadanie immunogenności VLP opartych na białku sHBsAg, prezentujących na swojej powierzchni silnie konserwowany epitop I glikoproteiny E2 wirusa HCV. Innowacyjnym aspektem pracy było otrzymanie rekombinowanego białka w systemie ekspresyjnym opartym na pierwotniaku *Leishmania tarentolae*. Układ ten zapewnia wzór glikozylacji zbliżony do występującego w komórkach ssaczy, co ma kluczowe znaczenie dla immunogenności produkowanych białek. Doktorantka otrzymała prawidłowo złożone VLP, które były N-glikozylowane. Chimeryczne cząstki były silnie immunogenne i wykazywały zdolność do indukcji przeciwciał o reaktywności krzyżowej. Co istotne wstawienie epitopu nie zmieniło właściwości immunizacyjnych białka nośnikowego, szczepienie myszy preparatem chimericznych cząstek wzbudziło swoistą odpowiedź komórkową oraz humoralną przeciwko białku sHBsAg.

Ze względu na wysoką wydajność i niski koszt produkcji chimericznych VLP sHBsAg system *L. tarentolae* stanowi korzystną alternatywę dla użycia komórek ssaczy do produkcji na dużą skalę glikozylowanych VLP do celów farmaceutycznych. Moim zdaniem, poza względami ekonomicznymi, możliwość otrzymania szczepionki w systemie *L. tarentolae* może mieć również istotne znaczenie ze

wzglądu ma fakt, że część osób, odmawia przyjmowania preparatów produkowanych z wykorzystaniem linii ludzkich komórek embrionalnych z powodów etycznych

Praca „*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) została poświęcona badaniu immunogenności chimericznych VLP sHBsAg niosących cztery wyselekcjonowane epitopy glikoproteiny E2 o silnie konserwowanej sekwencji, włączane do struktury cząstki pojedynczo lub jako kombinacja dwóch. Badania wykonane we współpracy z zespołem z Uniwersytetu w Kopenhadze wykazały, że jedynie chimeryczne cząstki prezentujące epitop I (412-425) indukowały powstanie przeciwciał neutralizujących *in vitro* wirusy HCV pochodzące z różnych genotypów krążących, populacji ludzkiej. Wyniki testów neutralizacyjnych wskazywały na znaczenie przeciwciał konformacyjnych skierowanych przeciwko pozostałym użytym epitopom, dla skuteczności neutralizacji wirusa.

W pracy „*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*, 2023) badano możliwości opracowania antygeny pozwalającego na przezwycięzenie mechanizmów ucieczki wirusa przed układem immunologicznym, związanych ze zjawiskiem przesunięcia glikanów w obrębie epitopu I glikoproteiny E2. W tym celu Doktorantka otrzymała chimeryczne VLP niosące epitop I z przesuniętym miejscem glikozylacji z N417 do pozycji N415. Wykazano, że przeciwciała wywołane przez VLP oparte na sHBsAg, prezentujących dwa warianty epitopu I, były ukierunkowane na dwa różne warianty glikozylacji heterodimeru glikoprotein E1E2 HCV. Prezentowane w artykule wyniki kompleksowej charakterystyki indukowanych przeciwciał sugerują, że ze względu na elastyczność konformacyjną glikoproteiny E2 i epitopu I, przyszłe antygeny szczepionkowe powinny indukować przeciwciała ukierunkowane na więcej niż jeden wariant glikozylacji i konformacji epitopu I.

Podsumowując Doktorantka wykazała, że epitop I pochodzący z glikoproteiny E2 jest najbardziej obiecującym celem dla racjonalnie zaprojektowanej szczepionki przeciwko HCV. Produkowane z dużą wydajnością w systemie *L. tarentolae* chimeryczne cząstki 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. Ponieważ białko sHBsAg zachowuje swoją immunogenność i wzbudza silną, swoistą odpowiedź zarówno humoralną jak i komórkową chimeryczne cząsteczki HBV-HCV potencjalnie mogą być użyte jako bivalentna szczepionka przeciwko HCV i HBV.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań. Prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

- Chciałabym się dowiedzieć jaki był stopień homogenności preparatów VLP oczyszczonych metodą ultrawirowania.
- Czy badano stabilność temperaturową chimericznych VLP modyfikowanych przez wstawienie epitopu I. To znaczy, czy podobnie jak komercyjna szczepionka ENGERIX B, są stabilne podczas przechowywania w temperaturze 2°C – 8°C?
- Zgodnie z wnioskami z prezentowanych badań „w przyszłości konieczne będzie opracowanie antygeny lub kombinacji antygenów prezentujących epitop I w optymalnej konformacji”. Poproszę Doktorantkę o spekulację ile wariantów chimericznych VLP powinna zawierać skuteczna pan-genotypowa szczepionka przeciw HCV.
- Dane literaturowe wskazują, że „idealna” szczepionka przeciw HCV powinna wywoływać dwojaką odpowiedź immunologiczną organizmu - komórkową i humoralną. Czy są planowane, lub były już podejmowane w Zespole próby otrzymania VLP niosących epitopy odpowiedzialne za indukcję odpowiedzi limfocytów T?

Na zakończenie chciałam zwrócić uwagę, że Doktorantka jest również współautorką 5 innych prac opublikowanych w latach 2016 – 2022, jeden z artykułów dotyczy bezpośrednio tematyki

projektu doktorskiego. Ponadto Pani Czarnota jest współtwórczynią dwóch patentów przyznanych przez Europejski Urząd Patentowy oraz jednego patentu przyznanego przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej oraz dwóch zgłoszeń do Urzędu Patentowego RP. Wyróżniająca się aktywność Kandydatki wymownie świadczy o Jej potencjale do dalszego rozwoju naukowego.

**Podsumowując**, wysoko oceniam wartość naukową recenzowanej rozprawy oraz jej potencjał aplikacyjny. Z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Anny Czarnoty zatytułowana „*Chimeryczne, wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV jako potencjalna szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C*” spełnia wymagania określone w art. 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami) stawiane rozprawom doktorskim na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki biologiczne. W związku z tym **wniosuję do Wysokiej Rady Dyscypliny Nauki Biologiczne Uniwersytetu Gdańskiego o dopuszczenie Pani mgr Anny Czarnoty do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

Jednocześnie mając na uwadze fakt, że wyniki realizacji projektu doktorskiego Pani mgr Anny Czarnoty zostały opublikowane w prestiżowych, recenzowanych czasopismach naukowych i są przedmiotem przyznanych patentów, **wniosuję o wyróżnienie rozprawy.**

Warszawa, dnia 31 marca 2023 r.

Dr hab. Ewa Szolajska  
Środowiskowa Pracownia Hodowli Komórkowych  
i Produkcji Białek  
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN