

## Streszczenie

**Tytuł rozprawy: Rekombinowane cząstki wirusopodobne jako potencjalne antygeny szczepionkowe przeciwko wirusowi Zika**

**Promotor: dr hab. Ewelina Król, prof. UG**

Wirus Zika (ZIKV) to patogen zakażający człowieka i należący do rodzaju *Flavivirus* w rodzinie *Flaviviridae*. Choć większość zakażeń ZIKV przebiega bezobjawowo, to czasem infekcja może prowadzić do rozwinięcia neurologicznych komplikacji np. syndromu Guillain-Barré. Co istotne, wirus może przenosić się drogą transmisji pionowej, czyli z matki na płód, w wyniku czego może dojść do rozwinięcia wrodzonego syndromu zika (*ang. congenital zika syndrome, CZS*). CZS obejmuje szerokie spektrum wad wrodzonych przede wszystkim małogłowie. ZIKV, podobnie jak inne wirusy z tego rodzaju, jest głównie przenoszony przez komary, co przyczyniło się do silnego rozprzestrzeniania się na świecie. Przez wiele lat infekcje ZIKV były sporadyczne i występowały głównie w rejonie Afryki, aż do epidemii w rejonie Mikronezji oraz Polinezji Francuskiej, a następnie pandemii w latach 2015-2016, która objęła prawie całą półkulę południową. Szacuje się, że w tym okresie tylko w Brazylii było ponad 1 300 000 przypadków infekcji. W związku ze zmianami klimatycznymi ZIKV nadal rozprzestrzenia się i obecnie występuje na terytorium 89 krajów na całym świecie. Chociaż ogólna liczba zakażeń ZIKV obecnie jest niska, to nadal wirus ten aktywnie krąży w Ameryce Łacińskiej i Azji. Ponadto, niedawne badania wskazują również na pojawienie się nowych szczepów ZIKV, które są bardziej zakaźne i patogenne.

Chociaż podjęto wiele wysiłków, aby opracować skuteczną szczepionkę lub terapię przeciwwirusową, nadal żadne z powyższych nie zostały zatwierdzone do użycia dla ludzi. Biorąc pod uwagę przenoszenie ZIKV i ryzyko kolejnej epidemii, a także powikłań neurologicznych po zakażeniu ZIKV, pozostaje on poważnym problemem dla populacji ludzkiej, zwłaszcza dla kobiet w ciąży. Dlatego istnieje potrzeba szczegółowego zbadania patologii ZIKV, a przede wszystkim opracowania nowych skutecznych szczepionek i leków antywirusowych.

Jednym z rodzajów rekombinowanych antygenów szczepionkowych są cząstki wirusopodobne (*ang. virus-like particles, VLPs*). VLPs to struktury składające się z jednego lub więcej różnych białek wirusowych, mających zdolność do samoorganizacji, przez co naśladują swoją formą natywne wiriony. Są one pozbawione materiału genetycznego, więc nie są zdolne do infekowania komórek gospodarza. Cechy te sprawiają, że VLPs posiadają wysoki potencjał immunogeny, a jednocześnie są znacznie bardziej bezpieczne w użyciu jako składnik szczepionki niż inaktywowany wirus. Dla wirusa Zika, dwie glikoproteiny osłonki wirusowej prM i E są zdolne do składania się w VLPs, gdy ich geny ulegają ekspresji razem w różnych komórkach eukariotycznych np. komórkach owadzich lub ssaczy. Proces składania cząstek zachodzi w retikulum endoplazmatycznym, a następnie cząstki te ulegają dojrzewaniu tj. glikozylacji, cięciu proteolitycznemu oraz reorganizacji struktury. VLPs produkowane w

różnych komórkach mogą różnić się antygenowością, co w konsekwencji może wpływać na ich potencjał immunogeny.

Praca ta miała na celu ocenić:

- wpływ systemu ekspresji genów oraz genetycznych modyfikacji na proces składania rekombinowanych VLPs oraz ich antygenowość, jak również określić ich potencjał immunogeny,
- wpływ schematu dawkowania i adiuwantów na immunogenność wybranych rekombinowanych VLPs.

W pierwszym etapie pracy zaprojektowano geny różnych wariantów rekombinowanych białek prM i E, które następnie wprowadzono do dwóch systemów ekspresji genów: systemu bakulowirusowej ekspresji genów w komórkach owadzych oraz systemu przejściowej ekspresji w komórkach ssaczych. Ekspresja genów obu białek była na niskim poziomie, dlatego następnie zoptymalizowano proces produkcji rekombinowanych VLPs poprzez modyfikację warunków hodowli komórek. W następnym etapie oceniono zdolność białek prM i E do tworzenia VLPs wykorzystując metodę ultrawierwienia w gradiencie gęstości. Ponadto obecność VLPs analizowano także w transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz metodą dynamicznego rozpraszania światła. W obu systemach VLPs były produkowane na podobnym poziomie wydajności, lecz cząstki te różniły się stopniem dojrzałości. Dojrzałość cząstek, a szczególnie glikoproteiny E może wpływać na immunogenność VLPs, więc w kolejnym etapie analizowano dogłębnie determinanty antygenowe tj. profil glikozytacji VLPs i wiązanie do lektyn oraz prezentację specyficznych epitopów na powierzchni cząstek metodami immunoenzymatycznymi. Wyniki wykazały, że białka prM i E są glikozylowane w obu systemach ekspresji. Jednak zaobserwowano lepsze wiązanie się VLPs produkowanych w komórkach ssaczych do lektyn, jak i również lepszą ekspozycję epitopów na tych VLPs niż na cząstkach pochodzących z systemu bakulowirusowego. W celu porównania immunogenności obu typów VLPs, zaszczepiono dwie grupy myszy oczyszczonymi VLPs w kombinacji z adiuwantem typu olej-w-wodzie na bazie skwalenu. Analizy immunologiczne wykazały większą zdolność VLPs produkowanych w komórkach ssaczych do wzbudzania odpowiedzi humoralnej oraz do generowania przeciwciał neutralizujących wirusa Zika. Podsumowując wykazano, że system ekspresji genów wpływa na jakość cząstek wirusopodobnych wirusa Zika, co przekłada na się na ich immunogenność. System komórek ssaczych wykazał wyższą w kontekście produkcji dojrzałych VLPs o wysokim potencjale antygenowym i immunogenym.

W drugim etapie pracy zmodyfikowano sekwencje białek prM/E w celu zwiększenia produkcji VLPs w komórkach ssaczych. Następnie zoptymalizowano dwuetapowe oczyszczanie VLPs przy użyciu metod chromatograficznych. Oczyszczone tą metodą VLPs posłużyły do badań immunologicznych w celu określenia wpływu schematu dawkowania oraz adiuwantów na wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej w modelu mysim. Wybrano dwa schematy szczepień: 3 wzrastające lub malejące dawki VLPs w kombinacji z poprzednio użytym adiuwantem podawane w odstępie dwóch tygodni podskórnie. Ponadto, użyto także inny typ adiuwantu – system wodorotlenku glinu z monofosforylo-lipidem A (MPLA) w połączeniu VLPs podanymi wg schematu wzrastających dawek. Formułacja szczepionki

podana wg schematu wzrastających dawek wzbudziła lepszą odpowiedź przeciwciał podklasy typu G (IgG), niezależnie od adiuwantu. Dodatkowo, VLPs podane wg schematu wzrastających dawek wzbudziły lepszą produkcję przeciwciał podklasy IgG1 i IgG2a. Surowice z myszy szczepionych schematem wzrastających dawek wykazały także lepszą aktywność neutralizującą wirusa Zika.

Podsumowując, wyniki uzyskane w tej pracy po raz pierwszy pokazują różnice w dojrzałości oraz antygenowości VLPs produkowanych w różnych komórkach eukariotycznych. Dojrzałość VLPs ma szczególne znaczenie w wykorzystaniu jako antygen szczepionkowy szczególnie w wzbudzaniu odpowiedzi przeciwciał neutralizujących wirusa Zika. Ponadto, wykazano, że immunogenność VLPs może być modyfikowana przez odpowiednie dobranie dawkowania VLPs oraz odpowiedniego adiuwantu w formulacjach szczepionkowych. Uzyskane w niniejszej pracy rezultaty mogą przyczynić się do racjonalnego zaprojektowania antygenów szczepionkowych w postaci cząstek wirusopodobnych, ich optymalnej produkcji w komórkach eukariotycznych, a także odpowiedniej formulacji szczepionki nie tylko przeciwko wirusowi Zika, ale także innym wirusom z rodzaju *Flavivirus*.