

Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen szczepionkowy

mgr Marta Zimna

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV, ang. *tick-borne encephalitis virus*) stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego w różnych regionach Europy Środkowej, Wschodniej i Północnej, a także w północnej Azji, powodując poważne infekcje neurologiczne, takie jak zapalenie mózgu czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Główną drogą przenoszenia TBEV są ukąszenia kleszczy, jednak spożycie produktów mlecznych pochodzących od zakażonych zwierząt, takich jak kozy, bydło i owce, również stanowi znaczący czynnik ryzyka. Na rynku dostępne są szczepionki przeciwko TBEV oparte na inaktywowanym wirusie, jednak do tej pory nie została opracowana specyficzna terapia antywirusowa. Pomimo znaczącego wzrostu liczby zakażeń TBEV, w wielu dotkniętych krajach wskaźniki szczepień pozostają niskie ze względu na wysokie koszty istniejących szczepionek. Co więcej, ze względu na wysokie koszty nie są one powszechnie stosowane jako szczepionki weterynaryjne, co podkreśla pilną potrzebę opracowania alternatywnych środków zapobiegawczych.

Podjęcie zaprezentowane w tej rozprawie, oparte na cząstkach wirusopodobnych (VLPs, ang. *virus-like particles*), TBEV, które naśladują strukturę natywnych cząstek wirusa, ale nie posiadają materiału genetycznego, wykazało wysoki potencjał do zastosowania jako antygen szczepionkowy. Znaczącym osiągnięciem było wykazanie użyteczności stosowania systemu ekspresyjnego opartego na pierwotniaku *L. tarentolae* do wydajnej produkcji VLPs TBEV. Poprzez charakterystykę funkcjonalną potwierdzono, że rekombinowane białka strukturalne (prM/M i E) TBEV tworzą VLPs, które są wysoce rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące w analizach *in vitro*.

W celu oceny immunogenności uzyskanych cząstek, przeprowadzone zostały badania w mysim modelu zwierzęcym. Zwierzęta zostały zaszczepione trzema dawkami VLPs w połączeniu z adiuwantem AddaVax™, a uzyskane surowice poszczepienne zostały poddane analizie. Przeprowadzone badania wykazały wysoki poziom przeciwciał przeciwko białkom TBEV oraz inaktywowanemu wirusowi. Test neutralizacji wirusa wykazał wysoką zdolność do neutralizacji TBEV za pomocą surowic poszczepiennych, co potwierdziło skuteczność VLPs jako antygeny szczepionkowego. Wysoki potencjał uzyskanych VLPs do zastosowania w potencjalnej szczepionce został też potwierdzony w eksperymencie typu *challenge*, gdzie immunizacja za pomocą VLPs w połączeniu z adiuwantem zapewniła 100% ochrony przed rozwinięciem objawów infekcji u myszy, którym podano śmiertelną dawkę wirusa.

Kolejnym etapem badań było znalezienie najskuteczniejszej drogi podania i połączenia z adiuwantem dla potencjalnej szczepionki. Opierając się na wcześniejszych wynikach wykazujących skuteczność immunizacji za pomocą VLPs w eksperymencie typu *challenge*, w tym etapie badań głównym celem była ocena profilu odpowiedzi immunologicznej. Wykorzystując myszy jako model zwierzęcy, sześć różnych grup immunizowano VLPs poprzez podanie podskórne (s.c.) lub domięśniowe (i.m.), z lub bez adiuwantów (AddaS03™ i Alhydrogel®+MPLA). Odpowiedź limfocytów T została zbadana za pomocą testu ELISPOT (ang. *enzyme-linked immunospot assay*), wskazując na produkcję interferonu γ głównie

w grupach adiuwantowanych Alhydrogel® + MPLA.

Ponadto oceniono odpowiedź przeciwciał, wykazując wzrastający poziom przeciwciał po każdej dawce, przy czym znacznie wyższe stężenia obserwowano w grupach, w których stosowano adiuwant. Dodatkowo, miana podklas IgG uwidoczniły bardziej zrównoważoną odpowiedź immunologiczną w grupach z adiuwantem, szczególnie w przypadku antygeny z Alhydrogel®+MPLA, podawanego domięśniowo. Co więcej analiza awidności przeciwciał ujawniła wyższą awidność w grupach otrzymujących VLPs z adiuwantem, podkreślając rolę adiuwantów w poprawie jakości przeciwciał. Testy neutralizacji wykazały wyższe miana w grupach myszy otrzymujących VLPs z adiuwantem, zwłaszcza w podaniu i.m., co wskazuje na większy potencjał neutralizujący wobec różnych szczepów TBEV. Biorąc pod uwagę wszystkie czynniki, uzyskane wyniki sugerują, że VLPs w połączeniu z Alhydrogel® i MPLA podawane domięśniowo wywołują silną i zrównoważoną odpowiedź immunologiczną, ze zwiększoną produkcją przeciwciał neutralizujących w porównaniu do poprzednich badań. To zoptymalizowane podejście do szczepień jest obiecujące w zakresie skutecznego zapobiegania zakażeniom TBEV.

Podsumowując, wyniki uzyskane w ramach realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej wskazują, że otrzymane VLPs TBEV są bardzo dobrym kandydatem na alternatywną szczepionkę przeciwko temu wirusowi. Badania mające na celu scharakteryzowanie produkowanych rekombinowanych białek wykazały, że są one funkcjonalne i tworzą VLPs, które zostały wykorzystane do dalszych badań. Ich skuteczność w zapobieganiu infekcji została wykazana w kilku etapach badań na zwierzętach. Potwierdziły one pełną skuteczność w ochronie przed infekcją oraz pozwoliły na wskazanie potencjalnie najskuteczniejszych połączenia z adiuwantem oraz drogi podania potencjalnej szczepionki.

VLPs produkowane są w niekonwencjonalnym systemie ekspresyjnym opartym na pierwotniaku, dzięki czemu możliwa jest wydajna produkcja i oczyszczanie cząstek, a dzięki temu niska cena potencjalnej szczepionki. Sprawia to, że opracowana potencjalna szczepionka jest konkurencyjna względem dostępnych obecnie szczepionek opartych na inaktywowanym wirusie. Wdrożenie opracowanej rekombinowanej szczepionki o niższych kosztach, mogłoby w znacznym stopniu przyczynić się do zwiększenia dostępności szczepionki przeciwko TBEV. Koszty produkcji mogłyby zostać obniżone w stosunku do obecnie dostępnych szczepionek ze względu na wykorzystanie systemu ekspresji opartego na tanich odczynnikach, zastosowanie prostych metod oczyszczania oraz oparcie preparatu na rekombinowanym antygenie, nie wymagającym przy produkcji tak wysokich zabezpieczeń jak szczepionka inaktywowana oparta na wirusie. Tania, ale skuteczna i bezpieczna szczepionka chroniąca przed zakażeniem wirusem TBEV mogłaby być stosowana powszechnie. Niskie koszty szczepionki mogłyby też pozwolić na wykorzystanie jej jako szczepionki weterynaryjnej, która obecnie nie jest dostępna. Spożycie produktów mlecznych od zakażonych zwierząt jest jedną z dróg przeniesienia wirusa na ludzi. W związku z tym wprowadzenie powszechnych szczepień dla zwierząt hodowlanych przyczyniłoby się zarówno do zmniejszenia rezerwuaru wirusa w środowisku, jak również ograniczyłoby możliwości zakażenia ludzi.