



Międzyuczelniany Wydział  
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego  
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

---

ROZPRAWA DOKTORSKA

---

*mgr Karolina Gackowska*

# Makrocząsteczkowe struktury oparte o cząstki wirusopodobne jako potencjalne nośniki szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA

Macromolecular structures based on virus-like particles  
as carriers for potential vaccines based on stabilized  
mRNA

Praca przedstawiona  
Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego  
celem uzyskania stopnia doktora  
w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych  
w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: **prof. dr hab. Bogusław Szewczyk**  
Zakład Szczepionek Rekombinowanych

GDAŃSK 2025

*Chciałabym serdecznie podziękować*  
**Profesorowi Bogusławowi Szewczykowi**  
*za nieocenione wsparcie merytoryczne, niezwykle cenne wskazówki oraz wiedzę  
przekazywane na każdym etapie prowadzenia badań oraz powstawania niniejszej  
rozprawy.*

**Doktorowi Łukaszowi Rąbalskiemu**  
*za udzielone wsparcie, życzliwość i merytoryczne wskazówki, które były dla mnie  
wyjątkowo ważne podczas realizacji badań.*

**Koleżankom i Kolegom z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych, Zakładu Biologii  
Molekularnej Wirusów oraz innych jednostek Wydziału**  
*za cenne wskazówki, nieocenioną pomoc podczas realizacji eksperymentów oraz  
mile spędzony czas.*

**Moim Rodzicom, Annie i Andrzejowi, rodzinie oraz przyjaciołom**  
*za wsparcie i motywację do działania podczas całej tej drogi.*

Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu z projektu „Transport stabilizowanego, terapeutycznego mRNA upakowanego w cząstkach wirusopochodnych do komórek ssaczych”, realizowanego pod kierownictwem prof. dr. hab. Bogusława Szewczyka, w ramach konkursu NCN – Opus 17 (UMO-2019/33/B/NZ6/01241).



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

## Spis treści

Spis treści .....	3
1. Wykaz skrótów .....	6
2. Streszczenie w języku polskim .....	8
3. Streszczenie w języku angielskim (Abstract) .....	10
4. Wstęp .....	12
4.1. Wirus zapalenia wątroby typu B .....	12
4.2. Wirus grypy typu A .....	18
4.3. Szczepionki mRNA .....	26
4.4. Szczepionki oparte na cząstkach wirusopodobnych .....	35
5. Cele pracy .....	40
6. Materiały i aparatura .....	41
6.1. Sekwencje genów syntetycznych .....	41
6.2. Sekwencje starterów .....	41
6.3. Plazmidy .....	42
6.4. Szczepy bakteryjne .....	42
6.5. Linie komórkowe eukariotyczne .....	43
6.6. Pożywki wzrostowe dla bakterii .....	43
6.7. Pożywki wzrostowe dla komórek eukariotycznych .....	43
6.8. Dodatki używane przy hodowli komórek eukariotycznych .....	43
6.9. Odczynniki laboratoryjne .....	44
6.10. Materiały zużywalne .....	46
6.11. Bufory standardowe i żele .....	47
6.12. Odczynniki do transfekcji .....	49
6.13. Kolumny chromatograficzne .....	49
6.14. Bufory do oczyszczania białek .....	49
6.15. Bufory komercyjne .....	50
6.16. Enzymy komercyjne i ich bufory .....	50
6.17. Wzorce masowe .....	51
6.18. Przeciwciała, rekombinowane białka oraz mieszaniny peptydów .....	51
6.19. Zestawy komercyjne .....	51
6.20. Aparatura .....	52
6.21. Oprogramowanie .....	53

7.	Metody.....	54
7.1.	Przygotowanie komórek kompetentnych <i>E. coli</i> NEB stable oraz Mach1.....	54
7.2.	Transformacja komórek kompetentnych plazmidem lub mieszaniną ligacyjną .....	54
7.3.	Hodowla nocna komórek bakteryjnych <i>E. coli</i> .....	54
7.4.	Oczyszczanie plazmidowego DNA .....	54
7.5.	Pomiar stężenia DNA.....	54
7.6.	Trawienie enzymatyczne plazmidów.....	54
7.7.	Sekwencjonowanie plazmidów .....	54
7.8.	Amplifikacja genów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR).....	55
7.9.	Klonowanie wstawek do plazmidów .....	55
7.10.	Klonowanie sekwencji znacznika Twin-Strep-tag do konstruktu pFastBac-sHBsAg.....	55
7.11.	Mutageniza miejscowo-insercyjna dla rekombinowanych TS-sHBsAg .....	55
7.12.	Transformacja komórek kompetentnych <i>E. coli</i> DH10Bac Max Efficiency .....	56
7.13.	Hodowla nocna komórek <i>E. coli</i> DH10Bac Max Efficiency .....	56
7.14.	Oczyszczanie bakmidów .....	56
7.15.	Analiza oczyszczonych bakmidów .....	56
7.16.	Pasażowanie komórek owadzych.....	57
7.17.	Transfekcja komórek owadzych bakmidami .....	57
7.18.	Amplifikacja bakulowirusów.....	57
7.19.	Miareczkowanie wirusów .....	57
7.20.	Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE.....	57
7.21.	Barwienie białek przy użyciu Coomassie Brilliant Blue R-250 .....	58
7.22.	Barwienie białek przy użyciu SimplyBlue™ SafeStain .....	58
7.23.	Transfer mokry białek na błonę PVDF .....	58
7.24.	Immunodetekcja białek przy użyciu metody Western blotting.....	58
7.25.	Produkcja białek wirusowych w komórkach owadzych .....	58
7.26.	Oczyszczanie rekombinowanych wariantów TS-sHBsAg.....	59
7.27.	Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM) .....	59
7.28.	Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) .....	59
7.29.	Oczyszczanie nukleoproteiny wirusa grypy typu A.....	60
7.30.	Pomiar stężenia białek.....	60
7.31.	Analiza obecności endogennych kwasów nukleinowych w oczyszczonych VLPs.....	60
7.32.	Odcinanie znacznika Twin-Strep-tag .....	61
7.33.	Zaprojektowanie matrycy do transkrypcji mRNA <i>in vitro</i> .....	61
7.34.	Mutageniza miejscowo-insercyjna dla matrycy do transkrypcji .....	61

7.35.	Transkrypcja IVT mRNA.....	62
7.36.	Pomiar stężenia RNA i analiza jakości .....	62
7.37.	Hodowla komórek ssaczych linii HEK293T oraz Vero E6.....	63
7.38.	Transfekcja mRNA.....	63
7.39.	Mikroskopia fluorescencyjna .....	63
7.40.	Transkrypcja IVT radioaktywnie znakowanego mRNA.....	63
7.41.	Wiązanie radioaktywnego mRNA.....	63
7.42.	Transkrypcja IVT fluorescencyjnie znakowanego mRNA .....	64
7.43.	Wiązanie fluorescencyjnie znakowanego mRNA .....	64
7.44.	Przygotowanie nanocząstek lipidowych z mRNA.....	64
7.45.	Przygotowanie mieszanin do szczepień .....	65
7.46.	Immunizacja myszy .....	65
7.47.	Analiza odpowiedzi humoralnej.....	66
7.48.	Izolacja splenocytów .....	66
7.49.	Analiza odpowiedzi komórkowej .....	67
8.	Wyniki.....	68
8.1.	Opracowanie wydajnej metody produkcji i oczyszczania chimerycznych VLPs opartych na sHBsAg w systemie owadzi.....	68
8.2.	Zaprojektowanie matryc do transkrypcji mRNA oraz wiązanie do VLPs.....	85
8.3.	Doświadczenia na zwierzętach i ewaluacja kandydatów szczepionkowych.....	93
9.	Dyskusja.....	100
9.1.	Opracowanie wydajnej metody produkcji i oczyszczania chimerycznych VLPs opartych na sHBsAg w systemie owadzi.....	100
9.2.	Zaprojektowanie matryc do transkrypcji mRNA oraz wiązanie do VLPs.....	102
9.3.	Doświadczenia na zwierzętach i ewaluacja kandydatów szczepionkowych.....	103
10.	Podsumowanie .....	107
11.	Bibliografia.....	108
12.	Osiągnięcia naukowe.....	129
12.1.	Dorobek naukowy powiązany z rozprawą doktorską .....	129
12.2.	Dodatkowy dorobek naukowy .....	129
12.3.	Konferencje naukowe .....	129

## 1. Wykaz skrótów

aa - aminokwasy

ARCA – dinukleotydowy analog czapeczki zapobiegający odwrotnej inkorporacji, *ang. anti-reverse cap analogue*

ARD – domena bogata w argininy, *ang. arginine-rich domain*

BSA – surowicza albumina bydlęca, *ang. bovine serum albumine*

CCC - DNA w formie kołowej zamkniętej, *ang. covalently closed circular*

DLS – dynamiczne rozpraszanie światła, *ang. dynamic light scattering*

dsDNA – dwuniciowe DNA, *ang. double-stranded DNA*

dsRNA – dwuniciowe RNA, *ang. double-stranded RNA*

DTT – ditiotreitol

GdnHCl – chlorowodorek guanidyny

GdnSCN – tiocyjanian (rodanek) guanidyny

HA - hemaglutynina

HBcAg – białko kapsydu wirusa HBV

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa, *ang. high-performance liquid chromatography*

HBV – wirus zapalenia wątroby typu B, *ang. hepatitis B virus*

HPV – wirus brodawczaka ludzkiego, *ang. human papillomavirus*

IAV – wirus grypy typu A, *ang. Influenza A virus*

IFN – interferon

IHbsAg – duże białko powierzchniowe wirusa

LNPs – nanocząstki lipidowe, *ang. lipid nanoparticles*

m<sup>1</sup>Ψ – N1-metylo-pseudourydyna

mHBsAg – średnie białko powierzchniowe wirusa

MHC – główny układ zgodności tkankowej, *ang. major histocompatibility complex*

MOI – wielokrotność zakażenia, *ang. multiplicity of infection*

mRNA – informacyjny RNA, *ang. messenger RNA*

MVPs – ciała wielopęcherzykowate, *ang. multivesicular bodies*

NA – neuraminidaza

NP - nukleoproteina wirusa grypy typu A

nt – nukleotydy

NTCP – kotransporter taurocholalanu sodu

PBS – buforowana fosforanem sól fizjologiczna, *ang. phosphate buffered saline*

pgRNA – pregenomowe RNA

pz – par zasad

RC – DNA w formie luźnej kołowej, *ang. relaxed circular*

RSV - syncytialny wirus oddechowy, *ang. respiratory syncytial virus*

sa-RNA – samoreplikujące się RNA, *ang. self-amplifying RNA*

SARS-CoV-2 – koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego typu 2, *ang. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*

sHBsAg – małe białko powierzchniowe wirusa HBV, *ang. HBV small surface antigen*

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa, *ang. transmission electron microscopy*

TBEV – wirus kleszczowego zapalenia mózgu, *ang. tick-borne encephalitis virus*

UTR – region niekodujący, *ang. untranslated region*

VLPs – cząstki wirusopodobne, *ang. virus-like particles*

vRNA – wirusowy RNA, *ang. viral RNA*

vRNP – wirusowe rybonukleoproteiny, *ang. viral ribonucleoproteins*

## 2. Streszczenie w języku polskim

Szczepionki oparte o cząstki wirusopodobne (VLPs) są dostępne na rynku i używane od prawie 40 lat. Ze względu na to, iż nie zawierają materiału genetycznego wirusa, nie są infekcyjne, a więc stanowią bardziej bezpieczną alternatywę dla tradycyjnych szczepionek inaktywowanych czy atenuowanych. Są zbudowane zazwyczaj z jednego bądź kilku białek strukturalnych, naśladując morfologię natywnego wirusa i pobudzają układ immunologiczny do wytworzenia odpowiedzi. Pierwszą szczepionką tego typu, dopuszczoną do użytku w 1986 roku, była szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (HBV), oparta o małe białko powierzchniowe (sHBsAg) produkowane w drożdżach. Od tamtej pory przeprowadzono wiele badań skupiających się między innymi na wprowadzeniu do sekwencji sHBsAg heterogennych epitopów czy fuzji z antygenami innych patogenów. Mają one na celu sprawdzenie czy wprowadzenie modyfikacji w białku sHBsAg będzie wpływać na składanie się w cząstki czy ich immunogenność.

Wskutek pandemii SARS-CoV-2, szczepionki oparte na informacyjnym RNA (mRNA) stały się nową i atrakcyjną platformą do prezentacji antygenów. Ich zastosowanie nie ogranicza się tylko do profilaktyki zakażeń wirusowych – mogą również zawierać sekwencje kodujące antygeny bakteryjne, pasożytnicze czy nowotworowe. Ze względu na swoją nietrwałą naturę, aby mogły efektywnie zostać przetransportowane do komórek gospodarza, używa się zazwyczaj nośników lipidowych, które chronią mRNA przed degradacją. Zaletą szczepionek opartych na mRNA jest fakt, iż mogą szybko zostać zaadaptowane do aktualnie wiodących wariantów danego patogenu w środowisku – dlatego też mRNA jest ważnym kandydatem w poszukiwaniach szczepionek przeciwko szybko zmieniającym się wirusom RNA, jak na przykład wirus grypy. Skuteczność obecnie dostępnych szczepionek przeciwko temu patogenowi jest ograniczona ze względu na wysoką zmienność antygenową, co tym bardziej podkreśla konieczność prowadzenia badań w kierunku poszukiwania nowych platform szczepionkowych.

W zaprezentowanej pracy doktorskiej podjęłam się sprawdzenia możliwości zastosowania szczepionki dwuwalentnej, zawierającej cząstki wirusopodobne (oparte na sHBsAg) i mRNA kodujące sekwencję nukleoproteiny wirusa grypy typu A (NP). Pierwszym z celów pracy było opracowanie wydajnej metody nadprodukcji i oczyszczania białek opartych na sHBsAg z systemu owadziego. Aby uprościć proces oczyszczania rekombinowanego białka w stosunku do opisanych już wcześniej protokołów, do białka dodałam sekwencję znacznika Twin-Strep-tag (TS-sHBsAg). Zastosowanie chromatografii powinowactwa przyczyniło się do uzyskania dużej ilości czystego białka w jednoetapowym procesie, które mogłam bezpośrednio użyć do dalszych badań.

Do sekwencji TS-sHBsAg wprowadziłam również modyfikacje mające na celu możliwość związania mRNA (oparte na domenie wiążącej kwasy nukleinowe białka kapsydowego HBV) i również analizowałam proces nadprodukcji i oczyszczania tych wariantów. Sprawdziłam też, czy wprowadzone motywy mają wpływ na składanie się VLPs – wszystkie warianty oprócz jednego tworzyły VLPs. Starłam się również znaleźć optymalne warunki do rozkładania i składania się VLPs opartych na sHBsAg, jednak ze względu na negatywne wyniki, zdecydowałam się nie kontynuować badań w tym kierunku.

Kolejnym celem było zaprojektowanie matrycy dla szczepionkowego mRNA – została ona później użyta do produkcji stabilizowanego mRNA kodującego nukleoproteinę wirusa typu A (mRNA-NP). Antygen ten wybrałam na podstawie wcześniejszych badań wskazujących, że nukleoproteina jest wysoce konserwowana i zdolna do wywołania odpowiedzi immunologicznej, która może zapewnić ochronę przed wieloma szczepami wirusa grypy typu A. W ramach pracy przeprowadziłam również badania mające na celu sprawdzenie, czy zaproponowane nowe warianty TS-sHBsAg mogą wiązać mRNA. Na podstawie wyników wytypowałam warianty, które później zostały użyte do immunizacji myszy.

Ostatnim etapem badań opisanych w tej pracy była immunizacja myszy różnymi kombinacjami zawierającymi VLPs i mRNA (bez lub z dodatkiem adiuwantu Addavax) oraz analiza odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Zarówno VLPs oparte na sHBsAg, jak i mRNA kodujące nukleoproteinę, były immunogenne. Ze względu na brak możliwości zapakowania mRNA do środka VLPs, zastosowałam również mieszaniny VLPs z nanocząstkami lipidowymi z mRNA-NP. Na podstawie uzyskanych wyników najlepszym kandydatem zawierającym zarówno i VLPs, i mRNA, okazał się jeden ze zmodyfikowanych wariantów TS-sHBsAg w kombinacji z nanocząstkami lipidowymi zawierającymi mRNA-NP.

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że zastosowanie mieszaniny zawierającej VLPs oraz mRNA może być nową atrakcyjną platformą szczepionkową. W toku badań zaprezentowałam nową metodę oczyszczania rekombinowanych sHBsAg z systemu owadziego z użyciem chromatografii powinowactwa i potwierdziłam funkcjonalność tych białek. Zaprojektowana przeze mnie matryca do produkcji mRNA również okazała się skuteczna. Otrzymane wyniki dostarczają cennych informacji wspierających rozwój uniwersalnych podejść szczepionkowych przeciwko wielu patogenom oraz mogą stanowić podstawę dla kolejnych etapów badań i optymalizacji tej strategii.

### 3. Streszczenie w języku angielskim (Abstract)

Vaccines based on virus-like particles (VLPs) have been available and in use for almost 40 years. They do not contain viral genetic material and therefore are not infectious. Consequently, they provide a safer alternative to traditional live-attenuated or inactivated vaccine platforms. VLPs are typically composed of one or several structural proteins, allowing them to mimic the wild-type virus and stimulate the immune system. The first such vaccine was developed against hepatitis B virus (HBV) and was approved for use in 1986. It was based on the HBV small surface antigen (sHBsAg) produced in yeast. Since then, numerous studies have been conducted focusing, among other aspects, on the introduction of heterologous epitopes into sHBsAg or on fusion of antigens with those from other pathogens. These approaches aimed to determine whether such modifications of the sHBsAg protein affect its ability to self-assemble into particles or its immunogenicity.

As a new approach caused by SARS-CoV-2 pandemic, vaccines based on messenger RNA (mRNA) have emerged as a novel and attractive platform for antigen presentation. Their application is not limited to the prevention of viral diseases — they can encode bacterial, parasitic, or tumor-associated antigens. Due to the short half-life of mRNA molecules, lipid-based carriers are typically employed to ensure efficient delivery into host cells and to protect the mRNA from degradation. One of the advantages of mRNA-based vaccines is that they can be rapidly adapted to the currently circulating pathogen variants; therefore, mRNA represents one of the most promising vaccine candidates against rapidly mutating RNA viruses, e.g. for influenza virus. The effectiveness of currently used vaccines against the influenza A virus is limited due to the high antigenic variability of the virus, underscoring the need to investigate novel vaccine platforms.

In this doctoral dissertation, I am proposing a bivalent vaccine composed of virus-like particles (based on sHBsAg) and mRNA encoding the influenza A nucleoprotein (NP). The primary objective was to develop an efficient method for producing and purifying recombinant sHBsAg from insect cells. To simplify the purification process compared with the previously described protocols, a Twin-Strep tag was introduced to the gene construct (TS-sHBsAg) to facilitate protein purification by affinity chromatography. Using this strategy, a large amount of highly purified protein was obtained in a single step and subsequently used in downstream experiments. Next, modified TS-sHBsAg variants were constructed by introducing motifs (derived from the nucleic-acid binding domain of HBV capsid protein) designed to enable mRNA binding. Their production and purification were evaluated, followed by an assessment of whether these modifications

affected the ability of sHBsAg to self-assemble; all but one variant successfully formed virus-like particles. In addition, efforts were made to identify optimal conditions for VLPs disassembly and subsequent reassembly. However, because these attempts were unsuccessful, this line of research was discontinued.

The next objective was to design a template for vaccine mRNA, which was subsequently used to produce stabilized mRNA encoding the influenza A nucleoprotein (mRNA-NP). This antigen was selected based on previous research demonstrating that the nucleoprotein is highly conserved across influenza A strains and capable of eliciting a robust immune response, making it a promising target for broad-spectrum influenza vaccination. During the course of the research, the ability of the proposed TS-sHBsAg variants to bind mRNA was also evaluated. Following these results, the most promising variants were selected for mice immunization studies.

The final stage of the research described in this dissertation involved mouse immunization with different combinations of VLPs and mRNA (with or without AddaVax adjuvant), followed by analysis of both humoral and cellular immune responses. Both the sHBsAg-based VLPs and the mRNA encoding nucleoprotein proved to be immunogenic. Since packaging of mRNA into the VLPs was unsuccessful, vaccine formulations containing VLPs together with lipid nanoparticles carrying mRNA-NP were used. The most promising candidate comprising both VLPs and mRNA was one of the modified TS-sHBsAg variants combined with lipid nanoparticles containing mRNA-NP.

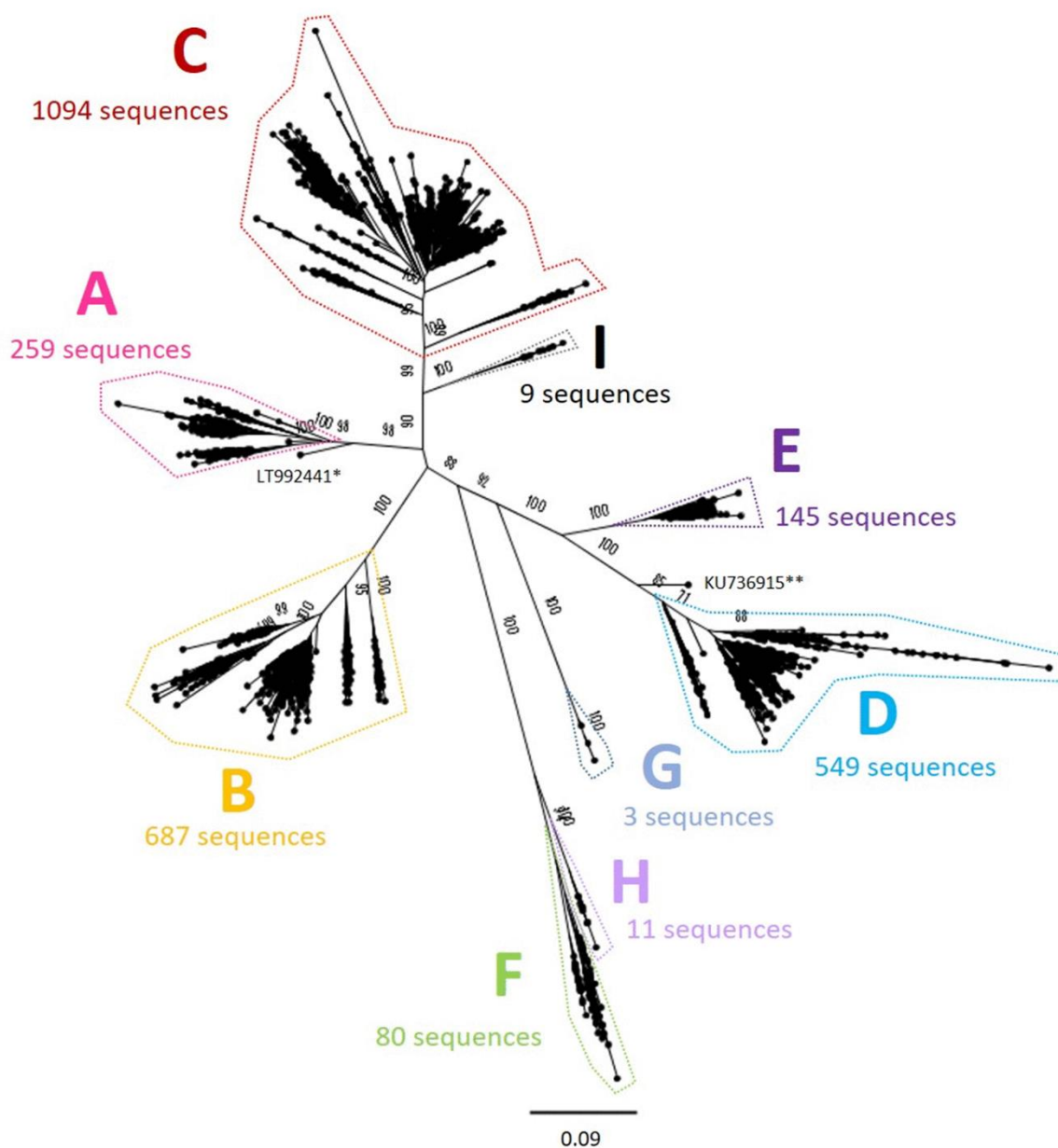
Taken together, the obtained results confirm that the combination of VLPs and mRNA can serve as a new and attractive vaccine platform. In the course of this work, a new method for the purification of recombinant sHBsAg from insect cells was developed using affinity chromatography and the functionality of the produced proteins was confirmed. Additionally, the constructed mRNA template also proved to be effective. Overall, these results contribute to the search of universal, multi-pathogen vaccine strategies and establish a promising platform for further development of this experimental approach.

## 4. Wstęp

### 4.1. Wirus zapalenia wątroby typu B

#### 4.1.1. Taksonomia

Wirus zapalenia wątroby typu B (WZW B, ang. hepatitis B virus – HBV) należy do rodziny *Hepadnaviridae* i rodzaju *Ortohepadnaviruses*<sup>1</sup>.



Ryc. 1 Drzewo filogenetyczne pełnych genomów wirusa HBV (genotypy A–I) wykonane metodą największej wiarygodności. Skala oznacza szacowaną liczbę substytucji nukleotydowych na daną pozycję (zaadaptowano na podstawie McNaughton *et al.*<sup>2</sup>).

#### 4.1.2. Epidemiologia

Wirus ten przenosi się on poprzez krew osoby zakażonej (np. poprzez transfuzje czy z matki na dziecko) i powoduje zapalenie wątroby – większość zainfekowanych osób szybko wraca do zdrowia. Jednak w niektórych przypadkach choroba może przekształcić się w formę chroniczną, która to z kolei może prowadzić do marskości czy nowotworów wątroby, a w konsekwencji – do śmierci<sup>3,4</sup>.

Około 1,3 miliona ludzi zmarło z powodu zapalenia wątroby w 2022 roku, z czego HBV odpowiadało za aż 83% tych zgonów. 250 milionów ludzi na całym świecie żyje z tym wirusem, zmagając się z jego objawami i tylko ok. 3% otrzymało leczenie w tym kierunku. Pomiędzy rokiem 2019 a 2022 zaobserwowano spadek w liczbie nowych zachorowań, co może sugerować, że profilaktyka w postaci szczepień oraz zwiększania dostępności leczenia ma na to duży wpływ<sup>5</sup>, ale nie można też wykluczyć zaniżenia tej liczby ze względu na pandemię SARS-CoV-2.

9 genotypów (od A do I) zostało sklasyfikowanych (z czego kolejny, J, jest nadal przedmiotem rozważań i badań) i część z nich dzieli się na kolejne subgenotypy (Ryc. 1). W zależności od położenia geograficznego, dany genotyp lub subgenotyp może być dominujący lub endemiczny na danym terenie<sup>2,6,7</sup>. Różnią się między sobą natężeniem objawów oraz wysokością ryzyka wystąpienia formy chronicznej – genotypy C, D i F charakteryzują się większym ryzykiem marskości i nowotworów wątroby niż genotypy A i B<sup>8</sup>.

#### 4.1.3. Genom

Genom wirusa HBV ma długość około 3200 par zasad i zawiera cztery otwarte ramki odczytu. Nić matrycowa (o ujemnej polarności) obejmuje całą długość genomu i pełni funkcję matrycy do transkrypcji wirusowych białek. Z kolei nić kodująca (o dodatniej polarności) obejmuje jedynie około 2/3 całego genomu i zawiera oligomer pochodzący z końcowego odcinka 5' pregenomowego RNA (pgRNA)<sup>1,9</sup>. W cyklu replikacji powstają cztery transkrypty, z których każdy kończy się w tym samym punkcie sygnałem dla poliadenylacji<sup>1,10,11</sup>. Pierwszy informacyjny RNA (ang. messenger RNA, mRNA) koduje małe lub średnie białko powierzchniowe (sHBsAg (S) lub mHBsAg (M)), kolejny pre-sHBsAg, czyli duże białko powierzchniowe (IHbsAg (L)), trzeci – białko kapsydowe (HBcAg), białko HBeAg i pregenomowe RNA oraz ostatni – białko HBx. pgRNA ponadto pełni funkcję matrycy do translacji polimerazy (która zawiera aktywność odwrotnej transkryptazy) oraz syntezy wirusowego DNA<sup>12,13</sup>.

#### 4.1.4. Budowa

Wirus HBV ma wielkość ok. 42 nm (tzw. cząsteczka Dane'a). Na zewnątrz znajduje się osłonka złożona z białek oraz lipidów<sup>14</sup>.

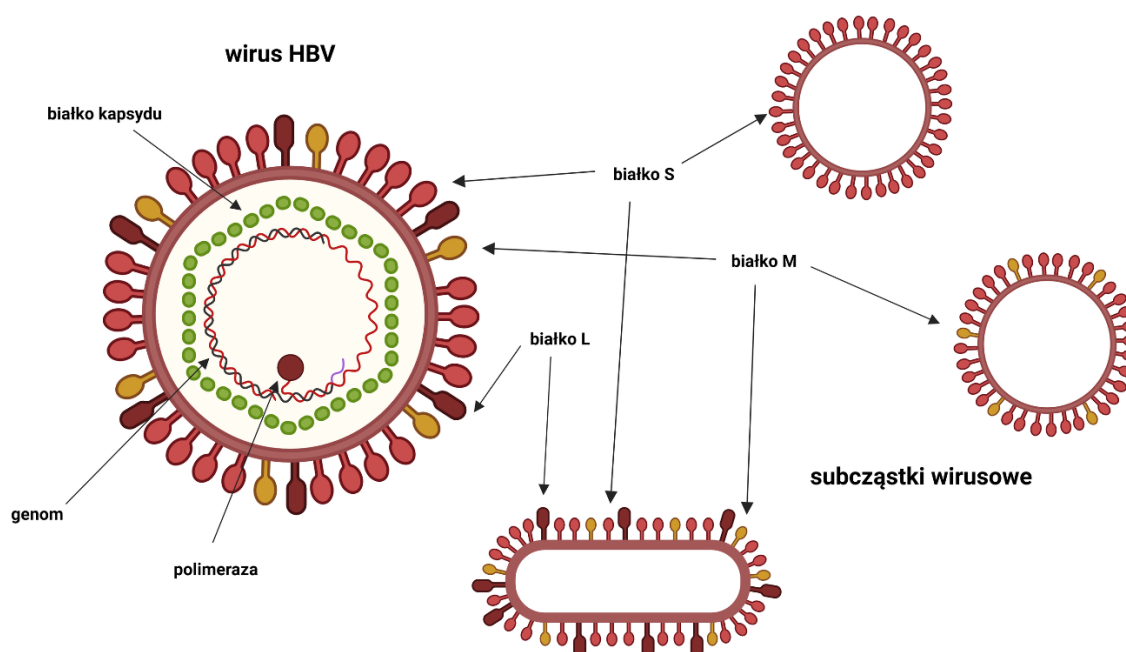
Osłonka zawiera trzy formy białka powierzchniowego (HBsAg): duże, średnie i małe (Ryc. 2)<sup>15</sup>. Wszystkie te białka zawierają w swojej sekwencji małe białko powierzchniowe (sHBsAg, 226 aminokwasów<sup>16</sup>) oraz miejsce N-glikozylacji (Asn146), co zwiększa też masę sHBsAg z 24 na 27 kDa. Białko M zawiera dodatkowe miejsce glikozylacji w pozycji Asn4, które jednak nie jest dostępne w formie L – z powodu lokalizacji cytozolowej. Niektóre genotypy zawierają miejsca dla O-glikozylacji. Białko M jest acetylowane na N-końcu, natomiast L jest mirystylowane<sup>1</sup>. Wspólną częścią dla wszystkich białek powierzchniowych jest również pętla antygenowa pomiędzy resztami 99 a 169<sup>17</sup>. W jej rejonie znajduje się również główny region antygenowy (region pomiędzy resztami 124 a 147), zwany również determinantą a<sup>18,19</sup>. Znajduje się tutaj już wcześniej wspomniane miejsce glikozylacji – jego brak nie ma wpływu na stabilność czy składanie się cząstki, jednakże blokuje uwalnianie wirusa z komórek<sup>16</sup>. Zmiany w sekwencji HBsAg, skutkujące np. powstaniem nowego miejsca glikozylacji prowadzą do powstawania mutantów, które mogą być słabiej rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące<sup>20,21</sup>.

W środku osłonki znajduje się dwudziestościenny kapsyd złożony z zazwyczaj 120 dimerów białka kapsydowego (HBcAg) o symetrii T = 4 – *in vivo* obserwuje się również występowanie kapsydów złożonych z 90 dimerów (o symetrii T=3)<sup>22,23</sup>. Chroni on materiał genetyczny w postaci częściowo dwuniciowego DNA (dsDNA). Nić matrycowa dsDNA jest kowalencyjnie połączona na końcu 5' z polimerazą<sup>12</sup>. Białko kapsydowe składa się z dwóch domen: domeny strukturalnej (ok. 150 aminokwasów) i domeny bogatej w argininy (ang. arginine-rich domain, ARD) na C-końcu o długości ok. 33 aminokwasów – razem 183 aminokwasy, prowadzące do produkcji białka o wielkości 21 kDa. Domena na C-końcu nie jest konieczna do składania się kapsydów, natomiast odgrywa kluczową rolę podczas pakowania pgRNA. Domena ARD zawiera trzy kluczowe seryny, które są fosforylowane poprzez kinazy komórkowe<sup>24,25</sup>. Motywy SPRRR (Ser-Pro-Arg-Arg-Arg) zawarte w tej domenie oraz proces fosforylacji mają duży wpływ na specyficzne pakowanie pgRNA oraz późniejszą syntezę genomowego DNA<sup>26–28</sup>.

Białko HBeAg jest białkiem niestrukturalnym, uwalnianym na zewnątrz komórek podczas infekcji. Uważa się, że odpowiada za modulację odpowiedzi immunologicznej. Ponadto dowiedziono, iż chroni ono zainfekowane hepatocyty przed apoptozą, co może prowadzić do powstania formy chronicznej zakażenia<sup>29</sup>.

Polimeraza wirusa HBV, o wielkości ok. 90 kDa, zawiera trzy domeny funkcjonalne: domena końcowa (ang. terminal protein, TP) odpowiedzialna za rozpoczynanie syntezy na nici DNA o ujemnej polarności; odwrotna transkryptaza odpowiadająca za syntezę DNA; RNAza H mająca za zadanie degradację pgRNA po przepisaniu na DNA. Oprócz domen funkcjonalnych, obecna jest również czwarta domena – łącznik. Nie ustalono nadal, czy pełni jakąś funkcję. Odwrotna transkryptaza jest bardzo specyficzna względem matrycy – tylko cząstki zawierające sekwencję pakującą  $\epsilon$  na końcu 5' pgRNA mogą związać enzym<sup>1,16</sup>.

Ostatnim białkiem jest stosunkowo słabo poznane białko HBx o długości 154 aminokwasów (aa), bardzo ważne podczas infekcji. Akumuluje się ono w cytoplazmie i mitochondriach. Kieruje przepływem jonów wapnia, co ma wpływ na regulację transkrypcji genomu HBV<sup>30,31</sup>.

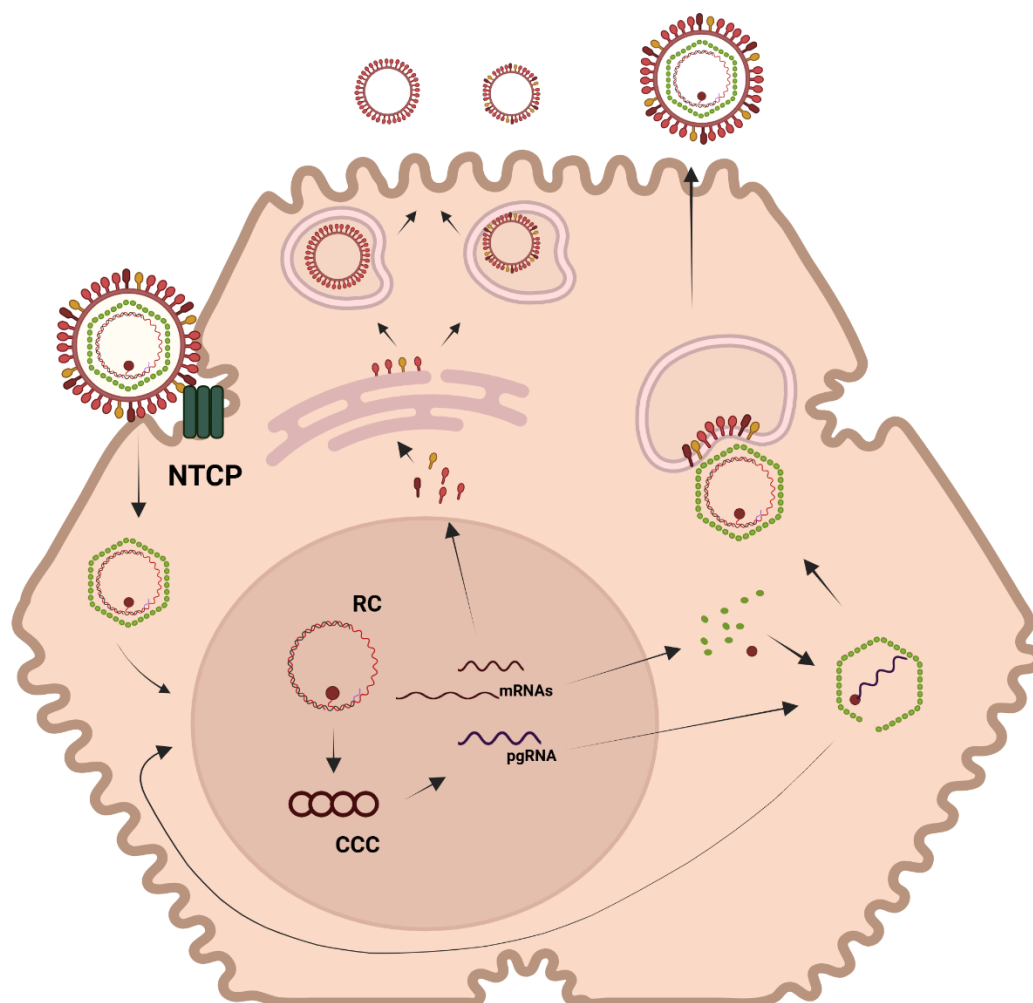


Ryc. 2 Budowa wirusa HBV oraz subcząstek wirusowych. Pełny wirion HBV ma około 42 nm średnicy, natomiast subcząstki wirusowe – ok. 22 nm.

#### 4.1.5. Cykl replikacyjny

Wirus HBV infekuje komórki wątroby, natomiast dokładne etapy infekcji nie są nadal całkowicie poznane. W związku z tym początkowo jedynie pierwotne kultury hepatocytów czy linia komórkowa HepaRG mogły być używane jako model do infekcji tym wirusem. Dowiedziono jednak, iż domena pre-S1 (N-terminalna domena białka L) odgrywa ważną rolę podczas wiązania się wirusa z receptorem na powierzchni komórek wątroby, kotransporterem taurocholenu sodu (NTCP)<sup>32–36</sup>. To odkrycie umożliwiło stworzenie linii komórkowych HepG2 czy Huh7.5

z nadprodukcją receptora NTCP jako nowych modeli komórkowych do badania HBV<sup>34,35</sup>. Wnikanie wirionów do wnętrza hepatocytu prawdopodobnie zachodzi za sprawą endocytozy<sup>37</sup>. Po internalizacji wirusa kapsyd zostaje uwolniony z osłonki i jest transportowany ku jądro komórkowemu. Potem kapsyd ulega degradacji i uwalnia genom, który jest zmieniany z formy luźnej kołowej (ang. relaxed circular, RC) do kowalencyjnie kołowej zamkniętej (ang. covalently closed circular, CCC)<sup>24,38</sup>. Z formy CCC powstają transkrypty z czapeczką na końcu 5', które potem służą do produkcji m.in. białek strukturalnych oraz pgRNA – które to zostanie potem zapakowane do nowo powstających kapsydów<sup>39</sup>.



Ryc. 3 Cykl replikacyjny wirusa HBV. Wirus wnika do hepatocytów z udziałem receptora NTCP i po transporcie genomu do jądra zachodzi transkrypcja. Następnie zachodzi translacja i pakowanie pgRNA do kapsydu; po przepisaniu pgRNA na DNA, kapsyd zostaje opłaszczony i uwolniony z komórki. Oprócz pełnych wirionów powstaje dużo pustych subcząstek wirusowych.

pgRNA posiada na końcu 5' jedną sekwencję  $\epsilon$  o strukturze pętli, do której wiąże się wirusowa polimeraza, co daje sygnał do rozpoczęcia pakowania tych kompleksów do kapsydów<sup>40</sup>. Wewnątrz nich pgRNA jest przepisywane na formę RC<sup>41</sup>; złożone kapsydy z genomem wirusa są następnie albo transportowane w kierunku jądra komórkowego, gdzie ponownie przechodzą opisany wyżej cykl, lub są opłaszczane przez białka powierzchniowe i uwalniane na zewnątrz komórek gospodarza<sup>24,38</sup>. Obecność DNA wewnątrz kapsydu pozwala na interakcję z białkami ostonki, głównie z białkiem L – same białka S i M nie posiadają zdolności do translokacji kapsydów z DNA przez błony komórkowe<sup>41,42</sup>. Opłaszczanie wirionu zachodzi prawdopodobnie w ciałkach wielopęcherzykowych (ang. multivesicular bodies, MVPs). Powstawanie subcząstek niezawierających kapsydów jest niezależne od MVPs i zachodzi w szorstkiej siateczce śródplazmatycznej oraz w aparacie Golgiego, po czym subcząstki te są kierowane do sekrecji na zewnątrz komórki<sup>1,43</sup> (Ryc. 3).

W czasie infekcji powstaje również duża liczba wspomnianych już wcześniej subcząstek wirusowych o wielkości ok. 22 nm<sup>44</sup>. Złożone są one głównie z podjednostek małego białka powierzchniowego HBV z dodatkiem lipidów (stosunek białka do lipidów 60:40)<sup>15</sup>. Ponadto występują też pałeczkowate struktury w kształcie filamentów, złożone ze wszystkich trzech form białka powierzchniowego (Ryc. 2)<sup>24</sup>. Liczba sferycznych subcząstek podczas infekcji przewyższa o kilka rzędów wielkości liczbę infekcyjnych wirionów – zakłada się, iż subcząstki maskują wirusa przed układem immunologicznym<sup>45</sup>.

#### 4.1.6. Szczepionki przeciwko HBV

Pierwsze szczepionki przeciwko HBV opierały się na surowicach pochodzących z zainfekowanych osób. Surowice te zawierały duże ilości cząstek złożonych z sHBsAg i były inaktywowane z użyciem wysokiej temperatury lub formaliny<sup>46</sup>. Wadami tego podejścia były duże koszty produkcji oraz obawy przed możliwością zakażenia innym patogenem, jeśli proces oczyszczania cząstek nie byłby w pełni efektywny<sup>47</sup>.

W 1986 wprowadzono na rynek pierwsze szczepionki (Recombivax-HB i Engerix-B) oparte na rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych (ang. virus-like particles, VLPs). Rekombinowane białko sHBsAg nadprodukowano w drożdżach, oczyszczono i użyto jako immunogen<sup>48,49</sup>. Użycie systemu drożdżowego pozwalało na uzyskanie dużej ilości rekombinowanego białka, co stanowiło ważny krok w historii szczepionek<sup>50</sup>. Po zaszczepieniu zaobserwowano duże ilości wytworzonych przeciwciał, w tym też neutralizujących, które efektywnie chronią przed wirusem HBV – poziom wzbudzonej odpowiedzi był podobny

do poziomu odpowiedzi immunologicznej po zastosowaniu szczepionki wywodzącej się z surowic<sup>51</sup>.

Obecnie szczepionka nadal jest produkowana w drożdżach lub systemie ssaczym (linia CHO). W przypadku tego drugiego systemu VLPs zbudowane są z dodatkowych białek powierzchniowych oraz występują częściowo w formach glikozylowanych, lepiej naśladując natywnego wirusa i efektywniej wzbudzając odpowiedź immunologiczną<sup>52</sup>.

#### 4.1.7. Stabilność VLPs opartych na HBsAg

VLPs oparte na sHBsAg (sHBsAg-VLPs) formują oktaedryczne struktury<sup>22</sup> i wykazują się dużą tolerancją na warunki środowiskowe – w roztworach wodnych zachowują swoją morfologię i właściwości przez wiele miesięcy przechowywania w temperaturze 4°C<sup>53</sup>. Zmienne stężenie soli, inne pH czy dodatek środków denaturujących (jak mocznik) nie są w stanie rozłożyć tych VLPs na mniejsze podjednostki<sup>54–57</sup> – dopiero użycie detergentu (np. Triton X-100) oraz czynnika redukującego (np. DTT) pozwoliło na efektywną zmianę morfologii i zniszczenie wewnętrznych oddziaływań stabilizujących całą strukturę<sup>56</sup>. Może to być związane z faktem, iż cząstki nie są zbudowane jedynie z podjednostek białka, ale zawierają również lipidy. Z kolei kapsydy oparte na np. HBcAg są o wiele prostszym modelem do badania rozkładania i ponownego składania się cząstek – zazwyczaj czynnik denaturujący w postaci GdnHCl czy mocznika w odpowiednim stężeniu jest wystarczający, aby rozbić je na mniejsze podjednostki<sup>58,59</sup>. Stabilność cząstek opartych na sHBsAg jest głównie regulowana poprzez mostki disiarczkowe oraz oddziaływania hydrofobowe, co ma również wpływ na późniejsze właściwości immunogenne<sup>60</sup>.

sHBsAg-VLPs wyprodukowane w komórkach ssaczych CHO w formulacji szczepionkowej z dodatkiem adiuwantu wodorotlenku glinu mogą być przechowywane przez długi czas w temperaturze 4°C, nie tracąc swoich właściwości immunogennych<sup>53</sup>.

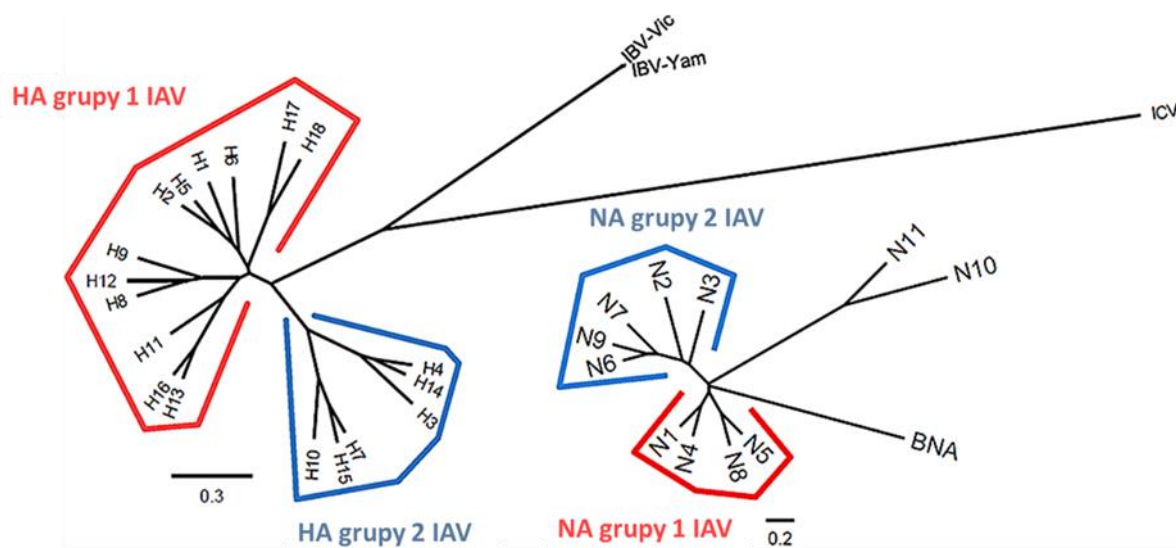
## 4.2. Wirus grypy typu A

### 4.2.1. Taksonomia

Wirus grypy typu A (ang. Influenza A virus, IAV) należy do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Alphainfluenzavirus*<sup>1,61</sup>.

Wirus ten dzieli się na kilka podtypów ze względu na kombinacje hemaglutyniny i neuraminidazy – do tej pory zidentyfikowano i opisano 18 podtypów hemaglutyniny (HA) oraz 9 podtypów

neuraminidazy (NA)<sup>62</sup>. Ponadto zarówno hemaglutyniny, jak i neuraminidazy dzielą się na 2 linie, o różnym stopniu podobieństwa (Ryc. 4).



Ryc. 4 Drzewa filogenetyczne hemaglutynin i neuraminidaz wirusa grypy typu A (zaadaptowano na podstawie Jang *et al.*<sup>63</sup>).

#### 4.2.2. Epidemiologia

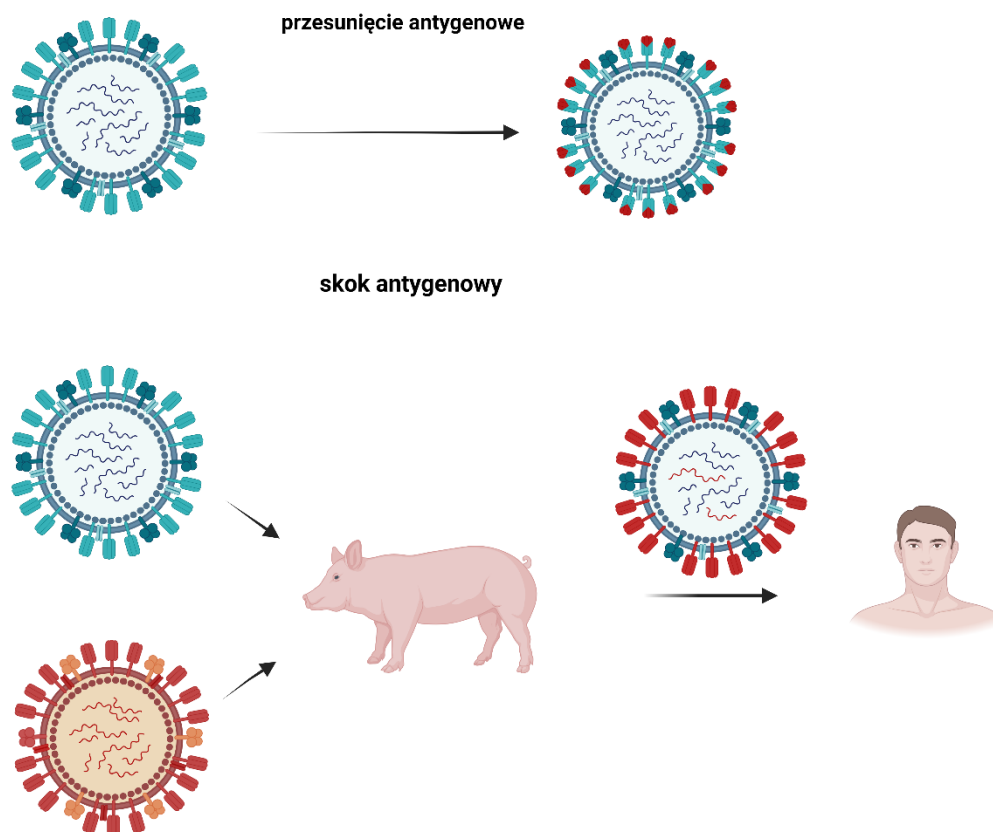
Do rodziny *Orthomyxoviridae* należą również wirusy grypy typu B, C i D. Wirusy grypy typu A i B infekują ludzi i mogą powodować epidemie, typu C – u ludzi powodują rzadkie, lekkie infekcje, a typu D – infekują głównie zwierzęta hodowlane<sup>64</sup>.

Wirus grypy typu A przenosi się drogą kropelkową i bardzo szybko się rozprzestrzenia, powodując epidemie i pandemie. Infekuje nie tylko ludzi, ale też np. ptaki, psy czy świnie. Okres inkubacji wirusa to około od 1 do 4 dni<sup>65</sup>, a objawami infekcji są nagła gorączka, katar, kaszel oraz bóle mięśni – gorączka ustępuje po kilku dniach, natomiast osłabienie czy kaszel nadal mogą występować przez kolejne tygodnie. W zależności od podtypu, ilość i natężenie konkretnych objawów mogą się różnić. Zmiany chorobowe lokalizują się głównie w górnych partiach układu oddechowego.

W wyniku infekcji mogą także rozwinąć się poważniejsze choroby bezpośrednio związane z wirusem lub powikłania mające związek z nadkażeniami bakteryjnymi, które są trudniejsze w leczeniu i bardziej długotrwałe.

Miano wirusa u zainfekowanej osoby przeważnie rośnie bardzo szybko, ze szczytem ok. 2-3 dnia, a potem równie szybko spada i wirus jest niewykrywalny po ok. 6-8 dniach od momentu infekcji<sup>66</sup>.

Historycznie, epidemie grypy wybuchały kilka razy – najbardziej znanym przykładem jest tzw. grypa hiszpanka (1918-1919), która zabiła więcej osób (ok. 40-50 milionów) niż poprzedzająca ją pierwsza wojna światowa<sup>67,68</sup>. Podtypem wywołującym hiszpankę był H1N1. Kolejne pandemie w latach 1957-1958 (podtyp H2N2) i 1968-1969 (podtyp H3N2) swój początek miały w południowych Chinach i przyczyniły się do śmierci ok. 1-4 milionów osób w każdej z tych fali. W latach 2009-2010 miejsce miała pandemia tzw. świńskiej grypy (podtyp H1N1), która doprowadziła do śmierci ok. 100-400 tys. osób<sup>69</sup>, w szczególności u osób poniżej 65 roku życia. Każdego roku notuje się fale zakażeń wirusem grypy – obserwuje się ok. 1 miliard przypadków rocznie, z czego 3-5 milionów manifestuje ciężki obraz choroby i około 290-650 tys. ludzi umiera wskutek chorób układu oddechowego powiązanych z zachorowaniem na grypę<sup>67</sup>. Wysoka różnorodność genetyczna wirusa grypy sprawia, iż ciężko jest przewidzieć, który podtyp w danym sezonie może być najgroźniejszy. Bardzo duża zmienność jest powodowana przesunięciem antygenowym oraz skokiem antygenowym (Ryc. 5). Przesunięcie antygenowe to akumulacja pojedynczych mutacji w genach kodujących glikoproteiny powierzchniowe – hemaglutyniny oraz neuraminidazy. W efekcie przeciwciała wytworzone już wcześniej (za sprawą uprzedniej infekcji lub szczepienia) nie są w stanie rozpoznać danego wirusa grypy i go zneutralizować. Skok antygenowy ma miejsce w momencie, gdy zachodzi wymiana jednego lub więcej segmentów genetycznych (zazwyczaj kodujących białka HA i NA) podczas infekcji przynajmniej dwoma różnymi podtypami IAV, co skutkuje całkowitą zmianą danego antygeny i powstaniem odrębnego antygenowo nowego podtypu<sup>70</sup>. Mutacje prowadzą do stopniowej akumulacji zmian genetycznych w dłuższym okresie czasu, natomiast reasortacja (odpowiedzialna za skoki antygenowe) może skutkować nagłymi, skokowymi przekształceniami genomu, przyspieszającymi tempo ewolucji wirusa i powstawaniem nowych niebezpiecznych szczepów<sup>71</sup>.



Ryc. 5 Mechanizmy zmienności wirusa grypy – przesunięcie antygenowe oraz skok antygenowy.

#### 4.2.3. Genom

Wirus grypy typu A posiada 8 segmentów RNA o ujemnej polarności kodujących 10 głównych białek: 3 podjednostki polimerazy (PB2, PB1 oraz PA), hemaglutyninę, nukleoproteinę (NP), neuraminidazę, białko rdzenia (M1), białko błonowe (M2), białko niestrukturalne 1 (NS1) oraz białko eksportu jądrowego/niestrukturalne 2 (NEP/NS2). Jednakże, w ostatnich latach pojawiły się doniesienia, iż w wyniku alternatywnego splicingu powstają jeszcze co najmniej 3 inne białka: PB1-F2, PB1-N40 i PA-X<sup>72</sup>.

Na obu końcach każdego segmentu znajdują się konserwowane sekwencje niekodujące. Na jednym z końców wirusowego RNA (vRNA) znajduje się sygnał do poliadenylacji w postaci sekwencji poli(U) o długości 5-7 urydyn. Ponadto, poszczególne segmenty vRNA zawsze są otoczone podjednostkami nukleoproteiny (tworząc wirusowe rybonukleoproteiny, vRNP) i połączone z kompleksem polimerazy<sup>73</sup>.

#### 4.2.4. Budowa

Wirion wirusa grypy typu A ma około 80-120 nm średnicy<sup>74</sup> i przedstawiono go schematycznie na Rycinie 6. Występuje on również w formie filamentów o szerokości 100 nm i długości ok. 2-20  $\mu\text{m}$ <sup>75</sup>. Na powierzchni znajduje się osłonka lipidowa z glikoproteinami: hemaglutyniną, neuraminidazą i białkami błonowymi.

Hemaglutynina znajduje się na powierzchni wirusa grypy i zajmuje ok. 80% jej powierzchni<sup>76</sup>. Ma za zadanie związać się z resztą kwasu sialowego receptora na powierzchni komórki gospodarza. W zależności od preferowanego gospodarza, podtyp infekujący ludzi wiąże się zazwyczaj poprzez wiązanie  $\alpha 2,6\text{Gal}$ , a podtyp infekujący ptaki – poprzez wiązanie  $\alpha 2,3\text{Gal}$ <sup>1</sup>. W formie natywnej HA tworzy formy trimeryczne. HA składa się z ewolucyjnie konserwowanej nóżki (która zawiera większość sekwencji HA2) oraz domeny główki (sekwencja HA1), która podlega dynamicznym zmianom za sprawą przesunięcia antygenowego i może nie być rozpoznawana przez wcześniej wytworzone przeciwciała neutralizujące<sup>77,78</sup>.

Neuraminidaza jest drugą glikoproteiną wirusa grypy, formującą tetramery. Posiada silnie konserwowaną domenę cytoplazmatyczną, hydrofobową domenę przezbłonową oraz domeny nóżki i główki. Rolą tego białka jest cięcie enzymatyczne reszty kwasu sialowego w celu uwolnienia nowopowstałych wirionów od komórki gospodarza<sup>62</sup>. Brak tej aktywności prowadzi do akumulacji wirionów potomnych na powierzchni zainfekowanych komórek. Dodatkowo NA umożliwia cięcie reszt kwasu sialowego w mucynie, dzięki czemu wirus może przedostać się do powierzchni komórki nabłonkowej<sup>1</sup>. Przeciwciała wytworzone przeciwko NA nie mają takiego samego potencjału neutralizującego jak przeciwciała przeciwko HA – mogą natomiast blokować namnażanie się wirusa. Uważa się też, że wysokie miano przeciwciał przeciwko NA koreluje ze zmniejszonym natężeniem infekcji i szybszym powrotem do zdrowia<sup>79</sup>.

Białko M2 jest tetramerycznym białkiem błonowym o długości 97 aa. Posiada aktywność kanału jonowego i odgrywa ważną rolę podczas uwalniania rybonukleoprotein z wnętrza wirionu w endosomie – przez M2 do środka wirionu wnikają protony. Zmiana środowiska na kwaśne powoduje oddysocjowanie białek M1 od vRNP<sup>75</sup>.

Wewnątrz wirusa znajduje się strukturalne białko rdzenia M1, które to otacza wirusowe rybonukleoproteiny<sup>80</sup>. Jednym z zadań M1 jest pobudzanie do pączkowania wirusa z komórki gospodarza, a kolejnym – kontrola transportu vRNP wewnątrz komórki. Zmiany w sekwencji M1 mogą mieć wpływ na morfologię wirionu<sup>80,81</sup>.

Nukleoproteina, o wielkości ok. 56 kDa, jest białkiem bogatym w argininy i posiada wypadkowy ładunek dodatni, przez co ma silne powinowactwo do vRNA<sup>1</sup>. Dowiedziono, iż nawet w kompleksie z podjednostkami nukleoproteiny vRNA jest wrażliwe na RNAzę, co wskazuje, że RNA jest raczej wyeksponowane na zewnątrz, niż upakowane wewnątrz oligomeru NP<sup>74</sup>. W swojej strukturze nukleoproteina zawiera sekwencję bogatą w argininy, która odpowiada za wiązanie RNA<sup>82</sup>.

Kompleks polimerazy RNA zależnej od RNA składa się z trzech białek: PB1, PB2 oraz PA. PB1 katalizuje reakcję dodawania kolejnych nukleotydów do wydłużającej się nici RNA oraz wiąże terminalne końce vRNA i komplementarnego RNA (cRNA) w celu inicjacji transkrypcji i replikacji<sup>1,83</sup>. PB2 odgrywa ważną rolę podczas inicjacji transkrypcji – ma za zadanie związanie czapeczki

z pre-mRNA gospodarza. Trzeci komponent, białko PA, posiada aktywność endonukleazy, dzięki której możliwe jest stworzenie oczapieczkowanego startera do inicjacji transkrypcji<sup>84</sup>.

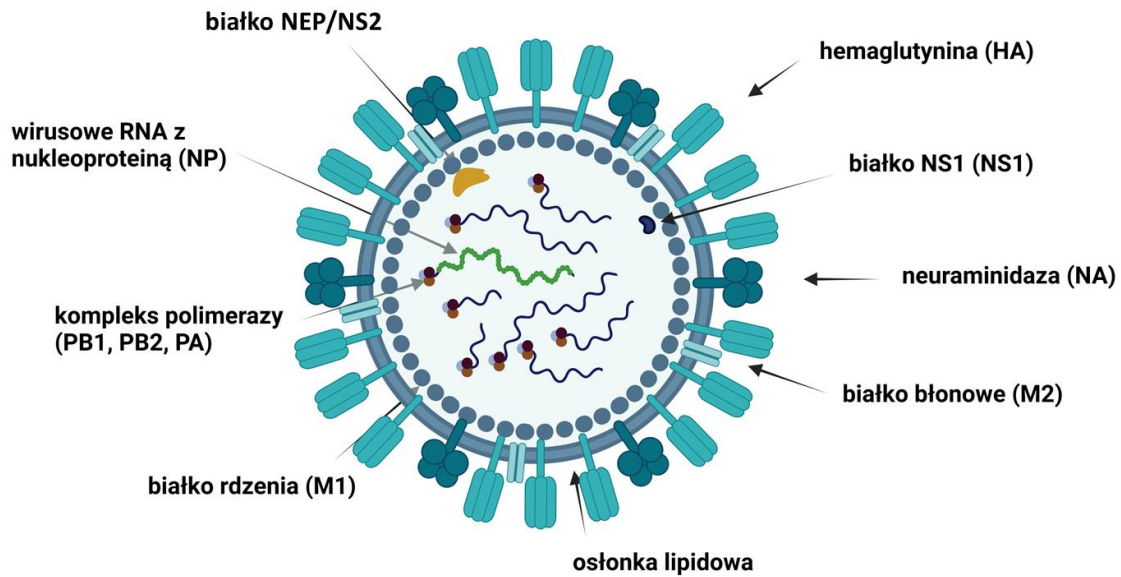
Białko NS1 jest białkiem o lokalizacji jądrowej, tworzącym dimery i zawierającym domenę do wiązania dwuniciowego RNA (dsRNA). Jednym z jego głównych zadań jest blokowanie produkcji interferonu, przez co wirus może nie zostać rozpoznany w początkowej fazie infekcji przez mechanizmy odpowiedzi immunologicznej<sup>85</sup>. Ponadto, NS1 utrudnia ekspresję genów gospodarza poprzez ingerencję w procesowaniu końców 3' mRNA gospodarza<sup>86</sup>, przez co nie mogą być one transportowane do cytoplazmy w celu translacji.

Białko NEP/NS2, nieśluszone uważane początkowo za białko niestrukturalne, odpowiada za transport wirusowych rybonukleoprotein do cytoplazmy komórki<sup>87,88</sup>.

PB1-F2 powstaje na drodze translacji z alternatywnej ramki odczytu w segmencie kodującym PB1. Białko to odpowiada za modulację odpowiedzi immunologicznej na infekcję wirusem grypy typu A i jest jednym z czynników wirulencji tego wirusa. Jego aktywność, w zależności od podtypu wirusa, może powodować śmierć komórek układu odpornościowego<sup>89</sup>.

PB1-N40 jest kolejnym białkiem powstającym na bazie segmentu kodującego PB1, tylko skróconym o 39 aa na N-końcu. Nie została poznana jeszcze dokładna funkcja tego białka, jednak jego zwiększona produkcja w sytuacji braku PB1-F2 może prowadzić do zatrzymania replikacji wirusa. Co ciekawe, utrata PB1-NP40 również ma niekorzystny wpływ na replikację wirusa<sup>90,91</sup>.

PA-X powstaje z alternatywnej ramki odczytu dla białka PA i ma aktywność endorybonukleazy, która powoduje degradację cząsteczek mRNA gospodarza, podczas gdy wirusowy mRNA i jego genom nie są degradowane<sup>92,93</sup>.



Ryc. 6 Budowa wirusa grypy typu A.

#### 4.2.5. Cykl replikacyjny

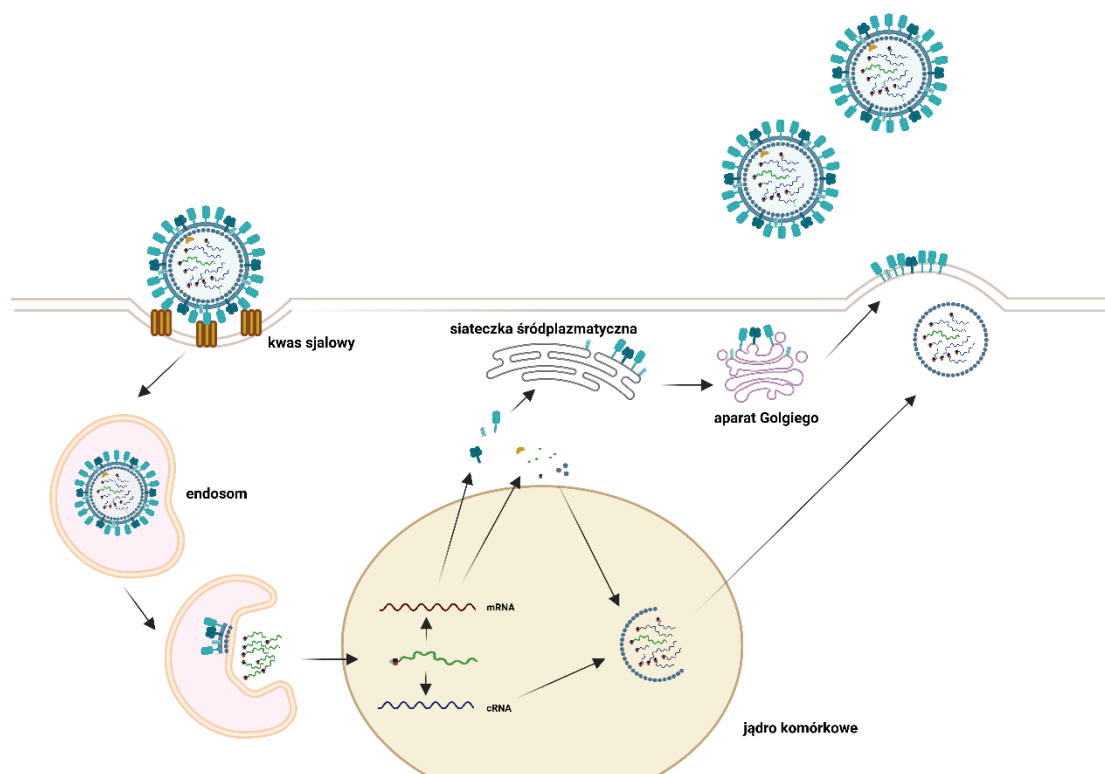
Wirus grypy typu A u ludzi replikuje się tylko w powierzchniowych komórkach nabłonka układu oddechowego, ale może też infekować komórki dendrytyczne i makrofagi płucne. Wiąże się do reszt kwasu sialowego na powierzchni komórki gospodarza za pomocą hemaglutyniny przy niskim pH i na drodze endocytozy jest wchłaniany do wnętrza (Ryc. 7). Następnie za sprawą niskiego pH w endosomie następuje fuzja osłonki wirusa i błon endosomu poprzez cięcie w strukturze hemaglutyniny (HA0) na dwie podjednostki, HA1 i HA2, co powoduje prezentację peptydu fuzyjnego i zmiany konformacyjne w strukturze antygeny. Kolejno, rybonukleoproteiny zostają uwolnione z wirionu i są transportowane do jądra komórkowego. Genomowe RNA o ujemnej polarności jest przepisywane na cząsteczki mRNA, z których powstają białka wirusowe oraz na cRNA służące do replikacji wirusa<sup>94</sup>. Transkrypcja vRNA do mRNA rozpoczyna się od związania białka PB2 z czapeczką znajdującą się na końcu 5' pre-mRNA gospodarza. Kolejno ta czapeczka, wraz z ok. 10-13-nukleotydowym fragmentem pre-mRNA, jest odcinana przez białko PA (zazwyczaj po zasadzie purynowej<sup>1</sup>) i jest wykorzystywana jako starter do inicjacji transkrypcji<sup>84</sup>.

W początkowej fazie powstaje najwięcej mRNA kodującego białko NP oraz NS1, natomiast synteza nici mRNA dla HA, NA i M1 jest opóźniona. Po translacji podjednostki nukleoproteiny oraz białka kompleksu polimerazy są transportowane do jądra i tworzą kompleksy z vRNA. Białka M1 oraz NEP/NS2 biorą udział w transporcie tych kompleksów na zewnątrz jądra<sup>1</sup>. HA, NA oraz M2 po translacji oraz dodaniu modyfikacji lokalizują się w strefie wierzchołkowej błony komórkowej,

gdzie kierowane są kompleksy M1 z vRNP. W tym miejscu wirusy odpączkują z komórki gospodarza (w formie sferycznej lub filamentów) – za pomocą neuraminidazy następuje cięcie w miejscu wiązania reszt kwasu sialowego z wirusowymi hemaglutyninami i wiriony zostają całkowicie uwolnione z powierzchni komórki<sup>94</sup>.

Nie do końca jeszcze poznano mechanizm, w którym poszczególne segmenty vRNA są pakowane do wirionów tak, aby wewnątrz cząstek znajdował się pełen genom wirusa. Sugeruje się, iż każdy segment zawiera unikalne sekwencje pakujące i w ten sposób nowopowstałe wiriony zawierają pełną informację genetyczną<sup>95</sup>.

Do namnażania wirusa grypy typu A aktualnie używa się kurzych zarodków czy linii komórkowych takich jak MDCK (komórki nabłonkowe psiej nerki)<sup>96</sup>, Vero E6 (komórki nabłonkowe nerki afrykańskiej małpy zielonej) czy PER.C6 (komórki ludzkiej siatkówki)<sup>97</sup>.



Ryc. 7 Replikacja wirusa grypy typu A.

#### 4.2.6. Szczepionki na grypę

Obecnie stosowane szczepionki przeciwko ludzkiej grypie mogą mieć różny charakter: żywe atenuowane, inaktywowane lub rekombinowane. Składają się z antygenów dla dwóch podtypów wirusa grypy typu A: H1N1 i H3N2 oraz antygeny wirusa grypy typu B – są to szczepionki trójwalentne. Trójwalentne, inaktywowane szczepionki są dostępne do użycia dla osób od 6. miesiąca życia, natomiast żywe atenuowane – w USA dla osób zdrowych pomiędzy 2. a 49. rokiem życia oraz dla kobiet niebędących w ciąży. Dostępna jest również szczepionka przeciwko wysoce zjadliwemu ptasiemu wirusowi grypy typu A H5N1 (HPAI H5N1)<sup>1</sup>. Aktualnie najszerzej dostępne na rynku są inaktywowane szczepionki czterowalentne – posiadają one dodatkowy antygen dla wirusa grypy typu B<sup>76</sup>.

Skuteczność obecnych szczepionek przeciwko grypie wynosi od 20 do 60% w zależności od użytej dawki, adiuwantu czy populacji. Ich efektywność jest na odmiennym poziomie ze względu na zróżnicowanie podtypów w danym sezonie – tyczy się to głównie podtypu H3N2. Ochrona wytworzona dzięki szczepieniu przeciwko temu podtypowi jest zazwyczaj najniższa. Dodatkowo, różny stopień odporności u ludzi (wytworzony przez wcześniejszy kontakt z wirusem albo wcześniejsze szczepienie) także może mieć wpływ na końcowy stopień ochrony przed infekcją<sup>98</sup>.

Każdego roku Światowa Organizacja Zdrowia określa, które podtypy mogą być najbardziej groźne w kolejnym sezonie zachorowań. Takie przewidywania są wykonywane na około 6 miesięcy naprzód, więc może się okazać, iż wytypowane szczepy różnią się antygenowo od tych rzeczywiście krążących w populacji<sup>1,99</sup>.

### 4.3. Szczepionki mRNA

#### 4.3.1. Konstrukcja szczepionek mRNA oraz ich zastosowania

Technologia szczepionkowa oparta na informacyjnym RNA w ostatnich latach zyskała dużą popularność i szerokie zastosowanie za sprawą szczepionek przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, którego pandemia rozpoczęła się w 2019 roku. W 2020 roku pierwsze szczepionki oparte na mRNA przeszły pomyślnie testy kliniczne i trafiły do ogólnego użytku<sup>100</sup>. Doniesienia o terapeutycznym zastosowaniu mRNA opisano już ponad 20 lat temu – nagie mRNA lub DNA kodujące odpowiednio acetylotransferazę chloramfenikolu, lucyferazę lub beta-galaktozydazę zostało wszczepione myszom domięśniowo i obserwowano, czy zachodzi produkcja tych białek. Badanie to wykazało, że bezpośrednio wprowadzenie nagiego kwasu nukleinowego, bez wykorzystania lipidowych lub wirusowych nośników, prowadzi do syntezy docelowego białka<sup>101</sup>. Metoda bazująca na mRNA jest

alternatywą dla terapii genowej opartej na DNA, gdzie wymagana jest integracja z genomem komórki, aby później mogła zajść produkcja oczekiwanego białka. mRNA w cytoplazmie jest kierowane do translacji, omijając etap transportu do jądra, integracji, transkrypcji i modyfikacji potranskrypcyjnych (takich jak splicing) – zatem produkcja białek zachodzi o wiele szybciej i jest przejściowa<sup>102</sup>. Celami terapii opartych na mRNA mogą być też nowotwory. Na cząsteczce mRNA znajduje się sekwencja kodująca antygen związany z nowotworem lub swoisty dla niego, która jest potem używana do stymulacji układu immunologicznego, aby wytworzył specyficzną odpowiedź skierowaną przeciwko komórkom nowotworowym<sup>103,104</sup>. Kolejnym celem są też choroby, które wynikają z braku lub niefunkcjonalności któregoś z białek – w takim przypadku z mRNA kodującego np. wazopresynę czy interleukinę 10 powstaje funkcjonalny produkt<sup>105</sup>. Produkcja mRNA w celach szczepionkowych na dużą skalę jest relatywnie o wiele tańsza i mniej czasochłonna niż produkcja preparatów szczepionkowych opartych na rekombinowanych białkach czy inaktywowanych wirusach, przez co stanowi atrakcyjną alternatywę dla nich.



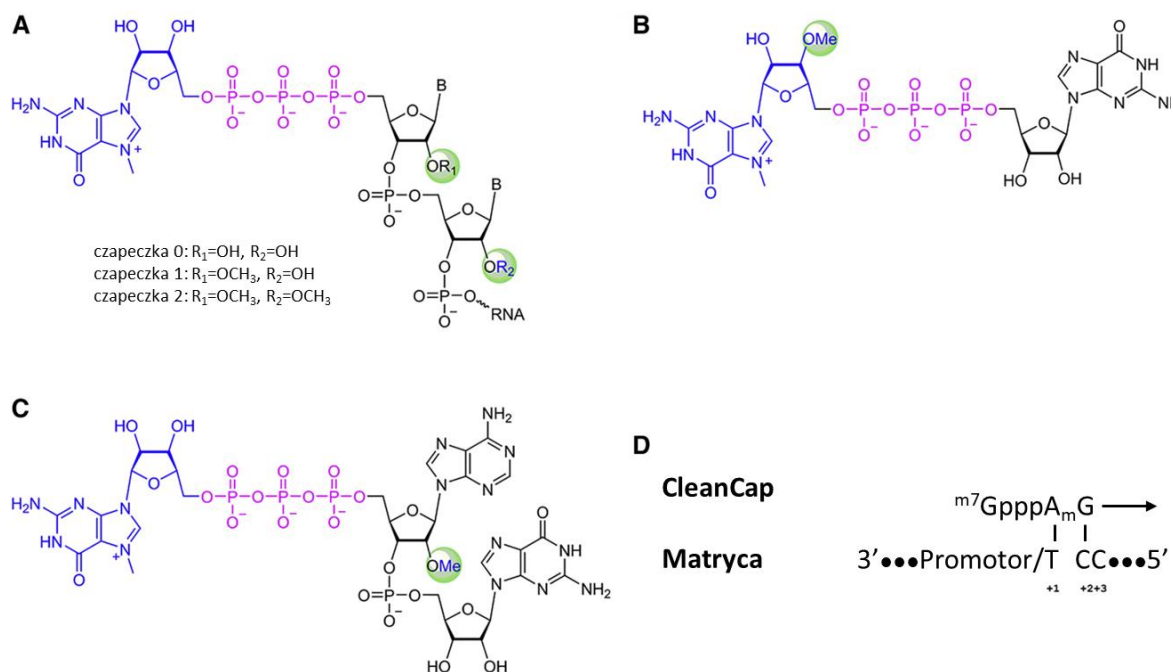
Ryc. 8 Struktura cząsteczki mRNA.

Strukturę cząsteczki mRNA przedstawiono schematycznie na Rycinie 8. Pojedyncza cząsteczka mRNA składa się z czapeczki na końcu 5', której obecność jest konieczna do rekrutacji czynników biorących udział w translacji i rozpoczęcia syntezy białka. Struktura czapeczki (Ryc. 9) może mieć wpływ na poziom translacji i stabilności mRNA. W komórce eukariotycznej każde mRNA posiada czapeczkę – jej brak może stanowić znak dla komórki, iż jest to obcy materiał genetyczny, np. wirusowy, co rozpoczyna kaskadę sygnalizacyjną dążącą do eliminacji obcego czynnika. Dowiedziono też, że metylacja czapeczki w pozycji 2'O jest jednym z głównych czynników rozpoznawczych, czy dana cząsteczka mRNA pochodzi z komórki, czy jest obca<sup>106</sup>. Początkowo używano analogów czapeczek o strukturze  $m^7Gp_3G$  – problemem był jednak fakt, że mogą one być włączane do powstającej nici mRNA w obu orientacjach, co skutkowało produkcją mieszaniny funkcjonalnego i niefunkcjonalnego mRNA<sup>107</sup>. W 2001 roku opisano dinukleotydowy analog czapeczki zapobiegający odwrotnej inkorporacji (ang. anti-reverse cap analogue, ARCA) – posiada on modyfikację  $m^7G$  w pozycji 3'O, dzięki czemu nie może zostać włączony w nieprawidłowy sposób do nowopowstającej nici mRNA<sup>108</sup>. Kolejnym dużym postępem było wprowadzenie czapeczek typu CleanCap przez firmę TriLink Biotechnologies. Jest to trinukleotyd o strukturze  $m^7Gp_3A_mG$ , gdzie

pierwszym transkrybowanym nukleotydem jest adenina, co wymaga również odpowiedniej sekwencji promotora dla polimerazy RNA na matrycy do transkrypcji *in vitro* (IVT). Użycie tej czapeczki skutkuje powstaniem produktu zawierającego ponad 90% oczapieczkowanych transkryptów<sup>109</sup>. Na Rycinie 9 pokazano przykładowe analogi czapek.

Sekwencje niekodujące (ang. untranslated regions, UTR), znajdujące się na obu końcach regionu kodującego (czyli 5' UTR i 3' UTR), odpowiadają za regulację translacji oraz utrzymywanie stabilności cząsteczki mRNA. Najczęściej stosowane w tych miejscach sekwencje pochodzą z wysoce stabilnych regionów niekodujących  $\alpha$ - i  $\beta$ -globiny. Zawierają one liczne motywy strukturalne, które zwiększają stabilność cząsteczki mRNA poprzez wydłużenie jej czasu półtrwania w komórce oraz poprawę wydajności translacji<sup>105</sup>.

Region kodujący zawiera sekwencję ulegającą translacji w komórce. Bardzo ważna jest optymalizacja kodonów, aby proces produkcji białka był jak najbardziej wydajny (pod względem ilości uzyskanego białka oraz czasu, jaki to zajmie). Sprowadza się to do zamiany rzadkich kodonów na synonimiczne, częściej występujące w danym organizmie. Jednakże takie podejście nie zawsze jest najlepsze – są takie białka, które wymagają wolniejszej translacji, żeby mogły uzyskać poprawną konformację<sup>105</sup>.



Ryc. 9 Przykładowe typy czapek mRNA. A – struktura czapeczki eukariotycznej. Obecność danej reszty w danej pozycji wskazuje, czy to jest struktura 0, 1 czy 2. B – czapeczka typu ARCA. C – czapeczka typu CleanCap. D – sekwencja potrzebna na matrycy, aby mogła zajść transkrypcja z czapeczką typu CleanCap AG (zaadaptowano na podstawie Vaidyanathan *et al.*<sup>110</sup>).

Ogon poli(A) reguluje stabilność cząsteczki mRNA oraz wydajność translacji. Wiąże się on do białka PABP (ang. poly adenosyl binding protein), które wchodzi w interakcję z czynnikiem eIF4G. Im więcej białka PABP zostanie związane do ogona poli(A), tym większe jest powinowactwo również związanego do PABP czynnika eIF4E do czapeczki na końcu 5', co w efekcie zwiększa poziom translacji. Optymalna długość ogona poli(A) powinna wynosić ok. 120 nukleotydów<sup>105,111,112</sup>.

#### 4.3.2. Samoreplikujące się RNA

Oprócz konwencjonalnych cząsteczek mRNA, kodujących tylko dany antygen, istnieją również samoreplikujące się RNA (ang. self-amplifying RNA, saRNA). Wykorzystują one genom pochodzący od np. alfawirusów, a najczęściej używanymi są: wirus wenezuelskiego końskiego zapalenia mózgu (ang. Venezuelan equine encephalitis virus, VEEV), wirus Sindbis (ang. Sindbis virus, SINV), czy wirus Lasu Semliki (ang. Semliki Forest virus, SFV). Genom tych wirusów składa się z jednoniciowego, niesegmentowanego RNA o dodatniej polarności. Podzielony jest on na dwie ramki odczytu: pierwsza koduje 4 białka niestrukturalne budujące kompleks replikazy, a druga – białka strukturalne. Kompleks replikazy zawiera 4 podjednostki: pierwsza posiada aktywność dodawania czapeczki; druga – proteazy, helikazy i trifosfatazy RNA; trzecia – odpowiada za interakcje wirus-gospodarz i białko-białko, a czwarta to polimeraza RNA zależna od RNA. W konstrukcjach szczepionkowych opartych na saRNA pierwsza ramka odczytu pozostaje taka sama, natomiast druga jest zamieniana na sekwencję kodującą wybrany antygen. W miejscu UTR używa się konserwowanych elementów sekwencyjnych (ang. conserved sequence elements, CSE) pochodzących z alfawirusa, których obecność zapewnia specyficzną replikację przez polimerazę wirusową. Aby zaszła replikacja subgenomowego RNA (które koduje antygen), potrzebna jest obecność subgenomicznego promotora<sup>113</sup>. Po iniekcji preparatem zawierającym saRNA dochodzi do amplifikacji RNA już wewnątrz komórek. Zaletą takiego podejścia jest mniejsza ilość mRNA potrzebna do wywołania odpowiedzi immunologicznej. W przypadku standardowego mRNA kodującego tylko dany antygen jest to zazwyczaj ok. 30 - 100 µg mRNA na dawkę<sup>114</sup>, natomiast dla saRNA – ok. 1,25 - 5 µg saRNA jest wystarczające na jedną dawkę<sup>114,115</sup>.

#### 4.3.3. Modyfikacje cząsteczek mRNA

Zaletą i jednocześnie wadą technologii opartych na mRNA jest fakt, iż cząsteczki mRNA są stosunkowo szybko degradowane po zejściu translacji. W celu przedłużenia żywotności takich

cząsteczek można zastosować analogi nukleotydów, które sprawiają, iż cząsteczka mRNA sama w sobie będzie mniej immunogenna i nie będzie wzbudzać odpowiedzi zależnej od receptorów typu Toll (ang. Toll-like receptors, TLR). Przykładami takich naturalnych analogów są 5-metylocytozyna (m5C), N6-metyloadenozyna (m6A), pseudourydyna ( $\Psi$ ), 5-metylourydyna (m5U) czy 2-tiolurydyna (s2U). W 2015 roku opublikowano badania pokazujące, że zastosowanie N1-metylo-pseudourydyny (m1 $\Psi$ ) znacznie poprawiło efektywność translacji zarówno, gdy były stosowana samodzielnie, jak i w kombinacji z m5C, w porównaniu do mRNA z m5C i  $\Psi$ <sup>116</sup>. Dowiedziono również, iż użycie m1 $\Psi$  nie zwiększa poziomu niepoprawnej inkorporacji aminokwasów do łańcucha peptydowego – co zachodziło w przypadku stosowania niemodyfikowanej pseudourydyny<sup>117</sup>. Jednakże, użycie m1 $\Psi$  może prowadzić do przesunięcia ramki odczytu o jeden nukleotyd do przodu. Efekt ten jest obserwowany na bardzo niskim poziomie i niekoniecznie wszystkie miejsca, w których został zamieniony nukleotyd są na to podatne. W rezultacie mogą powstawać skrócone (jeśli przez przesunięcie ramki pojawi się przedwcześnie kodon STOP) lub całkowicie inne formy wyjściowego białka – nawet małe zmiany w wyprodukowanym białku mogą mieć wpływ na jego późniejszą immunogenność. Aby przeciwdziałać temu zjawisku, konieczne jest dokładne sprawdzenie produktu uzyskanego ze zmodyfikowanego mRNA i optymalizacja kodonów w sekwencji kodującej, aby jak najbardziej zminimalizować możliwość takich skutków<sup>118–120</sup>.

#### 4.3.4. Nośniki lipidowe

Aby ze szczepionkowego mRNA doszło do translacji białka, cząsteczki mRNA muszą najpierw zostać skutecznie dostarczone do komórek docelowych. Wiele typów komórek jest w stanie pobrać nagie RNA ze środowiska, jednak proces ten jest bardzo nieefektywny i duża część mRNA zostaje zdegradowana. Jedną z metod wprowadzania mRNA, stosowaną w immunoterapii, jest transfekcja wyizolowanych od pacjentów komórek dendrytycznych (*ex vivo*) za pomocą elektroporacji. Natomiast, najbardziej popularnym sposobem dostarczania mRNA *in vivo* jest zastosowanie pozytywnie naładowanych nanocząstek lipidowych (ang. lipid nanoparticles, LNPs), które to opłaszczają mRNA i chronią je przed nukleazami<sup>102,105</sup>. Klasyczne LNPs składają się z czterech komponentów: jonizowalnego aminolipidu, który wiąże kwasy nukleinowe i pomaga uwolnić mRNA z endosomu; amfipatycznego fosfolipidu, którego zadaniem jest związanie z powierzchniami błony komórkowej oraz endosomalnej; cholesterolu, który ma zapewnić stabilność nanocząstki oraz glikolu pegylowanego (PEG) – do polepszenia stabilności układu i zmniejszenia usuwania nanocząstek z układu siateczkowo-śródbłonkowego w organizmie. LNPs

tego typu są bezpieczne i stabilne, jednak ich zastosowanie jest ograniczone głównie do podania domięśniowego – jak miało to miejsce w przypadku szczepionki przeciwko SARS-CoV-2<sup>121,122</sup> – lub dożylnego, jak w przypadku preparatu Onpattro, ukierunkowanego na hepatocyty<sup>123</sup>. Ze względu na swój lipidowy charakter i skłonność do adsorpcji na swojej powierzchni apolipoproteiny E w surowicy, LNPs akumulują się w wątrobie i wnikają tam do hepatocytów. Jednakże nie zawsze taka lokalizacja będzie najodpowiedniejsza dla danego zastosowania terapeutycznego – dlatego też opracowano zmodyfikowane LNPs, które mogą być kierowane do wątroby, płuc, śledziony<sup>122</sup>, neuronów<sup>124</sup> czy komórek dendrytycznych<sup>125</sup>. Bardzo ważnym aspektem projektowania LNPs jest skrupulatna optymalizacja składu ilościowego użytych lipidów – nawet mała zmiana w formulacji może mieć duży wpływ na zachowanie, stabilność oraz późniejszą cytotoksyczność po immunizacji<sup>126</sup>.

#### 4.3.5. Szczepionki przeciwwirusowe mRNA dopuszczone do użytku

Jak już wcześniej wspomniano, pandemia SARS-CoV-2 przyczyniła się do gwałtownego wzrostu ilości badań w kierunku opracowania i wprowadzenia do użytku skutecznej szczepionki bazującej na mRNA. Pierwszymi firmami, które wprowadziły takie szczepionki przeciwko COVID-19, były Pfizer-BioNTech (BNT162b2) i Moderna (mRNA-1273)<sup>127</sup>. Oba koncerny zaproponowały preparaty zawierające cząsteczki mRNA kodujące glikoproteinę powierzchniową (białko kolca, ang. spike, S) w konformacji prefuzyjnej. Różniły się między sobą ilością podawanego mRNA (preparat BNT162b2 – 30 µg, preparat mRNA-1273 – 100 µg), interwałem czasu pomiędzy kolejnymi dawkami (BNT162b2 – 3 tygodnie, mRNA-1273 – 4 tygodnie) oraz składem nanocząstek lipidowych<sup>128</sup>. W badaniach klinicznych przeprowadzonych w 2022 roku stwierdzono, iż obie wykazują się ponad 95% skutecznością w zapobieganiu infekcji<sup>128</sup>. Problemem okazała się jednak bardzo szybka zmienność wirusa SARS-CoV-2. Pojawiły się nowe warianty, różniące się głównie sekwencją i strukturą glikoproteiny S. Prowadziło to do obniżenia skuteczności wcześniej wytworzonych przeciwciał – zarówno poszczepiennych, jak i powstałych w wyniku przebytej infekcji – nie były one w stanie w pełni rozpoznać i skutecznie zneutralizować nowopowstających odmian wirusa. Dane warianty różnią się między sobą objawami oraz szybkością rozprzestrzeniania się, więc szczepionki musiały również być jak najszybciej aktualizowane, aby mogły chronić przed najbardziej dominującym w tym okresie wariantem<sup>129</sup>.

Ze względu na to, iż szczepionki mRNA weszły do szerszego użytku stosunkowo niedawno, nie zbadano jeszcze wszystkich czynników mających wpływ na jej trwałość czy na rodzaj i skuteczność odpowiedzi immunologicznej. W ramach fazy I badań klinicznych użyto 100 µg mRNA

(preparat mRNA-1273) na jedno podanie w schemacie dwudawkowym. Poziom przeciwciał wytworzonych na skutek immunizacji utrzymywał się nadal na wysokim poziomie po 6 miesiącach od zakończenia szczepienia<sup>130</sup>. Z upływem czasu ten poziom zaczyna jednak spadać, przestając chronić przed samą infekcją, ale nadal wykazując ochronę przed ciężkim przebiegiem infekcji i hospitalizacją<sup>131</sup>. Zaproponowano wtedy system dawek przypominających, które mogą przedłużać ochronę zapewnioną przez przeciwciała<sup>132</sup> – te preparaty mogą też zawierać zaktualizowane antygeny, dostosowane do zmieniającego się wciąż wirusa<sup>133</sup>.

Porównano również odpowiedzi immunologiczne wytworzone po szczepieniu (preparat BNT162b2) oraz po przebytej infekcji. Obie ścieżki prowadzą do powstania przeciwciał, jednakże nie znaleziono dowodów na to, aby szczepionka aktywowała ścieżkę sygnalizacyjną do produkcji interferonu<sup>134</sup>. Nie znaczy to jednak, że tylko naturalna infekcja prowadzi do powstania odpowiedzi komórkowej. W 2022 roku dokonano analizy poziomu uwolnionego interferonu gamma (IFN $\gamma$ ) z wyizolowanych od zaszczepionych pacjentów komórek jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cells, PBMC) po stymulacji mieszaninami peptydów mapujących białka wirusa SARS-CoV-2. Dowiedziono, iż aktywacja wydzielania IFN $\gamma$  utrzymuje się przez co najmniej 6 miesięcy<sup>135</sup>. Kolejne badania pokazały, że po 6 miesiącach od szczepienia nadal obecne są limfocyty T swoiste dla SARS-CoV-2 (populacje CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>), które w jednakowym stopniu rozpoznają warianty wirusa SARS-CoV-2 szczególnej uwagi (ang. variants of concern, VOCs)<sup>136</sup>.

W maju 2024 roku amerykańska Agencja Żywności i Leków dopuściła do użytku jednodawkową szczepionkę przeciwko syncytialnemu wirusowi oddechowemu (ang. respiratory syncytial virus, RSV) firmy Moderna dla osób powyżej 60 roku życia<sup>137</sup>. Szczepionka zawiera 50  $\mu$ g mRNA kodującego stabilizowane białko fuzyjne w konformacji prefuzyjnej. Jej zastosowanie w badaniach klinicznych fazy III pokazało, iż zmniejsza występowanie chorób dolnego układu oddechowego związanych z RSV (ponad 80% skuteczności) oraz ciężkiej niewydolności oddechowej powiązanej z RSV (ponad 60% skuteczności)<sup>138</sup>.

#### 4.3.6. Szczepionki mRNA w trakcie badań klinicznych

Ze względu na szybkość produkcji, efektywność oraz możliwość szybkiej modyfikacji, szczepionki na bazie mRNA znalazły również zastosowanie w profilaktyce przed innymi patogenami oraz leczeniu chorób. W Tabeli 1 podsumowano wybrane badania kliniczne ze szczepionkami opartymi na mRNA przeciwko chorobom zakaźnym oraz nowotworom<sup>139,140</sup>.

Tabela 1. Wybrane szczepionki mRNA w badaniach klinicznych (dane na dzień 16.09.2025)

nazwa produktu	numer badania klinicznego	użyty antygen	choroba/ czynnik infekcyjny	faza	droga podania	status badania	sponsor
<b>choroby zakaźne</b>							
mRNA-1893	NCT04917861	białka strukturalne wirusa Zika	wirus Zika	II	I.M.	zakończono	Moderna
mRNA-1647	NCT05085366	6 cząsteczek mRNA kodujących glikoproteinę B oraz pentameryczny kompleks glikoprotein	cytomegalowirus (CMV)	III	I.M.	w trakcie	Moderna
BNT161 (modRNA)	NCT05540522	hemaglutyniny wirusa grypy typu A H1N1, H3N2 oraz typu B linii Victoria i Yamagata <sup>141</sup>	wirus grypy typu A i B	III	I.M.	zakończono	BioNTech –Pfizer
BNT162b2 + BNT161	NCT06178991	stabilizowane białko S o pełnej długości; czterowalentna szczepionka bazująca na rekomendowanych podtypach szczepionkowych dla grypy A i B na sezon 22/23 dla produkcji opartej na białkach rekombinowanych	SARS-CoV-2, wirus grypy typu A i B	III	I.M.	zakończono	BioNTech –Pfizer
mRNA-1273	NCT06585241	stabilizowane białko S o pełnej długości, wariant B.1.351	SARS-CoV-2 wariant B.1.351	IIIb/4	I.M.	w trakcie	Moderna
BNT165e	NCT06069544	pełne białko circumsporozytowe i dwie konserwowane sekwencje kodujące białka zarodźca sierpowego produkowane na etapie wątroby	malaria	I/II	I.M.	w trakcie	BioNTech
BG505 MD39.3; BG505 MD39.3 gp151; BG505 MD39.3 gp151 CD4KO	NCT05217641	trimer białka powierzchniowego Env	HIV	I	I.M.	w trakcie	NIAID
ARCT-2303*	NCT06279871	białko S, wariant XBB.1.5; kombinacja z czterowalentną licencjonowaną szczepionką przeciwko grypie typu A i B	SARS-CoV-2 wariant XBB.1.5, wirus grypy typu A i B	III	I.M.	zakończono	Arcturus Therapeutics, Inc.

nowotwory							
BNT122	NCT03815058	20 neoantygenów specyficznych dla pacjenta	czerniak	II	I.V.	zakończono	BioNTech–Genentech
mRNA-4157	NCT03897881	do 34 neoantygenów specyficznych dla pacjenta	czerniak	II	I.M.	w trakcie	Moderna–Merck
BNT111	NCT04526899	mieszanina czterech antygenów związanych z czerniakiem (NY-ESO-1, MAGE-A3, tyrozynaza i TPTE) <sup>142</sup>	czerniak	II	I.V.	w trakcie	BioNTech
BI 1361849 (CV9202)	NCT03164772	Antygeny NY-ESO-1, MAGE C1, MAGE C2, TPBG (5T4), surwiwina, MUC1	niedrobnokomórkowy rak płuca	I/II	I.D.	zakończono	CureVac, Ludwig Institute for Cancer Research

\* – szczepionka oparta na saRNA

I.M. – szczepienie domięśniowe; I.V. – szczepienie dożylnie; I.D. – szczepienie śródskórne

Obecnie, jednym z głównych kierunków badań jest poszukiwanie uniwersalnej szczepionki na grypę. Wysokie tempo zmienności genomu tego wirusa prowadzi do powstawania nowych podtypów, które mogą być niewrażliwe lub słabo reagować z już wytworzonymi przeciwciałami (za sprawą przebytej infekcji lub szczepienia). Obiecującym podejściem jest użycie nie jednego, a mieszaniny kilku antygenów – w 2020 roku zaproponowano użycie mieszaniny mRNA (łącznie 5 µg) kodujących aż 4 antygeny wirusa grypy typu A H1N1: nóżkę hemaglutyniny, neuraminidazę, nukleoproteinę oraz białko błonowe M2 (z małą delecją w celu zmniejszenia potencjalnej cytotoksyczności). Dwudawkowa immunizacja myszy takim preparatem wywołała odpowiedź humoralną przeciwko każdemu z wymienionych antygenów na poziomie porównywalnym do odpowiedzi wytworzonej w przypadku immunizacji tylko jednym z nich<sup>143</sup>. Dwa lata później przedstawiono wyniki dla bardzo podobnego eksperymentu – zmieniony został jednak podtyp wirusa na H3N2, aby sprawdzić, czy zostanie wytworzona analogiczna odpowiedź przeciwko wirusom grypy typu A grupy 2. Wytworzona odpowiedź ochroniła myszy przed śmiercią po zakażeniu wybranymi szczepami podtypów H3N2, H4N6 i H7N9, cztery tygodnie po immunizacji<sup>144</sup>. Te i pochodzące z badań klinicznych wyniki potwierdzają zasadność stosowania heterologicznych mRNA w jednej dawce.

## 4.4. Szczepionki oparte na cząstkach wirusopodobnych

### 4.4.1. Budowa i rodzaje

Cząstki wirusopodobne jako struktury naśladujące natywne wirusy oferują atrakcyjną alternatywę dla atenuowanych lub inaktywowanych szczepionek, ponieważ nie zawierają materiału genetycznego wirusa. VLPs oparte są zazwyczaj na białkach powierzchniowych lub kapsydowych<sup>145</sup>. Jednymi z pierwszych dokładnie zbadanych i opisanych VLPs były właśnie cząstki oparte na małym białku powierzchniowym HBV, wyizolowane z surowicy pacjentów zainfekowanych wirusem zapalenia wątroby typu B w 1968 roku<sup>146</sup>. VLPs wybranych wirusów zebrano w Tabeli 2. Cząstki wirusopodobne są wysoce immunogenne – zawierają w swojej strukturze białka w odpowiedniej konformacji i powtarzalnym ułożeniu, co stymuluje limfocyty T i B. W zależności od typu VLPs, mogą być one produkowane w różnych systemach – od bakteryjnego po ssaczy<sup>147</sup>. Głównym kryterium wyboru takiego systemu jest zazwyczaj zdolność do dodawania modyfikacji potranslacyjnych, np. jak glikozylacja i fosforylacja, które to mogą bardzo wpływać na potencjalną immunogenność produktu końcowego. Ze względu na strukturę, VLPs można podzielić na dwie grupy: składające się z podjednostek pojedynczego białka oraz na takie składające się z dwóch lub większej liczby rodzajów białek. Dodatkowo mogą posiadać też osłonkę lipidową, która również wpływa na immunogenność. Do VLPs zbudowanych z pojedynczego rodzaju białka bez osłonki można zaliczyć cząstki oparte na kalciwirusach, papillomawirusach (np. wirus brodawczaka ludzkiego, HPV) czy parwowirusach. Na bazie reowirusów (do których należą rotawirusy) czy wirusa polio można wyprodukować wielobiałkowe cząstki bez osłonki<sup>148</sup>. Cząstki z osłonką lipidową mogą składać się z podjednostek jednego białka – np. dla HBV<sup>149</sup> lub z kilku – np. dla wirusa grypy typu A. Wielobiałkowe VLPs mogą również składać się z różnych wariantów tego samego białka, oferując szerszą gamę epitopów, na przykład VLPs składające się z białek kapsydowych L1 dwóch czy nawet dziewięciu typów wirusa HPV<sup>148,150</sup>.

Ciekawym kierunkiem badań wydają się również być nanocząstki oparte na białku NP wirusa grypy typu A – dodatek domeny oligomeryzującej skutkuje powstaniem cząstek składających się z siedmiu podjednostek białka NP. Kandydat ten jest obecnie w fazie II badań klinicznych. Wyniki udostępnione przez firmę Osivax są obiecujące<sup>151,152</sup> i planowane są kolejne badania (faza IIb).

Tabela 2. Wybrane cząstki wirusopodobne<sup>145</sup>

nazwa wirusa	białka składowe	białko kapsydowe/osłonkowe	system produkcji	źródło
HBV	sHBsAg	osłonkowe	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Pichia pastoris</i> , <i>Hansenula polymorpha</i> (drożdże)	153
HBV	sHBsAg i mHBsAg	osłonkowe	CHO (linia ssacza)	153
Wirusy grypy typu A (H1N1, H3N2) Wirus grypy typu B	HA, M1, NA	osłonkowe	Spodoptera frugiperda (Sf9, linia owadzia)	154
Wirus grypy typu A H5N1	NP, M1 i nóżka HA w fuzji z zewnątrzkomórkowymi domenami M2	osłonkowe	Sf9	155
HPV	Duże białko kapsydowe (L1) 9 typów	kapsydowe	<i>S. cerevisiae</i> (drożdże)	156
HPV	Duże białko kapsydowe (L1) 2 typów	kapsydowe	<i>Trichoplusia ni</i> (linia owadzia)	157
HIV	Białka Env i Gag	osłonkowe i kapsydowe	HEK 293T	158
Norowirusy ludzkie GI.1 i GII.4	Białko VP1	kapsydowe	Sf9	159
Wirus mozaiki lucerny (AIMV)	Białko kapsydowe (CP) AIMV w fuzji z Pfs25 ( <i>Plasmodium falciparum</i> – zarodziec malarii)	kapsydowe	<i>Nicotiana benthamiana</i> (roślina)	160

Innym obiecującym podejściem jest jednoczesna modyfikacja wnętrza i powierzchni cząstek VLPs. W 2023 roku opublikowano badania opisujące platformę opartą na białku kapsydowym wirusa HBV, do sekwencji którego wprowadzono znacznik SpyTag. Dodatkowo dokonano fuzji sekwencji kodującej białko kapsydowe z genami kodującymi białko zielonej fluorescencji lub drożdżową deaminazę cytozynową. Tak zmodyfikowane białka kapsydowe produkowano w komórkach bakteryjnych jednocześnie, co umożliwiło kontrolowane wbudowywanie różnych komponentów do nowo powstających cząstek oraz ich samoorganizację w funkcjonalne, modułowe VLPs już na tym etapie. Dodatek znacznika SpyTag umożliwił później kowalencyjne wiązanie z białkiem SpyCatcher sprzężonym z ligandem specyficznym dla receptora EGFR, co pozwoliło na celowane dostarczanie modułowych VLPs do komórek nowotworowych. Z kolei deaminaza cytozynowa umożliwiła wewnątrzkomórkową konwersję dostarczonego dodatkowo proleku do aktywnej postaci leku (5-fluorocytozyny do 5-fluorouracylu), co skutkowało zwiększoną cytotoxycnością w badanych komórkach nowotworowych. Takie rozwiązanie łączy precyzyjne celowanie komórkowe z kontrolowaną aktywacją leku, stanowiąc obiecujące podejście terapeutyczne w onkologii<sup>161</sup>.

#### 4.4.2. Modyfikacje cząstek wirusopodobnych opartych na sHBsAg

Cząstki wirusopodobne nie muszą składać się wyłącznie z niezmodyfikowanych białek. Chimeryczne VLPs są częstym obiektem obecnych badań – mogą one prezentować antygeny pochodzące z innych źródeł, takich jak np. fragmenty innych białek wirusowych, bakteryjnych czy neoantygenów. Heterologiczne epitopy czy antygeny mogą być wprowadzone do sekwencji białek tworzących VLPs za pomocą substytucji czy insercji wewnątrz takowego białka. Dodatkowo, możliwe jest ich umieszczenie na jednym z końców białka albo trwałe, kowalentne połączenie za pomocą specjalnych sekwencji<sup>148</sup>. Przykładowe możliwe modyfikacje VLPs opartych na sHBsAg opisano w Tabeli 3.

Tabela 3. Modyfikowane cząstki wirusopodobne oparte na sHBsAg

Modyfikacja	Jednostka chorobowa	System produkcji	Źródło
Insercja epitopu neutralizującego do determinanty a	polio	mysie komórki L	162
Insercja epitopu z E2 wirusa HCV do determinanty a	HCV	Huh7	163
Fuzja C-terminalna z białkiem gp120	HIV	CV-1	164
Insercja epitopów CTL z białka M1 wirusa grypy typu A w rejonach pętli cytozolowych	Wirus grypy typu A	HEK293T	165
Insercja C-terminalnej domeny KatA do determinanty a	<i>Helicobacter pylori</i>	Huh7	166
Fuzja N-terminalna ze skróconym białkiem circumsprozoitowym	malaria	<i>P. pastoris</i>	167
Fuzja N-terminalna z białkiem EDIII	Denga	<i>P. pastoris</i>	168
Insercja epitopu z białka E2 do determinanty a	Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)	<i>Leishmania tarentolae</i>	169
Dodanie kolejnego miejsca glikozylacji w pozycji 116	HBV	HEK FreeStyle-293F	170
Insercja epitopu p*17 Strep A do determinanty a	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Strep A)	HEK293T	171

#### 4.4.3. Szczepionki oparte na VLPs dopuszczone do użytku

Pierwsza szczepionka oparta na cząstkach wirusopodobnych została dopuszczona do użytku w USA w 1986 – Recombivax-HB, wyprodukowana przez firmę Merck<sup>172</sup>. W tym samym roku w Belgii dopuszczono do użytku szczepionkę Engerix-B firmy GlaxoSmithKline<sup>173</sup> (w USA została ona dopuszczona w 1989 roku)<sup>172</sup>. Obie były skierowane przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. W Tabeli 4 zebrano wybrane preparaty szczepionkowe oparte na VLPs, które są dopuszczone do użytku.

Tabela 4. Dopuszczone do użytku szczepionki oparte na cząstkach wirusopodobnych<sup>153,174,148</sup>

Czynnik infekcyjny	Nazwa handlowa	Antygen	System ekspresji	Firma
HBV	Recombivax-HB	sHBsAg	<i>S. cerevisiae</i>	Merck
HBV	Engerix-B	sHBsAg	<i>S. cerevisiae</i>	GSK
HBV	Fendrix	sHBsAg	<i>S. cerevisiae</i>	GSK
HBV	Hepelisav-B	sHBsAg	<i>H. polymorpha</i>	Dynavax
HBV	Hepavax-Gene	sHBsAg, mHBsAg	<i>H. polymorpha</i>	Crucell
<i>P. falciparum</i> (malaria)	Mosquirix™*	Fuzja N-terminalna sHBsAg z białkiem circumsprozoitowym	<i>S. cerevisiae</i>	GSK
HPV	Cervarix	białko kapsydowe L1	<i>T. ni</i>	GSK
HPV	Gardasil9®	białko kapsydowe L1	<i>S. cerevisiae</i>	Merck

\* – dopuszczona do użytku w trzech krajach afrykańskich

VLPs mają potencjał do wzbudzenia większej odpowiedzi układu immunologicznego niż szczepionki podjednostkowe ze względu na powtarzalną prezentację epitopów, nawet bez użycia adiuwantów<sup>173</sup>. Są rozpoznawane przez obecne na powierzchni komórek dendrytycznych receptory rozpoznające wzorce (ang. pattern recognition receptors, PRR) i internalizowane. Następnie antygeny pochodzące z VLPs są prezentowane limfocytom T pomocniczym (CD4<sup>+</sup>) przez ścieżkę prezentacji antygeny poprzez MHC klasy II. Limfocyty CD4<sup>+</sup> uwalniają interleukiny 4 i 5 (konieczne do aktywacji limfocytów B) czy interleukinę 2 i IFN $\gamma$  (konieczne do indukcji odpowiedzi komórkowej). Niektóre VLPs mogą być również prezentowane krzyżowo na cząsteczkach MHC klasy I – przez udział cząsteczek współkostymulujących takich jak CD40 czy CD80/86 może zajść aktywacja limfocytów T cytotoksycznych (CD8<sup>+</sup>). Ponadto, VLPs stymulują limfocyty B do produkcji przeciwciał poprzez interakcję z receptorami znajdującymi się na powierzchni tych komórek. Przeciwciała wytworzone w wyniku tej reakcji mogą mieć właściwości neutralizujące. Szczepionki Engerix, Cervarix i Gardasil9 indukują powstanie dużej ilości takich przeciwciał, które utrzymują się przez długi czas w organizmie<sup>148</sup>.

#### 4.4.4. Wybrane szczepionki oparte na VLPs w trakcie badań klinicznych

Oprócz dostępnych już na rynku preparatach opartych na cząstkach wirusopodobnych przeciwko np. wirusom HBV, HPV i malarii, prowadzi się wiele badań nad szczepionkami chroniącymi przed innymi chorobami – wybrane z nich zostały przedstawione w Tabeli 5.

Tabela 5. Wybrane szczepionki oparte na VLPs w badaniach klinicznych (dane na dzień 16.09.2025)

nazwa produktu	numer badania klinicznego	użyty antygen	Choroba/czynnik infekcyjny	faza	droga podania	status badania	sponsor
PXVX0317 <sup>175</sup>	NCT06007183	VLPs złożone z białek E1, E2 i C CHIKV	wirus chikungunya (CHIKV)	IV	I.M.	w trakcie	Bavarian Nordic
Quadrivalent VLP Influenza Vaccine	NCT03321968	HA z H1N1, H3N2, B/Victoria i B/Yamagata <sup>176</sup>	wirusy grypy typu A i B	III	I.M.	zakończone	Medicago*
RH5.2-VLP	NCT05978037	HBsAg-SpyCatcher: RH5.2-SpyTag	malaria	I/II	I.M.	w trakcie	University of Oxford
rNV-2v	NCT05508178	VP1 genotypów GI.4 i GII.4	norowirus GI.4 i GII.4	I	I.M.	zakończone	Icon Genetics GmbH
IVX-A12	NCT05664334	pre-F RSV i pre-F hMPV	RSV i hMPV	I	I.M.	zakończone	Icosavax, Inc.
CoVLP	NCT04636697	Białko S	SARS-CoV-2	II/III	I.M.	zakończone	Medicago*

I.M. – szczepienie domięśniowo

\* – produkcja w roślinach; firma zakończyła swoją działalność<sup>177</sup>

## 5. Cele pracy

Cząstki subwirusowe oparte na sHBsAg od wielu lat są używane jako szczepionka przeciwko wirusowi HBV. Charakteryzuje się ona wysoką skutecznością i wywoływaniem długotrwałej odpowiedzi immunologicznej. Dowiedziono również, iż w ramach sekwencji białka sHBsAg można wprowadzać zmiany, które nie mają wpływu na składanie się go w formy cząstek, a ponadto złożone później cząstki mogą prezentować epitopy pochodzące z innych patogenów.

Jak już wspomniano w podrozdziale 4.2.6, skuteczność obecnie dostępnych szczepionek przeciwko grypie waha się pomiędzy 20 a 60%. Wymaga to kolejnych badań w kierunku nowych kandydatów szczepionek, które mogłyby oferować szeroką ochronę przeciwko wielu szczepom wirusa grypy typu A (i również B). Technologia oparta na mRNA wyróżnia się licznymi zaletami – do najważniejszych należą szybkość całego procesu, niższe koszty produkcji w porównaniu ze szczepionkami białkowymi, a także możliwość szybkiego dostosowania preparatu do aktualnie dominujących wariantów wirusa.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było otrzymanie preparatu szczepionkowego łączącego w sobie cząstki wirusopodobne oparte na sHBsAg oraz mRNA kodujące nukleoproteinę wirusa grypy typu A i ocena skuteczności takiej dwuwalentnej szczepionki.

Aby osiągnąć założony cel, praca została podzielona na następujące etapy badawcze:

- opracowanie i optymalizacja metody oczyszczania sHBsAg-VLPs z systemu bakulowirusowego z użyciem znacznika Twin-Strep-tag,
- zbadanie potencjału sHBsAg-VLPs jako platformy do prezentacji sekwencji funkcjonalnych mających za zadanie wiązanie mRNA,
- ocena możliwości tworzenia kompleksów sHBsAg-VLPs–mRNA,
- analiza odpowiedzi immunologicznej wywołanej przez mieszaniny zawierające VLPs i mRNA.

## 6. Materiały i aparatura

### 6.1. Sekwencje genów syntetycznych

**sHBsAg** – sekwencja kodująca dla białka sHBsAg wirusa HBV subtypu adw2 o numerze AF397207.1

**HBcAg** – sekwencja kodująca dla białka HBcAg wirusa HBV subtypu adw2 o numerze AAK97202.1

**Twin-Strep-tag-linker-EK** – sekwencja kodująca znacznik, łącznik oraz sygnał dla enterokinazy, odpowiadająca po translacji za sekwencję: MGSWSHPQFEKGGGSGGGSGGSAWSHPQFEK-GGGSDYKDDDDK-; użyta do składania konstruktów Twin-Strep-tag-sHBsAg (TS-sHBsAg)

**IVT GG** – konstrukt do transkrypcji *in vitro*, zawierający gen białka EGFP (białko zielonej fluorescencji) z plazmidu pEGFP-N3, 3' UTR dla  $\beta$ -globiny *Xenopus laevis* (pochodzący z plazmidu pT7TS) i ogon poli(A) o długości 128 adenin

**NP** – sekwencja kodująca białko NP wirusa grypy typu A H5N1 o numerze AJ289873.2 w fuzji z łącznikiem -GGGG- i znacznikiem His-tag

### 6.2. Sekwencje starterów

Tabela 6. Sekwencje starterów użytych do wklonowania wstawki kodującej sHBsAg do wektora pFastBac1 (pFastBac-sHBsAg)

nazwa startera	sekwencja
F BamHI	AATATAGGATCCATGGAAAACATTGCCTCTGGCC
R XbaI	GTTAGCTCTAGACTAGATGTACACCCACAGGC

Tabela 7. Sekwencje starterów użytych do składania konstruktów TS-sHBsAg

nazwa startera		sekwencja
Plazmid pFastBac-sHBsAg	F	ATGGAAAACATTGCCTCTGGCCTG
	R	GGATCCGCGCCCGATGGT
Fragment Twin-Step-tag-linker-EK	F	CCACCATCGGGCGCGGATCCATGGGCAGCTGGAGCCAC
	R	CCAGAGGCAATGTTTTCCATTTATCGTCATCGTCTTTGTAGTCGGAAC

Tabela 8. Sekwencje starterów użytych do mutagenyzy miejscowo-insercyjnej na konstrukcie kodującym TS-sHBsAg

konstrukt	starter	sekwencja
capmut1	F	CCCTCGCAGGCGGCGTTGCCTGGGCCAGAATTCTC
	R	CTCCGGCCGCGCCTGCGCCACCAGCTGTCCAGGCT
capmut2	F	CCCTCGCAGGCGGCGTAGCCTGTACAACATTCTG
	R	CTCCGGCCGCGCCTGCGCAGCCACACTGTAGGAGA

capsub1	F	AGGAGCCAGAGCAGGGAGAGCCAGTGCGGCAGCGGCAGCTGGATGTGCCTGCGGCGG
	R	CCTCCTCCTGCTCTGGCTCCTCCTCTGGGGTGGGGGTCCGCTGCGAGGGCTCCG
capins1	F	AGGAGCCAGAGCAGGGAGAGCCAGTGCGGCAGCGGCAGCTGCCTGGGCCAGAATTCTCAGAGCC
	R	CCTCCTCCTGCTCTGGCTCCTCCTCTGGGGTGGGGGTACGCCGCTGCGAGGGCT

Tabela 9. Sekwencje starterów użytych do mutagenazy miejscowo-insercyjnej dla konstruktów do transkrypcji *in vitro* z sekwencją sygnałową wirusa HBV (PS) i CleanCap AG (AG)

konstrukt	starter	sekwencja
GG PS	F	GGGAGGAGTTGGGGGAGGAGCCCGCGCCGCATGGTGAGCA
	R	AGTCTTTAAACAAACCCAAAACCTCTCCCTATAGTGAGTCGTATTACGC
AG	F	ACTCACTATAAGGAGAGCGGC
	R	CGTATTACGCCGGATGGA
AG PS	F	ACTCACTATAAGGAGAGGGTTTTG
	R	CGTATTACGCCGGATGGA

### 6.3. Plazmidy

**pJET 1.2/blunt** (Thermo Fisher Scientific, USA) – wektor użyty jako szkielet do wklonowania konstruktów do IVT, wybrany ze względu na obecność promotora dla polimerazy RNA faga T7

**pFastBac1** (Thermo Fisher Scientific, USA) – wektor donorowy używany do wprowadzania genów do bakmidu

### 6.4. Szczepy bakteryjne

***Escherichia coli* NEB stable** F' *proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15 zsf::Tn10 (Tet<sup>R</sup>)/Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (Str<sup>R</sup>) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (New England Biolabs, USA)*

***Escherichia coli* Mach1** F- *φ80lacZΔM15 ΔlacX74 hsdR(rK-, mK+) ΔrecA1398 endA1 tonA* (ThermoFisher Scientific, USA)

***Escherichia coli* MAX Efficiency™ DH10Bac** F- *mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK λ-rpsL(StrR) nupG/pMON14272/pMON7124* (Thermo Fisher Scientific, USA)

## 6.5. Linie komórkowe eukariotyczne

**Sf9** – linia owadzia wyprowadzona z jajnika ćmy *Spodoptera frugiperda* (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Sf9 ET** – Sf9 Easy Titer; linia owadzia Sf9, zawierająca kasetą ekspresyjną z genem kodującym EGFP pod kontrolą promotora polihehdrynowego; używana do wyznaczania miana bakulowirusów (kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych)

**HEK293T** – linia ssacza komórek ludzkich, wyprowadzona z embrionalnych komórek nerki, zawierająca antygen T wirusa SV40 (kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych)

**Vero E6** – linia ssacza komórek pochodzenia nabłonkowego z nerki afrykańskiej małpy zielonej (kolekcja Zakładu Szczepionek Rekombinowanych)

## 6.6. Pożywki wzrostowe dla bakterii

### **Pożywka wzrostowa płynna LB**

Bacto-trypton 10 g; ekstrakt drożdżowy 5 g; chlorek sodu 10 g; składniki zostały rozpuszczone i dopełnione wodą destylowaną do 1 litra objętości i wyjałowione

### **Pożywka wzrostowa stała LA**

Bacto-trypton 10 g; ekstrakt drożdżowy 5 g; chlorek sodu 10 g; bacto-agar 15 g; składniki zostały rozpuszczone i dopełnione wodą destylowaną do 1 litra objętości i wyjałowione

## 6.7. Pożywki wzrostowe dla komórek eukariotycznych

**Podłoże wzrostowe DMEM** (ang. Dulbecco's Modified Eagle Medium) z dodatkiem glukozy, L-glutaminy i HEPES, 42430025 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Podłoże wzrostowe Opti-MEM** (ang. Opti-Minimal Essential Medium), 31985070 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Podłoże wzrostowe RPMI 1640** (ang. Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) z dodatkiem L-glutaminy i HEPES, 22400089 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**SF-900 III**, 12658027 (Thermo Fisher Scientific, USA)

## 6.8. Dodatki używane przy hodowli komórek eukariotycznych

**Mieszanina antybiotyków Pen Strep (100x)** – zawiera penicylinę i streptomycynę, 15070063 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Mieszanina antybiotyków AA** (100x) – zawiera penicylinę, streptomycynę i amfoterycynę B, 15240096 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Inaktywowana surowica bydlęca** (ang. fetal bovine serum, FBS), A5670801 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Trypsyna-EDTA** (0,25%), 25200072 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Genetycyna** (G418), 10131027 (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Betamerkaptoetanol** (50 mM), 31350010 (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### 6.9. Odczynniki laboratoryjne

**$\alpha$ P<sup>32</sup> UTP**, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml (Hartmann Analytic, Niemcy)

**Adiuwant AddaVax** (InvivoGen, Francja)

**Agaroza** (VWR, Polska)

**Ampicylina** (A&A Biotechnology, Polska)

**APS** (Bio-Rad, USA)

**Bacto-agar** (Biocorp, Polska)

**Bacto-trypton** (Biocorp, Polska)

**Betamerkaptoetanol** (Sigma-Aldrich, USA)

**Błękit bromofenolowy** (Sigma-Aldrich, USA)

**Błękit trypanowy** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**BSA** (Sigma-Aldrich, USA)

**CHAPS** (Sigma-Aldrich, USA)

**Chlorek magnezu** (MgCl<sub>2</sub>, Carl Roth, Niemcy)

**Chlorek sodu** (NaCl, POCH, Polska)

**Chlorek wapnia** (CaCl<sub>2</sub>, Thermo Fisher Scientific, USA)

**Chlorowodorek guanidyny** (GdnHCl, Sigma-Aldrich, USA)

**Coomassie Blue R-250** (Bio-Rad, USA)

**Cytrynian sodu** (Polskie Odczynniki Chemiczne, Polska)

**Czapeczka ARCA** 3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G (New England Biolabs, USA)

**Deoksycholan sodu** (NaDC, Sigma-Aldrich, USA)

**DMSO** (IWTReagents, Niemcy)

**DTT** (BioShop, Kanada)

**EDTA** (Sigma-Aldrich, USA)

**Ekstrakt drożdżowy** (A&A Biotechnology, Polska)

**Etanol** (POCH, Polska)

**Gentamycyna** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Glicerol** (POCH, Polska)

**Glicyna** (POCH, Polska)

**HEPES** (Sigma-Aldrich, USA)

**Imidazol** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Inhibitory proteaz wolne od EDTA** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**IPTG** (A&A Biotechnology, Polska)

**Kanamycyna** (BioShop, Kanada)

**Konkanawalina A** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Kwas 2-morfolinoetanosulfonowy** (MES, Sigma-Aldrich, USA)

**Kwas octowy** (POCH, Polska)

**Kwas siarkowy (IV)** (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, STANLAB, Polska)

**Lipid 18PA** (ang. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphate (sodium salt)) (MedChemExpress, USA)

**Lipid 4A3-SC8** (MedChemExpress, USA)

**Lipid cholesterol** (MedChemExpress, USA)

**Lipid DMG-PEG** (ang. 1,2-dimyristoyl-rac-glycero-3-methoxy(poly(ethylene glycol)) (MedChemExpress, USA)

**Lipid DOPE** (ang. 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine) (MedChemExpress, USA)

**Metanol** (STANLAB, Polska)

**Mieszanina poliakrylamidów 30%** (Serva, Niemcy)

**N1-metylo-pseudourydyna** (m1 $\Psi$ , TriLink Biotechnologies, USA)

**Nonidet-P40** (Fluka AG, Szwajcaria)

**Octan sodu** (Sigma-Aldrich, USA)

**Octan uranylu** (CHMES, Polska)

**SDS** (Carl Roth, Niemcy)

**SimplySafe** (EurX, Polska)

**Tabletki PBS pH 7.4** (Carl Roth, Niemcy)

**TEMED** (Sigma-Aldrich, USA)

**Tetracyklina** (Biosynth, Szwajcaria)

**Tiocyanian guanidyny** (GdnSCN, Sigma-Aldrich, USA)

**Tris** (Sigma-Aldrich, USA)

**Triton X-100** (IWTReagents, Niemcy)

**Tween20** (Sigma-Aldrich, USA)

**Tween80** (Sigma-Aldrich, USA)

**Woda wolna od nukleaz** (Ibis Scientific, USA)

**X-Gal** (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### 6.10. Materiały zużywalne

**Bibuła Whatmann** (Sigma-Aldrich, USA)

**Błona nitrocelulozowa** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Błona PVDF** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels**, 4-12%, 1.0 mm, WedgeWell™ format (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Filtr PES 0,22  $\mu\text{M}$**  (Carl Roth, Niemcy)

**High Sensitivity RNA ScreenTape** (Agilent, USA)

**Novex™ Tris-Glycine Mini Protein Gels**, 4–20%, 1.0 mm, WedgeWell™ format (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Płytki płaskodenne polistyrenowe przezroczyste o wysokim stopniu wiązania do analiz typu ELISA** (Greiner, Austria)

**Płytki z membraną PVDF do analiz ELISpot typu Multiscreen®** (Sigma-Aldrich, USA)

**Pur-A-Lyzer™ Midi Dialysis Kit Midi 3500**, capacity 50-800  $\mu\text{L}$ , MWCO 3.5 kDa (Sigma-Aldrich, USA)

**Siatki do transmisyjnej mikroskopii elektronowej** (Electron Microscopy Sciences, USA)

**Sitka komórkowe 70  $\mu\text{M}$**  (Biologix, Niemcy)

**Slajdy do automatycznego liczenia komórek systemu Countess** (Thermo Fisher Scientific, USA)

#### 6.11. Bufory standardowe i żele

##### **0,1 M $\text{CaCl}_2$**

$\text{CaCl}_2$  11,098 g; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

##### **0,1 M $\text{CaCl}_2$ + 10% glicerol**

$\text{CaCl}_2$  11,098 g; glicerol 100 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

##### **0,5 M EDTA**

EDTA 146,12 g; pH 8,0; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

##### **3 M octan sodu**

octan sodu 246,1 g; pH 5,2 (ustalone z użyciem kwasu octowego); dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

##### **2% octan uranylu**

octan uranylu 0,2 g; rozpuszczono w 10 ml wody destylowanej

##### **Bufor 50x TAE (Tris + Acetate + EDTA)**

Tris 242 g; lodowaty kwas octowy 57,1 ml; 0,5 M EDTA 100 ml; pH 8,0; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

##### **Bufor 1x TAE**

bufor TAE 50x 40 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 2 l

**Bufor 10x do elektroforezy poliakrylamidowej**

Tris 30,3 g; glicyna 144,4 g; SDS 10g; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

**Bufor 1x do elektroforezy poliakrylamidowej**

bufor SDS-PAGE 10x 50 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml

**Bufor do transferu mokrego nocnego**

Tris 9,08 g; glicyna 43,24 g; dopełniono wodą destylowaną do objętości 3 l

**Bufor 6x lizująco-obciążający do elektroforezy SDS-PAGE**

1M Tris-HCl pH 6,8 2,5 ml; SDS 1,2 g; glicerol 5 ml; 10% β-merkaptanoetanol 1,5 ml; błękit bromofenolowy 6 mg; dopełniono wodą destylowaną do objętości 10 ml

**Bufor 10x PBS (Phosphate Buffered Saline), pH 7,4**

10 gotowych tabletek PBS pH 7.4 rozpuszczono w 1 l wody destylowanej

**Bufor 1x PBS**

PBS 10x 100 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

**Bufor 1x PBS + 0,05% Tween20**

Do 1 l buforu 1x PBS dodano 500 μl Tween20

**Bufor 20x SSC**

NaCl 175,3 g; cytrynian sodu 88,3 g; pH 7,0; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

**Bufor płuczący 2x SSC**

SSC 20x 10 ml; 0,1 g SDS; dopełniono wodą destylowaną do objętości 100 ml

**Bufor płuczący 0,2x SSC**

SSC 20x 1 ml; 0,1 g SDS; dopełniono wodą destylowaną do objętości 100 ml

**Bufor 1x TBS z 0,1% Tween'em 20 (TBS-T)**

Tris 2,42 g; NaCl 8,76 g; Tween20 1 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 1 l

**Coomassie Blue R-250**

kw. octowy 50 ml; metanol 100 ml; 0,5 g Coomassie Blue R-250; dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml

**Odbarwiacz do żeli barwionych Coomassie**

kw. octowy 50 ml; metanol 100 ml; dopełniono wodą destylowaną do objętości 500 ml

#### **Roztwór 5% odtłuszczonego mleka w TBS-T**

odtłuszczone mleko w proszku 2,5 g; dopełniono buforem TBS-T do objętości 50 ml

#### **Żel agarozowy 1%**

agarozą 1g; 100 ml 1x buforu TAE; po rozpuszczeniu i ostudzeniu dodano 5 µl SimplySafe

#### **Żel poliakrylamidowy 5% (zagęszczający)**

woda destylowana 3,4 ml; mieszanina akrylamidów 30% 0,83 ml; 1 M Tris-HCl pH 6,8 0,63 ml; 10% SDS 50 µl; 10% APS 70 µl; TEMED 7 µl

#### **Żel poliakrylamidowy 12% (rozdzielający)**

woda destylowana 4,9 ml; mieszanina akrylamidów 30% 6,0 ml; 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 3,8 ml; 10% SDS 0,15 ml; 10% APS 0,15 ml; TEMED 6 µl

### 6.12. Odczynniki do transfekcji

**Lipofectamine™ MessengerMAX™ Transfection Reagent** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**TransIT®-Insect Transfection Reagent** (Mirus Bio, USA)

### 6.13. Kolumny chromatograficzne

**Strep-Tactin® 4Flow® high capacity column** 1 ml 2-1252-001 (IBA Lifesciences, Niemcy)

**HisPur™ Ni-NTA Spin Column** 3 ml (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 6.14. Bufory do oczyszczania białek

**Zestaw buforów dla kolumn Strep-Tactin® 4Flow® high capacity column** (IBA Lifesciences, Niemcy)

bufor płuczący W 10x stężony – rozcieńczono do 1x stężonego z użyciem wody wolnej od nukleaz

bufor elucyjny E 10x stężony – rozcieńczono do 1x stężonego z użyciem wody wolnej od nukleaz

**Zestaw buforów dla kolumn HisPur™ Ni-NTA Column**

bufor równoważący – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 10 mM imidazol

bufor płuczący – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 100 mM imidazol

bufor elucyjny 250 mM imidazol – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 250 mM imidazol

bufor elucyjny 500 mM imidazol – 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 300 mM NaCl; 500 mM imidazol

bufor regenerujący MES – 20 mM MES; 100 mM NaCl; pH 5

### 6.15. Bufory komercyjne

**20X Bolt™ MES SDS Running Buffer** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Bufor ACK** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**SimplyBlue™ SafeStain** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**TMB Chromogen Solution** (for ELISA) (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 6.16. Enzymy komercyjne i ich bufory

**10X FastDigest Buffer** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**10X FastDigest Green Buffer** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**DNA Gel Loading Dye (6X)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**DNAza** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Enzym restrykcyjny BamHI FastDigest** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Enzym restrykcyjny EcoRV FastDigest** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Enzym restrykcyjny KpnI FastDigest** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Enzym restrykcyjny NotI FastDigest** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Enzym restrykcyjny XbaI FastDigest** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**High Sensitivity RNA ScreenTape Sample Buffer** (Agilent, USA)

**Inhibitor RNAz** (A&A Biotechnology, Polska)

**NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix** (New England Biolabs, USA)

**Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix** (New England Biolabs, USA)

**Proteinaza K** (EurX, Polska)

**RNA Gel Loading Dye (2X)** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**T4 ligaza DNA** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Viscolase** (A&A Biotechnology, Polska)

### 6.17. Wzorce masowe

**GeneRuler DNA Ladder Mix** – fragmenty DNA o wielkości: 10000 bp, 8000 bp, 6000 bp, 5000 bp, 4000 bp, 3500 bp, 3000 bp, 2500 bp, 2000 bp, 1500 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp (Thermo Fisher Scientific, USA)

**RiboRuler High Range RNA Ladder** – fragmenty RNA o wielkości: 6000 nt, 4000 nt, 3000 nt, 2000 nt, 1500 nt, 1000 nt, 500 nt (Thermo Fisher Scientific, USA)

**PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa** – 10 białek o masie równej około: 170 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 72 kDa, 55 kDa, 43 kDa, 34 kDa, 26 kDa, 17 kDa, 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)

**PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa** – 9 białek o masie równej około: 250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa, 15 kDa, 10 kDa (Thermo Fisher Scientific, USA)

### 6.18. Przeciwciała, rekombinowane białka oraz mieszaniny peptydów

**Mieszanina peptydów dla HBsAg wirusa HBV subtypu adw2** (JPT, Niemcy)

**Mieszanina peptydów dla nukleoproteiny wirusa grypy typu A H1N1 (NP/Puerto Rico/8/1934)** (JPT, Niemcy)

**Przeciwciała drugorzędowe alpakowe anty-królicze sprzężone z peroksydazą chrzanową** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., UK)

**Przeciwciała drugorzędowe kozie anty-mysie sprzężone z peroksydazą chrzanową** (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., UK)

**Przeciwciała pierwszorzędowe poliklonalne przeciwko HBsAg (ad/ay) BP2029P** (Origene, USA)

**Przeciwciała pierwszorzędowe poliklonalne przeciwko NP wirusa grypy typu A PA5-32242** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Rekombinowane białko HBsAg (adw) AR31017PU-N** (Origene, USA)

### 6.19. Zestawy komercyjne

**Clean Up RNA Concentrator** (A&A Biotechnology, Polska)

**CloneJET PCR Cloning Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Gel Out** (A&A Biotechnology, Polska)

**HighYield T7 Atto488 RNA Labeling Kit (UTP-based)** (Jena Bioscience, Niemcy)

**HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit** (New England Biolabs, USA)

**HiScribe® T7 mRNA Kit with CleanCap® Reagent AG** (New England Biolabs, USA)

**MAXIscript™ SP6/T7 Transcription Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit** (New England Biolabs, USA)

**QuantiFluor® dsDNA System** (Promega, USA)

**QuantiFluor® RNA System** (Promega, USA)

**Plasmid Mini** (A&A Biotechnology, Polska)

**PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Recombinant Enterokinase** (Sigma-Aldrich, USA)

**SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**The BCA Protein Assay** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Viral DNA/RNA** (A&A Biotechnology, Polska)

**Zestaw do analizy typu ELISpot do wykrywania mysiego interferonu gamma** (Medix Biochemica, Finlandia)

## 6.20. Aparatura

**Analizator dynamicznego rozpraszania światła Zetasizer Nano** (Malvern Panalytical, UK)

**Aparat do elektroforezy poliakrylamidowej Mini Gel Tank** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Aparat do transferu mokrego – BIOTRANS 110-100** (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne, Polska)

**Czytnik Amersham Typhoon RGB Biomolecular Imager** (Cytiva, USA)

**Czytnik płytek Infinite® 200 PRO NanoQuant** (Tecan, Niemcy)

**Czytnik płytek Mabtech IRIS™ 2** (Mabtech, Szwecja)

**Ekran fosforowy do przechowywania sygnału radioaktywnego** (Biorad, USA)

**Inkubator HeraCell 150** (Kendro, Niemcy)

**Mikroskop konfokalny Nikon PCM 2000** (Nikon, Holandia)

**Sonikator VCX 130** (Sonics & Materials Inc, USA)

**Spektrofotometr DeNovix DS-11** (DeNovix, USA)

**Spektrofluorymetr Quantus** (Promega, USA)

**System do automatycznego liczenia komórek Countess™ 3 Automated Cell Counter** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**System do automatycznej elektroforezy 2200 TapeStation Nucleic Acid System** (Agilent, USA)

**System do obrazowania Chemidoc MP** (Biorad, USA)

**System do obrazowania związków chemiluminescencyjnych, Uvitec Mini HD** (Uvitec, UK)

**Termoblok** (Benchmark, USA)

**Termocykler Pro Flex™ 3x32 Well System PCR** (Thermo Fisher Scientific, USA)

**Transluminator Uvidoc HD6** (Uvitec, UK)

**Transmisyjny mikroskop elektronowy Tecnai G2 Spirit BioTWIN** (FEI Company, USA)

**Ultrawirówka** (Beckman Coulter, USA)

**Wiskozymetr Oswaldta** (SI Analytics, Niemcy)

**Wytrząsarka powietrzna, Infors HT Ecotron** (Szwajcaria)

#### 6.21. Oprogramowanie

**Biorender**

**Geneious**

**GraphPad Prism 8**

**Lucia Image**

**Mabtech Apex 1.1**

**NEBuilder Assembly Tool**

**NEBaseChanger**

**Zetasizer Malvern**

## 7. Metody

### 7.1. Przygotowanie komórek kompetentnych *E. coli* NEB stable oraz Mach1

Hodowla nocna komórek *E. coli* została odmłodzona (2 ml hodowli nocnej do 100 ml świeżej pożywki LB bez antybiotyku) i inkubowana z wytrząsaniem w 37°C do uzyskania  $OD_{600} = 0,4$ . Hodowle następnie odwirowano, supernatant zlano i komórki zawieszono w 40 ml chłodnego 0,1 M  $CaCl_2$  i pozostawiono na lodzie przez 30 min. Komórki odwirowano, zlano supernatant i osad zawieszono w 4 ml 0,1 M  $CaCl_2$  + 10% glicerol i przechowywano do momentu użycia w - 80°C.

### 7.2. Transformacja komórek kompetentnych plazmidem lub mieszaniną ligacyjną

Do komórek kompetentnych dodano oczyszczony plazmid (ok. 100 ng) lub mieszaninę ligacyjną (całość mieszaniny) i inkubowano przez 30 min na lodzie. Następnie dokonano szoku termicznego (2 min, 42°C), ochłodzono na lodzie przez 2 min i dodano 900  $\mu$ l pożywki LB bez antybiotyku. Transformowane komórki inkubowano przez 1 h w 37°C z wytrząsaniem i następnie wysiano na płytki z pożywką LA z dodatkiem ampicyliny.

### 7.3. Hodowla nocna komórek bakteryjnych *E. coli*

10 ml pożywki płynnej LB z dodatkiem ampicyliny zaszczerpiono wybraną kolonią bakteryjną z płytki i inkubowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem.

### 7.4. Oczyszczanie plazmidowego DNA

Hodowle bakteryjne zostały odwirowane i supernatanty usunięte. Oczyszczanie plazmidów wykonano zgodnie z procedurą dla zestawu Plasmid Mini A&A Biotechnology.

### 7.5. Pomiar stężenia DNA

Stężenia plazmidów po oczyszczeniu zostały zmierzone z użyciem spektrofotometru DeNovix lub fluorymetrycznie z użyciem zestawu QuantiFluor dsDNA.

### 7.6. Trawienie enzymatyczne plazmidów

Plazmidy zostały poddane trawieniu enzymatycznemu z użyciem odpowiednich enzymów i buforu reakcyjnego. Mieszaniny inkubowano przez 1 h w 37°C i nałożono na 1% żel agarozowy. Rozdział prowadzono przez ok. 30 - 45 min w buforze TAE przy napięciu 70 V.

### 7.7. Sekwencjonowanie plazmidów

W celu sprawdzenia poprawności sekwencji genowej plazmidy zostały wysłane do firmy Eurofins Genomics (Niemcy) i uzyskane odczyty zanalizowano za pomocą programu Geneious.

## 7.8. Amplifikacja genów metodą łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR)

Zaprojektowano z użyciem programu Geneious startery (Tabela 6) do reakcji PCR zawierające odpowiednie miejsca restrykcyjne w celu wklonowania genu sHBsAg do plazmidu pFastBac1. Do przeprowadzenia reakcji użyto gotowej mieszanki Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, starterów, wody wolnej od nukleaz i plazmidu zawierającego sekwencję kodującą sHBsAg. Reakcję PCR przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta i następnie dokonano rozdzielenia elektroforetycznego produktów reakcji w 1% żelu agarozowym.

## 7.9. Klonowanie wstawek do plazmidów

Po dokonaniu trawienia enzymatycznego i rozdzielaniu produktów na 1% żelu agarozowym, wycięto odpowiednie fragmenty DNA z żelu, oczyszczono zgodnie z protokołem dla zestawu Gel Out A&A Biotechnology i przeprowadzono ligację z użyciem ligazy T4 DNA. Mieszanki tej użyto potem do transformacji komórek kompetentnych.

## 7.10. Klonowanie sekwencji znacznika Twin-Strep-tag do konstruktów pFastBac-sHBsAg

Za pomocą programu Geneious zaprojektowano konstrukt genowy zawierający sekwencję kodującą znacznik Twin-Strep-tag (MGSWSHPQFEKGGGSGGGGSAWSHPQFEK), łącznik GGGG oraz sygnał dla enterokinazy (DYKDDDDK), który potem został zsyntetyzowany przez firmę Eurofins Genomics (Niemcy). Następnie zaprojektowano startery (Tabela 7) umożliwiające wklonowanie tego konstruktów do plazmidu pFastBac-sHBsAg przed sekwencją kodującą sHBsAg, wykorzystując program NEBuilder Assembly Tool. Reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem dla zestawu NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix i końcowo uzyskano produkt w postaci plazmidu pFastBac-TS-sHBsAg (TS-sHBsAg), przedstawionego schematycznie na Rycinie 11.

## 7.11. Mutageniza miejscowo-insercyjna dla rekombinowanych TS-sHBsAg

W celu wprowadzenia motywów mających za zadanie wiązanie mRNA, przeprowadzono mutagenizację miejscowo-insercyjną w sekwencji kodującej sHBsAg na plazmidzie pFastBac-TS-sHBsAg. Na podstawie C-końcowej domeny ARD z białka HBcAg stworzono dwa motywy: krótki (RRRGRSPRRRR) i długi (RRRGRSPRRRTPSPRRRSQSRRRRSQSRESQCGSG). Opierając się na danych literaturowych, wybrano domeny cytoplazmatyczne jako miejsca wprowadzenia zmian<sup>165,178</sup>. Za pomocą narzędzia NEBaseChanger zaprojektowano startery (Tabela 8) zawierające oczekiwane zmiany:

- a) substytucja na motyw krótki w pierwszej domenie cytoplazmatycznej (TS-sHBsAg-capmut1),
- b) substytucja na motyw krótki w drugiej domenie cytoplazmatycznej (TS-sHBsAg-capmut2).

Następnie na bazie sekwencji TS-sHBsAg-capmut1 zaprojektowano startery do wprowadzenia kolejnych zmian:

- c) substytucja na motyw długi w pierwszej domenie cytoplazmatycznej (TS-sHBsAg-capsub1),
- d) insercja na motyw długi w pierwszej domenie cytoplazmatycznej (TS-sHBsAg-capins1).

Po otrzymaniu syntetycznych starterów przeprowadzono reakcję zgodnie z protokołem dla zestawu Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit. Uzyskane konstrukty pokazano na Rycinie 13.

#### 7.12. Transformacja komórek kompetentnych *E. coli* DH10Bac Max Efficiency

Po sprawdzeniu poprawności sekwencji wszystkie konstrukty oparte na pFastBac użyto do uzyskania rekombinowanych bakmidów. W tym celu transformowano komórki *E. coli* DH10Bac Max Efficiency plazmidami donorowymi pFastBac. Do komórek kompetentnych dodano ok. 200 ng plazmidu i inkubowano 30 min na lodzie. Następnie dokonano szoku termicznego (42°C, 2 min), ochłodzono kolejne 2 min na lodzie, dodano 900 µl pożywki LB bez antybiotyków i inkubowano 4 h w 37°C z wytrząsaniem. W międzyczasie przygotowano podłoże LA z dodatkiem gentamycyny, kanamycyny, tetracykliny, IPTG i X-Gal. Po inkubacji komórki wysiano i inkubowano 48 h w 37°C. Po tym czasie wybrano kolonie, w których zaszła rekombinacja i użyto ich do dalszej pracy.

#### 7.13. Hodowla nocna komórek *E. coli* DH10Bac Max Efficiency

15 ml pożywki płynnej LB z dodatkiem gentamycyny i kanamycyny zaszczerpiono wybraną kolonią bakteryjną zawierającą bakmid i inkubowano przez noc w 37°C z wytrząsaniem.

#### 7.14. Oczyszczanie bakmidów

Hodowle bakteryjne zostały odwirowane i supernatanty usunięte. Oczyszczanie bakmidów wykonano zgodnie z procedurą dla zestawu PureLink™ HiPure Plasmid Miniprep Kit.

#### 7.15. Analiza oczyszczonych bakmidów

W celu weryfikacji obecności wstawek w rekombinowanych bakmidach zastosowano metodę PCR z użyciem specyficznych starterów pUC/M13 według protokołu Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System<sup>179</sup>. Reakcję przeprowadzono analogicznie jak w punkcie 7.8. Po zakończonej reakcji produkty PCR rozdzielono na 1% żelu agarozowym.

### 7.16. Pasażowanie komórek owadzych

Komórki owadzie linii Sf9 i Sf9 ET utrzymywano w hodowli zawiesinowej w pożywce SF-900 III z dodatkiem antybiotyków AA (dla Sf9) i G418 (dla Sf9 ET) w 27°C z wytrząsaniem 130 rpm.

### 7.17. Transfekcja komórek owadzych bakmidami

W celu transfekcji komórki linii Sf9 wysiano w ilości  $1 \times 10^6$  komórek na każdy dołek płytki 6-dołkowej w pożywce Sf-900 III bez antybiotyków. Komórki pozostawiono na około 30 min, aby przykleiły się do powierzchni płytki. W międzyczasie przygotowano mieszaniny transfekcyjne zawierające 250  $\mu$ l pożywki Sf-900 III, 2  $\mu$ g rekombinowanego bakmidu i 4  $\mu$ l odczynnika transfekcyjnego TransIT<sup>®</sup>-Insect Transfection Reagent. Mieszaniny inkubowano przez 20 min w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu inkubacji, mieszaniny transfekcyjne dodano do odpowiednich dołków płytki z wysianymi komórkami i dopełniono pożywką Sf-900 III do 2 ml całkowitej objętości. Komórki inkubowano przez 5 dni w temp. 27°C. Po tym czasie zebrano hodowle, odwirowano (4800 rpm, 10 min) i supernatanty zawierające bakulowirusy (P0) przeniesiono do nowych probówek i przechowywano w 4°C.

### 7.18. Amplifikacja bakulowirusów

W celu namnożenia bakulowirusów przygotowano hodowlę zawiesinową komórek Sf9 o gęstości  $2 \times 10^6$  komórek/ml z dodatkiem antybiotyków AA, do której to dodano 1,5 ml P0 i dopełniono pożywką Sf-900 III do 30 ml. Hodowlę inkubowano do momentu, aż żywotność komórek spadła poniżej 30% – po tym czasie hodowle odwirowano (4800 rpm, 10 min) i supernatanty z bakulowirusami (P1) przeniesiono do nowych probówek i przechowywano w temp. 4°C. Kolejny pasaż wirusa (P2) wykonano analogicznie.

### 7.19. Miareczkowanie wirusów

Aby określić miana bakulowirusów, wykonano miareczkowania z użyciem komórek linii Sf9 ET według protokołu opisanego przez Hopkinsa i Esposito<sup>180</sup>.

### 7.20. Elektroforeza poliakrylamidowa SDS-PAGE

Elektroforezę poliakrylamidową SDS-PAGE przeprowadzono z użyciem własnoręcznie przygotowanych 12% żeli w buforze do rozdzielania SDS-PAGE lub gotowych żeli: Novex<sup>™</sup> Tris-Glycine Mini Protein Gels, 4–20% (bufor do SDS-PAGE) przy napięciu 120 V lub Bolt<sup>™</sup> Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4–12% (odpowiednio rozcieńczony 20X Bolt<sup>™</sup> MES SDS Running Buffer) przy napięciu 100 V. Próbkę przed nałożeniem na żel zmieszano z odpowiednią objętością buforu denaturującego i inkubowano 10 min w 100°C.

### 7.21. Barwienie białek przy użyciu Coomassie Brilliant Blue R-250

Po rozdziale SDS-PAGE żel barwiono przy użyciu buforu z Coomassie Brilliant Blue R-250 przez godzinę w temperaturze pokojowej, po czym inkubowano go przez noc w odbarwiaczu.

### 7.22. Barwienie białek przy użyciu SimplyBlue™ SafeStain

Po rozdziale SDS-PAGE żel przepłukano trzykrotnie wodą destylowaną i barwiono przy użyciu buforu SimplyBlue™ SafeStain przez godzinę w temperaturze pokojowej. Żel odbarwiono następnie wodą destylowaną.

### 7.23. Transfer mokry białek na błonę PVDF

Po rozdziale SDS-PAGE przeprowadzono transfer białek z żelu na błonę PVDF. W tym celu użyto aktywowanej w metanolu błony PVDF i bibuły Whatmanna nasączonych buforem do transferu mokrego nocnego. Transfer prowadzono przez noc przy napięciu 16 V w buforze do transferu mokrego nocnego.

### 7.24. Immunodetekcja białek przy użyciu metody Western blotting

Po transferze białek na błonę PVDF wyblokowano ją 5% roztworem odtłuszczonego mleka w TBS-T lub 3% BSA w wodzie (w zależności od dalszej procedury) przez 1 h w temperaturze pokojowej z bujaniem. Następnie błonę inkubowano z przeciwciałami pierwszorzędowymi w odpowiednim rozcieńczeniu w 5% roztworze odtłuszczonego mleka lub 3% BSA z bujaniem. Kolejno błonę płukano trzy razy przez 5 min w buforze TBS-T z wytrząsaniem i inkubowano z odpowiednimi przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z peroksydazą chrzanową przez 1 h z bujaniem. Błonę ponownie przepłukano buforem TBS-T. Detekcję sygnału przeprowadzono za pomocą zestawu SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate i systemu do obrazowania związków chemiluminescencyjnych Uvitec Mini HD.

### 7.25. Produkcja białek wirusowych w komórkach owadzych

W celu optymalizacji produkcji rekombinowanych białek przeprowadzono analizę umożliwiającą określenie najbardziej odpowiedniego dnia zbierania komórek po infekcji (ang. time-course) oraz inokulum wirusa. W tym celu do dołków płytki 6-dołkowej wysiano po  $2 \times 10^6$  komórek linii Sf9, dodano odpowiednie inokulum wirusa i dopełniono pożywką SF900 III do 2 ml całkowitej objętości. Dla eksperymentu time-course użyto wielokrotność zakażenia (ang. multiplicity of infection, MOI) równą 3. Hodowle zbierano 24, 48, 72 i 96 h po infekcji, zlizowano i analizowano ilość rekombinowanego białka we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych.

W celu wyboru odpowiedniego inokulum wysiano do dołków płytki 6-dołkowej po  $2 \times 10^6$  komórek linii Sf9 i dodano odpowiednią objętość rekombinowanego bakulowirusa odpowiadającą MOI 1, 2, 3 i 5. Hodowle zbierano 72 h po infekcji, zlizowano i analizowano ilość rekombinowanego białka we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych.

#### 7.26. Oczyszczanie rekombinowanych wariantów TS-sHBsAg

W celu nadprodukcji białka TS-sHBsAg zainfekowano hodowlę komórek Sf9 o gęstości  $2 \times 10^6$  komórek/ml odpowiednią ilością danego bakulowirusa (MOI 3) i dopełniono do 30 ml pożywką Sf-900 III. Hodowle inkubowano 72 h w temperaturze 27°C z wytrząsaniem. Po upływie tego czasu hodowlę przeniesiono do probówki i odwirowano (4800 rpm, 10 min). Supernatant zlano, a osad komórkowy przepłukano dwukrotnie buforem PBS. Następnie dodano 5 ml buforu lizującego dla TS-sHBsAg (100 mM Tris pH 8,0, 150 mM NaCl, 2% Tween20, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1x inhibitory proteaz) z dodatkiem 25 U enzymu Viscolase na 1 ml lizatu i poddano sonikacji (5 min: 10 s on, 15 s off, amplituda 40%). Kolejno lizat inkubowano w 4°C przez 1 h z bujaniem i następnie odwirowano w celu oddzielenia frakcji nierozpuszczalnej od rozpuszczalnej (12000 g, 30 min, 4°C). Frakcję rozpuszczalną przeniesiono do nowej probówki, dodano 5 ml buforu płuczającego W i przefiltrowano przez filtr PES 0,22 μM. Bufory użyte do tego oczyszczania opisano w punkcie 6.14.

Do oczyszczania rekombinowanych białek TS-sHBsAg użyto gotowych kolumn ze złożem Strep-Tactin. Kolumnę po wyjęciu z lodówki zrównoważono 2 ml buforu W i następnie nałożono przefiltrowaną frakcję rozpuszczalną. Kolejno złożę przepłukano 5 ml buforu W (zbierano frakcje po 1 ml) i eluowano związane białko 3 ml buforu E (frakcje po 0,5 ml). Poszczególne frakcje po oczyszczeniu rozdzielano na żelu SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue R-250 lub SimplyBlue™ Stain albo transferowano białka na błonę PVDF celem immunodetekcji. Wszystkie warianty TS-sHBsAg oczyszczono w ten sam sposób.

#### 7.27. Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Próbki przed adsorpcją do siatek węglowych do transmisyjnej mikroskopii elektronowej odpowiednio rozcieńczono w wodzie wolnej od nukleaz. Barwiono z użyciem 2% octanu uranylu.

#### 7.28. Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Przed pomiarem DLS próbki białek rozcieńczono do stężenia 0,1 μg/μl. Do kwarcowej kuwety nakładano po 40 μl próbki i analizę przeprowadzono z użyciem aparatu Zetasizer Nano oraz oprogramowania Zetasizer.

### 7.29. Oczyszczanie nukleoproteiny wirusa grypy typu A

Sekwencję kodującą nukleoproteinę wirusa grypy typu A wklonowano do wektora pFastBac1 z użyciem miejsc restrykcyjnych BamHI i XbaI. Kolejno otrzymano rekombinowany bakmid oraz bakulowirus. Przeprowadzono analizę jak w punkcie 7.25 i wybrano MOI 3 i czas inkubacji 72 h jako najbardziej optymalne dla produkcji tego białka. Po infekcji 100 ml hodowli komórek Sf9 o gęstości  $2 \times 10^6$  komórek/ml hodowle odwirowano, zlano supernatant i przepłukano osad komórkowy dwukrotnie buforem PBS. Następnie komórki zawieszono w buforze lizującym dla nukleoproteiny (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1% deoksycholan sodu, 0.1% SDS, 1x inhibitory proteaz)<sup>181</sup> i lizat komórkowy inkubowano przez 1 h w 4°C z bujaniem. Kolejno lizat odwirowano w celu oddzielenia frakcji nierozpuszczalnej od rozpuszczalnej (12 000 g, 30 min, 4°C). Frakcję rozpuszczalną przeniesiono do nowej probówki i dodano 10 ml buforu równoważącego. Bufory użyte do tego oczyszczania opisano w punkcie 6.14.

Kolumnę HisPur™ Ni-NTA zrównoważono buforem równoważącym i następnie nałożono frakcję rozpuszczalną lizatu. Po zebraniu rozcieńczonej frakcji rozpuszczalnej, kolumnę przepłukano buforem płuczającym. Nukleoproteinę eluowano ze złoża z użyciem buforów zawierających 250 i 500 mM imidazolu. Złoże zregenerowano z użyciem buforu MES i przepłukano wodą wolną od nukleaz. Poszczególne frakcje po oczyszczaniu rozdzielano następnie na żelu SDS-PAGE i barwiono Coomassie Brilliant Blue lub SimplyBlue™ Stain lub przeprowadzano transfer białek na błonę PVDF celem immunodetekcji.

### 7.30. Pomiar stężenia białek

Stężenie białek określano za pomocą pomiaru spektrofotometrycznego przy długości fali 280 nm lub testu z kwasem bicynchoninowym (BCA). Test BCA wykonano zgodnie z procedurą producenta dla zestawu The BCA Protein Assay.

### 7.31. Analiza obecności endogennych kwasów nukleinowych w oczyszczonych VLPs

Aby sprawdzić, czy w oczyszczonych TS-sHBsAg-VLPs znajduje się endogenne RNA (oraz DNA) pochodzące z komórek owadzych bądź bakulowirusa, przygotowano w probówkach po 100 µg VLPs każdego wariantu oraz kontrolę negatywną (sam bufor). Następnie dodano proteinazę K do stężenia końcowego 1 mg/ml i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu za pomocą zestawu Viral DNA/RNA wyizolowano RNA i DNA, według procedury producenta. Kolejno sprawdzono stężenie kwasów nukleinowych i przeprowadzono elektroforezę na aparacie TapeStation 2200 celem weryfikacji, czy w próbce znajdują się fragmenty RNA.

### 7.32. Odcinanie znacznika Twin-Strep-tag

W celu określenia warunków potrzebnych do odcięcia znacznika Twin-Strep-tag od sekwencji sHBsAg, do próbek dodano wodę wolną od nukleaz, 10 µg TS-sHBsAg oraz bufor zapewniający odpowiednie środowisko reakcji z zestawu Recombinant Enterokinase. Następnie, do wybranych próbek dodano detergent (0,05% Tween20 lub 0,1% CHAPS stężenia końcowego) oraz różne ilości enterokinazy, uzyskując końcową objętość 50 µl. Mieszaniny inkubowano przez 48 h w temperaturze pokojowej, a potem przez 24 h w 4°C. Po upływie każdych 24 h od momentu rozpoczęcia inkubacji pobierano po 10 µl próbek i rozdzielano je w 12% żelu SDS-PAGE celem analizy cięcia proteolitycznego.

### 7.33. Zaprojektowanie matrycy do transkrypcji mRNA *in vitro*

Wyjściową matrycę do transkrypcji mRNA *in vitro* (Ryc. 29A, IVT GG) zaprojektowano na podstawie danych literaturowych z pomocą programu Geneious. Jako sekwencji kodującej użyto genu dla białka EGFP, 3' UTR pochodzi z regionu niekodującego dla sekwencji genowej β-globiny *Xenopus laevis* i na końcu dołączono ogon poli(A) o długości 128 adenin. Następnie konstrukt ten został zsyntetyzowany przez firmę Eurofins Genomics (Niemcy). Do wklonowania matrycy do IVT do plazmidu pJET 1.2/blunt (zawierającego sekwencję dla promotora polimerazy RNA faga T7) użyto miejsc restrykcyjnych dla enzymów NotI i EcoRV, zgodnie z protokołem dla zestawu CloneJET PCR Cloning Kit.

### 7.34. Mutageneza miejscowo-insercyjna dla matrycy do transkrypcji

Po uzyskaniu matrycy IVT GG zaprojektowano kolejne konstrukty zawierające sekwencję sygnałową z genomu HBV oraz sekwencję AG na końcu promotora dla polimerazy RNA faga T7. W celu ich otrzymania przeprowadzono mutagenezę miejscowo-insercyjną i za pomocą narzędzia NEBaseChanger zaprojektowano startery (Tabela 9), które miały pozwolić na wprowadzenie oczekiwanych zmian:

- a) wstawienie, pomiędzy sekwencją promotora polimerazy RNA faga T7 a sekwencją kodującą białko, zmodyfikowanej sekwencji sygnałowej pochodzącej z genomu HBV (5'-GGGTTTTGGGTTTGTTTAAAGACTGGGAGGAGTTGGGGAGGAGCCC-3'), opisanej przez Patel *et al.* (sekwencja PS1)<sup>40</sup>,
- b) zmiana pierwszego transkrybowanego nukleotydu z G na A w celu przeprowadzenia transkrypcji z czapeczką typu CleanCap AG.

Po otrzymaniu syntetycznych starterów przeprowadzono reakcję zgodnie z protokołem dla zestawu Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit i mieszaniną ligacyjną transformowano komórki

kompetentne *E. coli* NEB stable. Uzyskane konstrukty pokazano na Rycinie 29. Po potwierdzeniu poprawności sekwencji matryc do IVT, gen kodujący białko EGFP na wybranych konstruktach zamieniono na geny kodujące białka E i NS5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu oraz nukleoproteinę wirusa grypy typu A (IVT AG PS-NP).

### 7.35. Transkrypcja IVT mRNA

Plazmidy użyte do transkrypcji zostały uprzednio zlinearyzowane za pomocą enzymu EcoRV w buforze 10X FastDigest Buffer. Po 2 h inkubacji w 37°C reakcje zatrzymano poprzez dodanie 1/20 objętości 0,5 M EDTA, 1/10 objętości 3 M octanu sodu i 2 objętości etanolu. Mieszaniny inkubowano przez 30 min w -20°C, potem odwirowano (15000 g, 15 min), usunięto supernatanty i osady zawieszono w odpowiedniej ilości wody wolnej od nukleaz, do stężenia DNA równego 500 ng/μl. Reakcje transkrypcji przeprowadzono zgodnie z protokołami producentów dla zestawów HiScribe® T7 High Yield RNA Synthesis Kit lub HiScribe® T7 mRNA Kit with CleanCap® Reagent AG, w zależności od użytej matrycy.

W celu uzyskania oczapczkowanego mRNA kodującego NP z N1-metylo-pseudourydyną, jako matrycę użyto zlinearyzowanego plazmidu IVT AG PS-NP i reakcję przeprowadzono zgodnie z protokołem dla HiScribe® T7 mRNA Kit with CleanCap® Reagent AG z całkowitą wymianą urydyny na m<sup>1</sup>Ψ, z zachowaniem odpowiedniego końcowego stężenia molowego tego nukleotydu w reakcji.

Kolejno, w celu strawienia matrycy DNA, do próbek dodano DNAzy dołączonej do zestawu i inkubowano 15 min w 37°C. Następnie, zgodnie z protokołem producenta, dodano odpowiednią ilość wody wolnej od nukleaz oraz chlorku litu dołączonego do zestawu w celu precypitacji mRNA i inkubowano przez 30 min w -20°C. Potem próbki odwirowano (15000 g, 15 min, 4°C), usunięto supernatant, przepłukano 70% etanolem i ponownie odwirowano (15000 g, 5 min, 4°C). Etanol usunięto i osad zawieszono w wodzie wolnej od nukleaz.

### 7.36. Pomiar stężenia RNA i analiza jakości

Stężenie oczyszczonego mRNA zostało zmierzono spektrofotometrycznie lub fluorymetrycznie z użyciem zestawu QuantiFluor® RNA System. Uzyskane mRNA zostało również rozdzielone na 1% żelu agarozowym w celu analizy długości. Próbki przed nałożeniem na żel zostały wymieszane z odpowiednią ilością RNA Gel Loading Dye, następnie inkubowane przez 5 min w 72°C i ochłodzone na lodzie. Rozdział prowadzono przez ok. 30-45 min w buforze TAE przy napięciu 70 V.

### 7.37. Hodowla komórek ssaczych linii HEK293T oraz Vero E6

Komórki linii HEK293T oraz Vero E6 utrzymywano w hodowli w pożywce DMEM z dodatkiem 10% FBS oraz 1% Pen Strep w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>.

### 7.38. Transfekcja mRNA

Dzień przez planowaną transfekcją komórki linii HEK293T lub Vero E6 odklejono od powierzchni butelki za pomocą trypsyny, policzono i wysiano po  $1,5 \times 10^5$  komórek/dołek na płytce 12-dołkowej. Kolejnego dnia przygotowano mieszaniny transfekcyjne: do dwóch próbek dodano po 50 µl pożywki Opti-MEM, a następnie do pierwszej odpowiednią ilość odczynnika transfekcyjnego Lipofectamine™ MessengerMAX™ Transfection Reagent (stosunek 1 µg mRNA : 4 µl odczynnika), a do drugiej – mRNA. Obie próbki po 10 min inkubacji w temperaturze pokojowej złączono i odczekano kolejne 5 min. Po tym czasie dodano kroplami mieszaninę transfekcyjną do odpowiednich dołków z komórkami i inkubowano przez noc w 37°C z 5% CO<sub>2</sub>.

### 7.39. Mikroskopia fluorescencyjna

Do obserwacji produkcji białka fluoroscencyjnego EGFP użyto mikroskopu Nikon PCM 2000 oraz oprogramowania Lucia Image w celu wykonania zdjęć.

### 7.40. Transkrypcja IVT radioaktywnie znakowanego mRNA

Do reakcji użyto zliniowanych matryc IVT GG zawierających sekwencje genowe białek E i NS5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV) oraz nukleoproteiny wirusa grypy typu A. Do transkrypcji użyto komponentów z zestawu MAXIscript™ SP6/T7 Transcription Kit, czapeczki ARCA oraz  $\alpha P^{32}$  UTP. Do próbki dodano 200 ng zlinearyzowanej matrycy, rybonukleotydy ATP/CTP do stężenia końcowego 500 µM, GTP (do 100 µM), czapeczkę ARCA (do 400 µM), UTP (do 5 µM),  $\alpha P^{32}$  UTP (do 835 nM), 1 µl polimerazy T7 oraz wodę do 20 µl objętości końcowej. Próbki inkubowano następnie przez 2 h w 37°C, po czym dodano 2 µl DNAzy z zestawu i dalej inkubowano w 37°C przez 15 min. Kolejno mRNA oczyszczono za pomocą kolumnienek ze złożem krzemionkowym z zestawu CleanUp RNA Concentrator według protokołu producenta.

### 7.41. Wiązanie radioaktywnego mRNA

W celu sprawdzenia, czy rekombinowane warianty TS-sHBsAg są w stanie związać mRNA, próbki białek rozdzielono żelu Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gel, 4-12% w powtórzeniach. Jeden żel zabarwiono z użyciem roztworu barwnika SimplyBlue SafeStain, drugi wykorzystano do transferu na błonę PVDF i immunodetekcji sHBsAg, a trzeci – do transferu na błonę PVDF i przygotowaniu jej do wiązania ze znakowanym mRNA. Po transferze błonę inkubowano w 3% BSA w wodzie przez

2 h i kolejno renaturowano białka za pomocą buforu renaturującego (50 mM Tris-HCl, pH 7,4; 1 mM EDTA; 200 mM NaCl; 10% glicerol; 0,1% Nonidet P-40) przez noc w 4°C z bujaniem. Błone następnie przepłukano pięciokrotnie w buforze wiążącym do RNA (30 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>), następnie dodano nową porcję buforu wiążącego z dodatkiem radioaktywnie znakowanego mRNA i inkubowano przez 2 h w temperaturze pokojowej z bujaniem<sup>182</sup>. Po zakończeniu tej inkubacji błonę przepłukano w buforach 2x SSC oraz 0,2x SSC. Sygnał pochodzący ze znakowanego mRNA obrazowano za pomocą ekranu fosforowego i czytnika Amersham Typhoon RGB Biomolecular Imager.

#### 7.42. Transkrypcja IVT fluorescencyjnie znakowanego mRNA

Do reakcji IVT użyto zliniowanej matrycy kodującej sekwencję dla NP wirusa grypy typu A (IVT PS AG-NP). Transkrypcję przeprowadzono zgodnie z protokołem producenta dla zestawu HighYield T7 Atto488 RNA Labeling Kit (UTP-based), z dodatkiem czapeczki CleanCap AG. Po zakończeniu reakcji do próbki dodano 2 µl DNAzy i dalej inkubowano 15 min w 37°C. Następnie mRNA zostało oczyszczone za pomocą chlorku litu (jak w punkcie 7.35).

#### 7.43. Wiązanie fluorescencyjnie znakowanego mRNA

W celu analizy czy badane białka w stanie natywnym są w stanie związać mRNA, na błonę nitrocelulozową nałożono wybrane ilości oczyszczonych wariantów TS-sHBsAg, nukleoproteiny wirusa grypy typu A (kontrola pozytywna) oraz BSA (kontrola negatywna). Błone następnie zablokowano 3% roztworem BSA w wodzie przez noc w 4°C z bujaniem. Kolejno błonę przepłukano pięciokrotnie buforem wiążącym, po czym dodano nową porcję buforu wiążącego z dodatkiem fluorescencyjnie znakowanego mRNA (końcowe stężenie – 0,5 µg mRNA na 1 ml buforu) oraz inhibitorów RNAz i inkubowano w ciemności przez 2 h z bujaniem w temperaturze pokojowej. Po zakończeniu tej inkubacji błonę przepłukano w buforach 2x SSC oraz 0,2x SSC. Sygnał pochodzący ze związanego znakowanego mRNA obrazowano za pomocą ChemiDoc MP z użyciem odpowiedniego filtra.

#### 7.44. Przygotowanie nanocząstek lipidowych z mRNA

Do szczepień użyto mRNA zawierającego sekwencję kodującą nukleoproteiny wirusa grypy typu A, przygotowanego według procedury opisanej w punkcie 7.35, z całkowitą wymianą urydyny na mψ1. Po wstępnym oczyszczeniu materiał przesłano do Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego celem oczyszczania z użyciem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (ang. high-performance liquid chromatography, HPLC). Po tej procedurze mRNA zostało zanalizowane pod kątem czystości i obecności dsRNA.

Nanocząstki lipidowe użyte do transportu mRNA przygotowano na podstawie protokołu Wang *et al.*<sup>122</sup>. Wybrano formuację SORT 4A3-SC8 z 10% 18PA, w skład której wchodzi następujące lipidy: 4A3-SC8, DOPE, cholesterol, DMG-PEG i 18PA. Stopień enkapsulacji mRNA sprawdzono poprzez pomiar wolnego mRNA w mieszaninie po dializie z użyciem zestawu QuantiFluor® RNA System i spektrofluorymetru Quantus. Wielkość nanocząstek lipidowych określono za pomocą DLS.

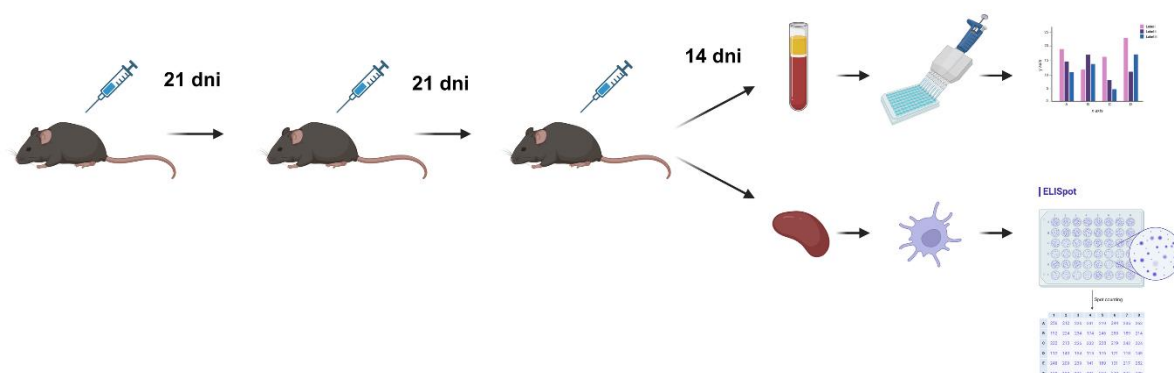
#### 7.45. Przygotowanie mieszanin do szczepień

Mieszaniny do immunizacji myszy podzielono na dwie główne grupy. Pierwsza z nich obejmowała mieszaniny zawierające VLPs (TS-sHBsAg, TS-sHBsAg-capmut1 oraz -capsub1) i mRNA kodującą nukleoproteinę wirusa grypy typu A (mRNA-NP) z dodatkiem adiuwantu AddaVax. Na jedną dawkę składało się 15 µg białka oraz 3 µg mRNA-NP. Druga grupa to mieszaniny zawierające mRNA-NP zapakowane do nanocząstek lipidowych (LNPs-mRNA-NP) z dodatkiem wybranych wariantów VLPs. Na jedną dawkę składało się 15 µg białka i nanocząstki lipidowe niosące 3 µg mRNA-NP. W celu porównania stopnia odpowiedzi immunologicznej użyto również mieszanin zawierających oczyszczone białko NP (15 µg białka na dawkę) z adiuwantem AddaVax, same LNPs-mRNA-NP (również niosących 3 µg mRNA-NP), puste LNPs, sam adiuwant AddaVax oraz sam bufor PBS.

W próbkach, gdzie użyto adiuwantu AddaVax, mieszaninę VLPs-mRNA-NP lub roztwór białka dopełniono sterylnym buforem PBS do objętości 25 µl i dodano 25 µl odczynnika AddaVax. Końcowa objętość dawki dla każdej myszy wynosiła 50 µl. Wszystkie mieszaniny przygotowano w dzień szczepienia (oprócz LNPs-mRNA-NP – były przygotowywane dzień wcześniej i przechowywane w 4°C).

#### 7.46. Immunizacja myszy

Do immunizacji wybrano myszy szczepu C57BL/6, którym opisane wyżej mieszaniny do szczepień podano domięśniowo. Na Rycinie 10 przedstawiono schemat dawkowania. Po upływie 14 dni od trzeciej dawki, pobrano od zaszczepionych myszy krew oraz śledziona do dalszych analiz. Doświadczenia na zwierzętach zostały przeprowadzone przez akredytowane jednostki: Trójmiejską Akademicką Zwierzętarnię Doświadczalną Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego oraz Wydział Biologii Uniwersytetu Gdańskiego, zgodnie z obowiązującymi wytycznymi dotyczącymi doświadczeń na zwierzętach. Protokoły zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyki ds. Doświadczeń na Zwierzętach w Bydgoszczy (numery uchwał: 8/2024 i 26/2025). Doświadczenia przeprowadzono zgodnie z zasadą 3R (zastępowanie, ograniczenie i udoskonalenie).



Ryc. 10 Schemat immunizacji myszy.

#### 7.47. Analiza odpowiedzi humoralnej

Krew każdej z myszy inkubowano przez 2 h w 37°C, a potem przez noc w 4°C celem oddzielenia surowicy od innych komponentów krwi. Po odwirowaniu i przeniesieniu do nowych probówek, surowice przechowywano w -80°C. Płytki 96-dołkowe do przeprowadzenia analizy typu ELISA opłaszczono antygenem zawieszonym w buforze PBS (końcowe stężenie antygeny 5 µg/ml) i inkubowano przez noc w 4°C. Kolejnego dnia studzienki przepłukano jeden raz buforem PBS, dodano roztwór 3% BSA w PBS w celu zablokowania i ponownie inkubowano płytki przez noc w 4°C. Następnego dnia studzienki przepłukano trzykrotnie buforem PBS, dodano po 100 µl rozcieńczonych mysich surowic (które najpierw złączono w jedną próbkę w obrębie danych grup) w PBS i pozostawiono do inkubacji przez 2 h w temperaturze pokojowej z bujaniem. Potem studzienki przepłukano pięciokrotnie buforem PBS + 0,05% Tween20, po czym dodano roztwór przeciwciał drugorzędowych antimysich, sprzężonych z peroksydazą chrzanową i inkubowano 1,5 h w temperaturze pokojowej z bujaniem. Kolejno studzienki ponownie przepłukano, opróżniono i dodano 100 µl gotowego odczynnika TMB, po czym reakcję zastopowano 50 µl 0,5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Odczytano sygnał przy długości fali 450 nm.

#### 7.48. Izolacja splenocytów

Śledziony myszy homogenizowano przy użyciu siatek komórkowych 70 µm w pożywce RPMI z dodatkiem 10% FBS, 1% Pen Step oraz 500 µM betamerkaptoetanolu (R10), po czym komórki odwirowano (900 g, 15 min, temperatura pokojowa). Supernatant zlano i zlizowano erytrocyty za pomocą buforu ACK. Zawieszono w nim komórki inkubowano przez 5 min w temperaturze pokojowej, po czym bufor ACK zneutralizowano za pomocą sterylnego buforu PBS i ponownie odwirowano. Supernatant usunięto, komórki ponownie przepuszczono przez nowe sitka (w celu

usunięcia resztek błon) i zawieszono w świeżej porcji pożywki R10. Komórki odwirowano, zawieszono w 5 ml R10 i splenocyty policzono z użyciem błękitu trypanowego.

#### 7.49. Analiza odpowiedzi komórkowej

Płytki z błoną PVDF aktywowano za pomocą 30% etanolu i przepłukano pięciokrotnie buforem PBS. Następnie płytki te opłaszczono roztworem przeciwciał wiążących myszy IFN $\gamma$  z zestawu Murine IFN gamma ELISpot Set i pozostawiono na noc w 4°C. Kolejnego dnia przeprowadzono blokowanie płytki zgodnie z protokołem producenta. W międzyczasie rozpoczęto rozcieńczanie wyizolowanych splenocytów do gęstości  $5 \times 10^6$  komórek/ml w pożywce R10. Mieszaniny peptydów mapujących wybrane antygeny zawieszono w DMSO (stężenie 400  $\mu\text{g/ml}$ ), które to potem rozcieńczono w R10 (stężenie 4  $\mu\text{g/ml}$ ). Do każdego dołka płytki dodano  $2,5 \times 10^5$  splenocytów oraz odpowiednią mieszaninę peptydów (końcowe stężenie w dołku 2  $\mu\text{g/ml}$ ), konkanawalinę A (5  $\mu\text{g/ml}$ ) lub R10 do 100  $\mu\text{l}$  końcowej objętości. Płytki następnie umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37 °C z 5% CO $_2$  na 16 godzin celem stymulacji splenocytów. Po zakończeniu stymulacji komórki usunięto i postępowano zgodnie z protokołem producenta zestawu Murine IFN gamma ELISpot Set. Po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej z fosfatazą alkaliczną płytki pozostawiono na noc do wyschnięcia i sygnał pochodzący ze związanego IFN $\gamma$  odczytano za pomocą czytnika płytek Mabtech IRIS™ 2 i zanalizowano z użyciem oprogramowania Mabtech Apex 1.1.

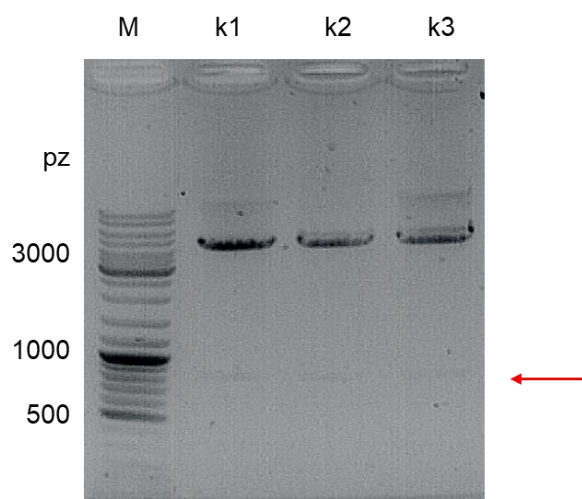
## 8. Wyniki

### 8.1. Opracowanie wydajnej metody produkcji i oczyszczania chimerycznych VLPs opartych na sHBsAg w systemie owadzi

W celu wklonowania sekwencji kodującej sHBsAg wirusa HBV adw2 zaprojektowałam startery zawierające odpowiednie miejsca restrykcyjne (sekwencje w Tabeli 6), których użyłam potem w reakcji PCR. Po przeprowadzeniu reakcji, oczyszczeniu i strawieniu wstawki, zligowałam ją z również odpowiednio strawionym wektorem pFastBac1. Plazmid ten jest używany do stworzenia rekombinowanego bakmidu, który potem stanowi podstawę do otrzymania bakulowirusa i produkcji rekombinowanych białek w systemie owadzi. Po weryfikacji poprawności sekwencji DNA plazmidu pFastBac-sHBsAg zaprojektowałam i zamówiłam fragment genowy (TS) zawierający znacznik Twin-Strep-tag, łącznik -GGGS- oraz sygnał dla enterokinazy (EK). Znacznik ten wybrałam ze względu na możliwość wykorzystania go później w procesie oczyszczania z użyciem chromatografii powinowactwa. Ponadto, zastosowanie takiego podejścia miało na celu skrócić proces oczyszczania – otrzymywanie sHBsAg-VLPs opiera się zazwyczaj na kilkietapowym protokole, zawierającym m.in. różne metody chromatograficzne, ultrawierowanie, dializy czy filtracje<sup>50</sup>. Pomiedzy znacznikiem a sekwencją właściwą sHBsAg dodałam również sygnał dla enterokinazy – jest to proteaza, która dokonuje cięcia proteolitycznego po rozpoznaniu sekwencji Asp-Asp-Asp-Lys (DDDK↓). Zdecydowałam się na taką strategię w razie potrzeby odcięcia znacznika użytego do oczyszczania – szczególnie konieczne w przypadku, gdyby zmienił morfologię lub właściwości immunogenne VLPs. Następnie z użyciem programu NEBuilder Assembly Tool zaprojektowałam startery (Tabela 7) do reakcji składania fragmentu genowego TS z plazmidem pFastBac-sHBsAg – na Rycinie 11 przedstawiono schemat oczekiwanego konstrukt. Po transformacji komórek kompetentnych mieszaniną reakcyjną uzyskałam klony, które następnie potem oczyściłam z użyciem minikolumniek ze złożem krzemionkowym (Ryc. 12) i potwierdziłam poprawność sekwencji DNA za pomocą sekwencjonowania Sangera.

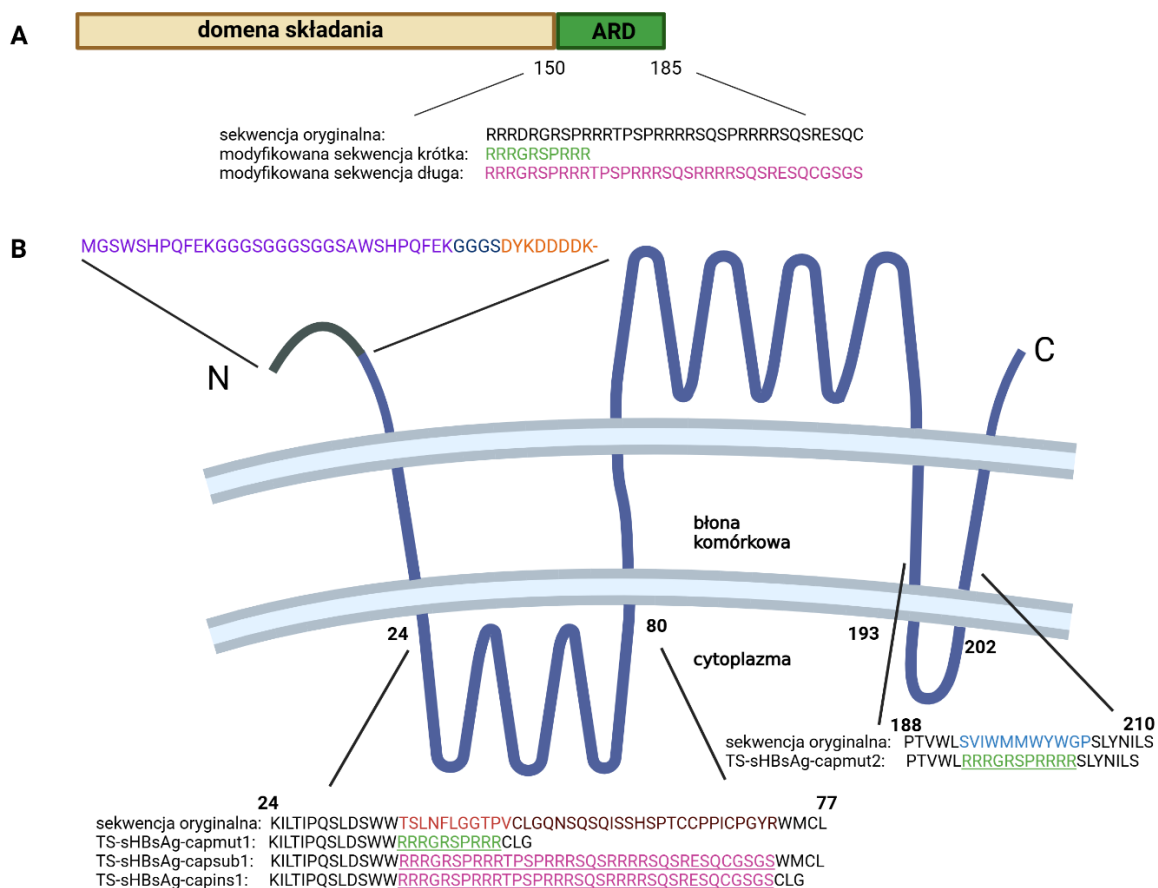


Ryc. 11 Konstrukt TS-sHBsAg na wektorze pFastBac1; EK – sygnał do cięcia dla enterokinazy (DDDK↓).



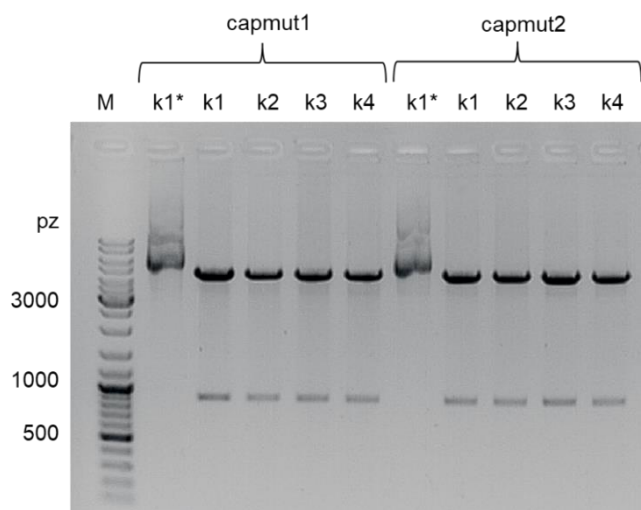
Ryc. 12 Analiza restrykcyjna (BamHI i XbaI) klonów po składaniu plazmidu pFastBac-TS-sHBsAg. Marker GeneRuler. Długość pFastBac1 – 4775 pz, długość wstawki TS-sHBsAg – ok. 800 pz, czerwoną strzałką zaznaczono słabo widoczną wstawkę.

Po zweryfikowaniu sekwencji plazmidu zawierającego sekwencję kodującą TS-sHBsAg zaprojektowałam sekwencje DNA z motywami mającymi za zadanie wiązanie mRNA. Na podstawie danych literaturowych wybrałam sekwencję ARD pochodzącą z kapsydu HBV (której rolą jest właśnie wiązanie kwasów nukleinowych). Zmodyfikowałam ją w celu zwiększenia zasadowego charakteru tej sekwencji i skonstruowałam dwa motywy – krótki i długi (odpowiednio RRRGRSPRRRR i RRRGRSPRRRTSPRRRSQSRRRRSQRRESQCGSG, Ryc. 13A). Różnią się między sobą długością oraz liczbą powtórzeń motywów argininowych – co może mieć wpływ na zdolność do wiązania kwasów nukleinowych<sup>183–185</sup>. Zmiany wprowadziłam za pomocą mutagenyzy miejscowo-insercyjnej (sekwencje użytych starterów zostały podane w Tabeli 8) w miejscach pętli cytozolowych sHBsAg i nowo uzyskane konstrukty nazwałam TS-sHBsAg-capmut1, TS-sHBsAg-capmut2, TS-sHBsAg-capsub1 i TS-sHBsAg-capins1 (Ryc. 13B). Umieszczenie wprowadzenia tych motywów wybrałam na podstawie doniesień, iż zmiany w tych rejonach nie powinny mieć wpływu na składanie się później cząstek wirusopodobnych<sup>165</sup> oraz ich strukturalną lokalizację – domeny te powinny się znajdować wewnątrz VLPs, przez co mogłyby skuteczniej chronić związane mRNA przed nukleazami.

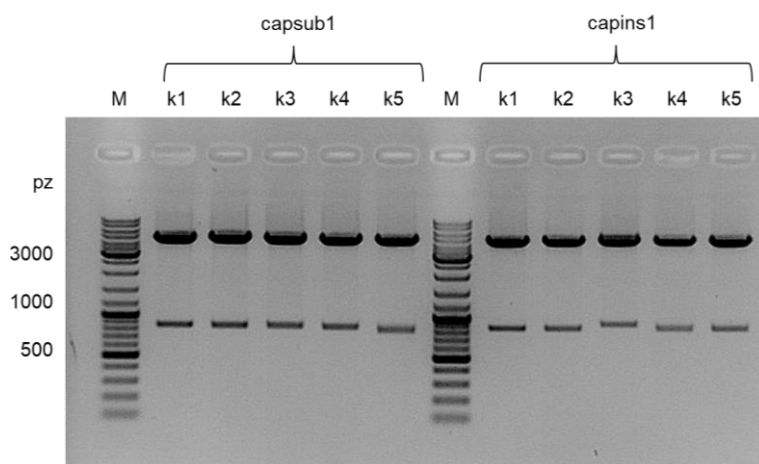


Ryc. 13 Sekwencje chimerycznych TS-sHBsAg. **A** – domeny białka kapsydowego. Domenę ARD zmodyfikowano i stworzono dwa motywy, które to potem wprowadzono do sekwencji TS-sHBsAg. **B** – chimeryczne TS-sHBsAg z zaznaczonymi miejscami wprowadzonych zmian względem sekwencji wyjściowych.

Najpierw uzyskałam plazmidy z wariantami capmut1 i capmut2, które zanalizowałam za pomocą trawienia restrykcyjnego (Ryc. 14) oraz sekwencjonowania Sangera. Następnie przeprowadziłam kolejne mutagenyzy w celu otrzymania wariantów capsu1 i capins1 na bazie matrycy TS-sHBsAg-capmut1 – te plazmidy tak samo zanalizowałam (Ryc. 15). Ostatecznie uzyskałam plazmidy kodujące wariant wyjściowy (TS-sHBsAg) oraz cztery kodujące jego zmodyfikowane wersje (TS-sHBsAg-capmut1, TS-sHBsAg-capmut2, TS-sHBsAg-capsu1 i TS-sHBsAg-capins1). Konstrukty te wykorzystałam potem w dalszych badaniach, skupiając się na analizie procesu składania się w VLPs oraz potencjału do wiązania mRNA.



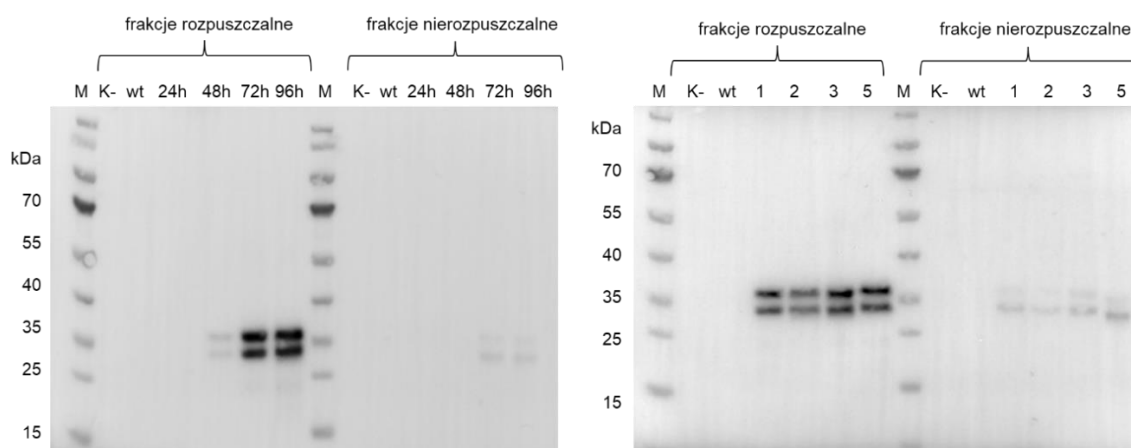
Ryc. 14 Analiza restrykcyjna (BamHI i XbaI) klonów po mutagenezie miejscowo-insercyjnej do uzyskania wariantów capmut1 i capmut2. Marker GeneRuler, długość pFastBac – 4775 pz, długość wstawek – ok. 800 pz, \* - próbka nietrawiona.



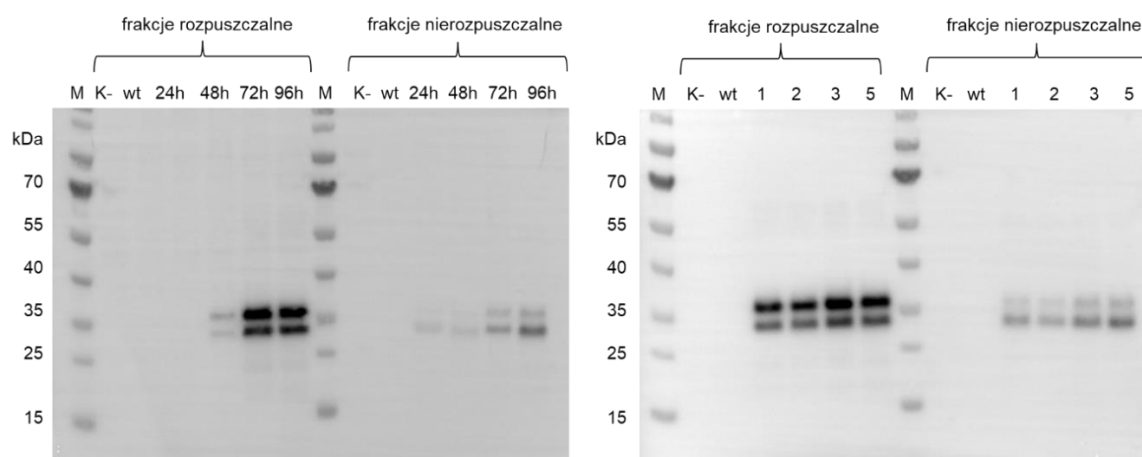
Ryc. 15 Analiza restrykcyjna (BamHI i XbaI) klonów po mutagenezie miejscowo-insercyjnej do uzyskania wariantów capsul1 i capins1. Marker GeneRuler, długość pFastBac – 4775 pz, długość wstawek: capsul1 – ok. 800 pz, capins1 – ok. 900 pz.

Po potwierdzeniu poprawności sekwencji nukleotydowej otrzymanych plazmidów przystąpiłam do konstrukcji rekombinowanych bakmidów, z których miały powstać później rekombinowane bakulowirusy. Do tego celu wykorzystałam komórki *E. coli* DH10Bac Max Efficiency zawierające szkielet genomu bakulowirusa w formie bakmidu oraz plazmid pomocniczy kodujący transpozazę, za pomocą której dochodzi do transpozycji z wektora donorowego pFastBac1 do bakmidu. Po transformacji tych komórek plazmidami donorowymi i selekcji klonalnej namnożyłam bakmidy oraz je oczyściłam. Następnie użyłam ich do transfekcji komórek linii owadziej Sf9. Otrzymałam pasażę wirusa P0, które potem posłużyły do amplifikacji do pasażę wirusa P1 i P2. W pasażach P1

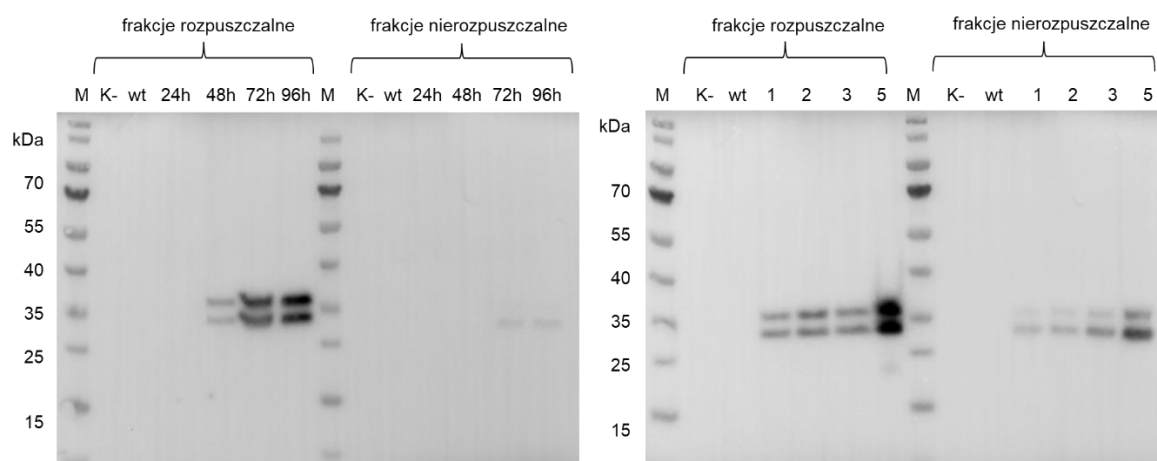
miana bakulowirusów okazały się za niskie, więc zdecydowałam na amplifikację do pasażu P2. Po miareczkowaniu pasaży P2, w których udało mi się uzyskać satysfakcjonujące miana (rzędu  $4 \times 10^7$  pfu/ml wzwyż do maksymalnie  $1 \times 10^8$  ffu/ml), przeprowadziłam eksperymenty celem optymalizacji czasu inkubacji oraz inokulum wirusa. W związku z faktem, iż w systemie owadziim sHBsAg nie jest wydzielane na zewnątrz komórek, konieczne jest go oczyszczanie z lizatów komórkowych. W ramach pracy przetestowałam kilka wersji buforu lizującego (dane nieprzedstawione) i zdecydowałam się na bufor zawierający 2% Tween20 jako detergent do solubilizacji (Metody 7.26). Po analizie nadprodukcji białek w różnych odstępach czasu po infekcji jako najbardziej optymalny punkt wybrałam 96 h – ze względu na największą zawartość białka we frakcji rozpuszczalnej. Niestety, w związku z tym, iż nie udało się uzyskać wysokich mian wszystkich rekombinowanych bakulowirusów pozwalających na powtarzalne infekcje przy MOI 5, za najbardziej optymalne określiłam MOI 3 – które też charakteryzuje się wysokim poziomem produkcji rekombinowanego białka. Wyniki dotyczące analiz czasu inkubacji i MOI zostały pokazane na Rycinach 16-20 dla każdego wariantu rekombinowanego TS-sHBsAg. Wykryłam również obecność dwóch form białka TS-sHBsAg – są to formy nieglikozylowana i glikozylowana (glikozylowana migruje wolniej ze względu na zwiększoną masę cząsteczkową)<sup>186</sup>, których obecność powtarzała się w kolejnych eksperymentach.



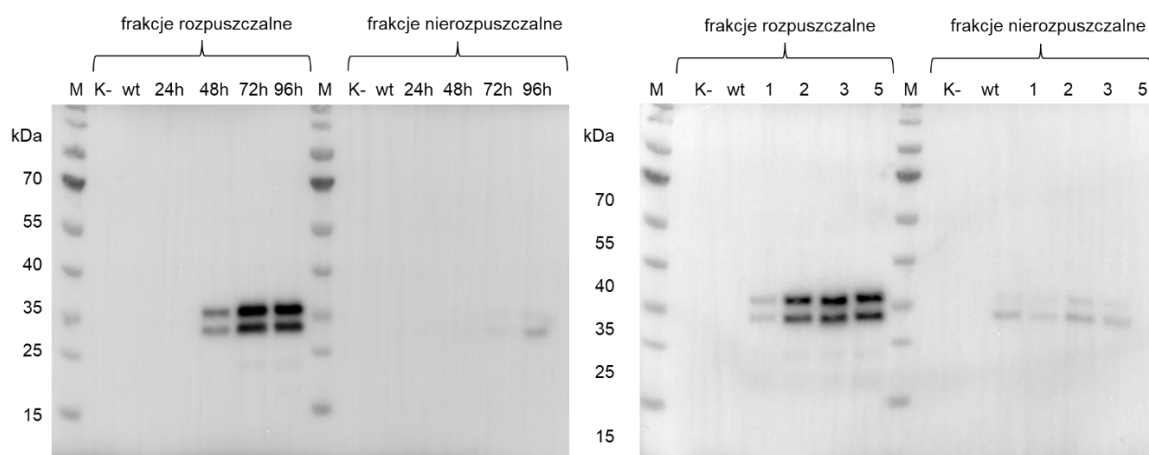
Ryc. 16 Immunodetekcja TS-sHBsAg przeciwciałami anti-HBsAg we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych po lizie komórek owadziim. Oczekiwana wielkość białka – ok. 30 kDa, marker PageRuler. **A** – analiza nadprodukcji w różnych czasach inkubacji po infekcji. **B** – analiza nadprodukcji przy różnych MOI. Widoczne są dwie formy białka – nieglikozylowana (mniejsza masa cząsteczkowa) oraz glikozylowana.



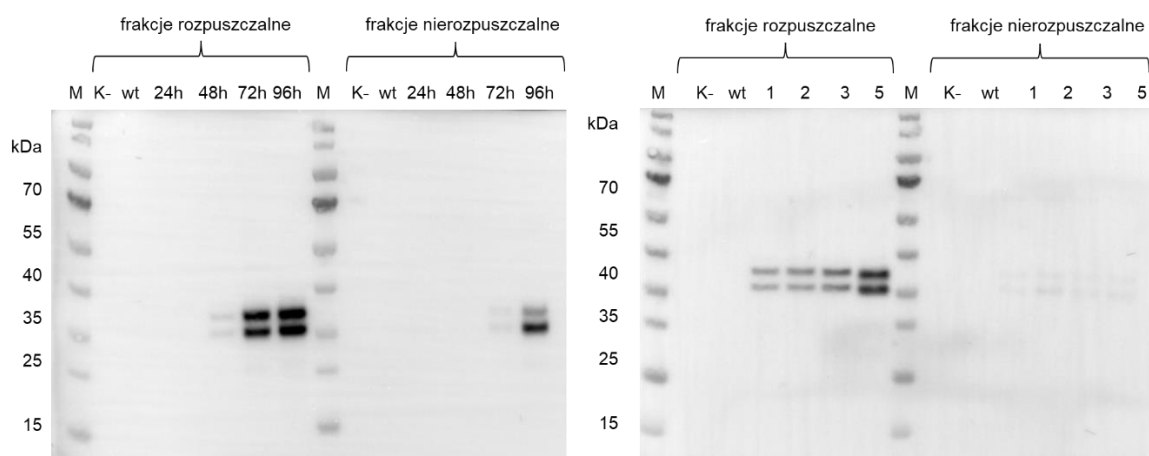
Ryc. 17 Immunodetekcja TS-sHBsAg-capmut1 przeciwciałami anti-HBsAg we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych po lizie komórek owadzych. Oczekiwana wielkość białka – ok. 30 kDa, marker PageRuler. **A** – analiza nadprodukcji w różnych czasach inkubacji po infekcji. **B** – analiza nadprodukcji przy różnych MOI. Widoczne są dwie formy białka – nieglikozylowana (mniejsza masa cząsteczkowa) oraz glikozylowana.



Ryc. 18 Immunodetekcja TS-sHBsAg-capmut2 przeciwciałami anti-HBsAg we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych po lizie komórek owadzych. Oczekiwana wielkość białka – ok. 30 kDa, marker PageRuler. **A** – analiza nadprodukcji w różnych czasach inkubacji po infekcji. **B** – analiza nadprodukcji przy różnych MOI. Widoczne są dwie formy białka – nieglikozylowana (mniejsza masa cząsteczkowa) oraz glikozylowana.



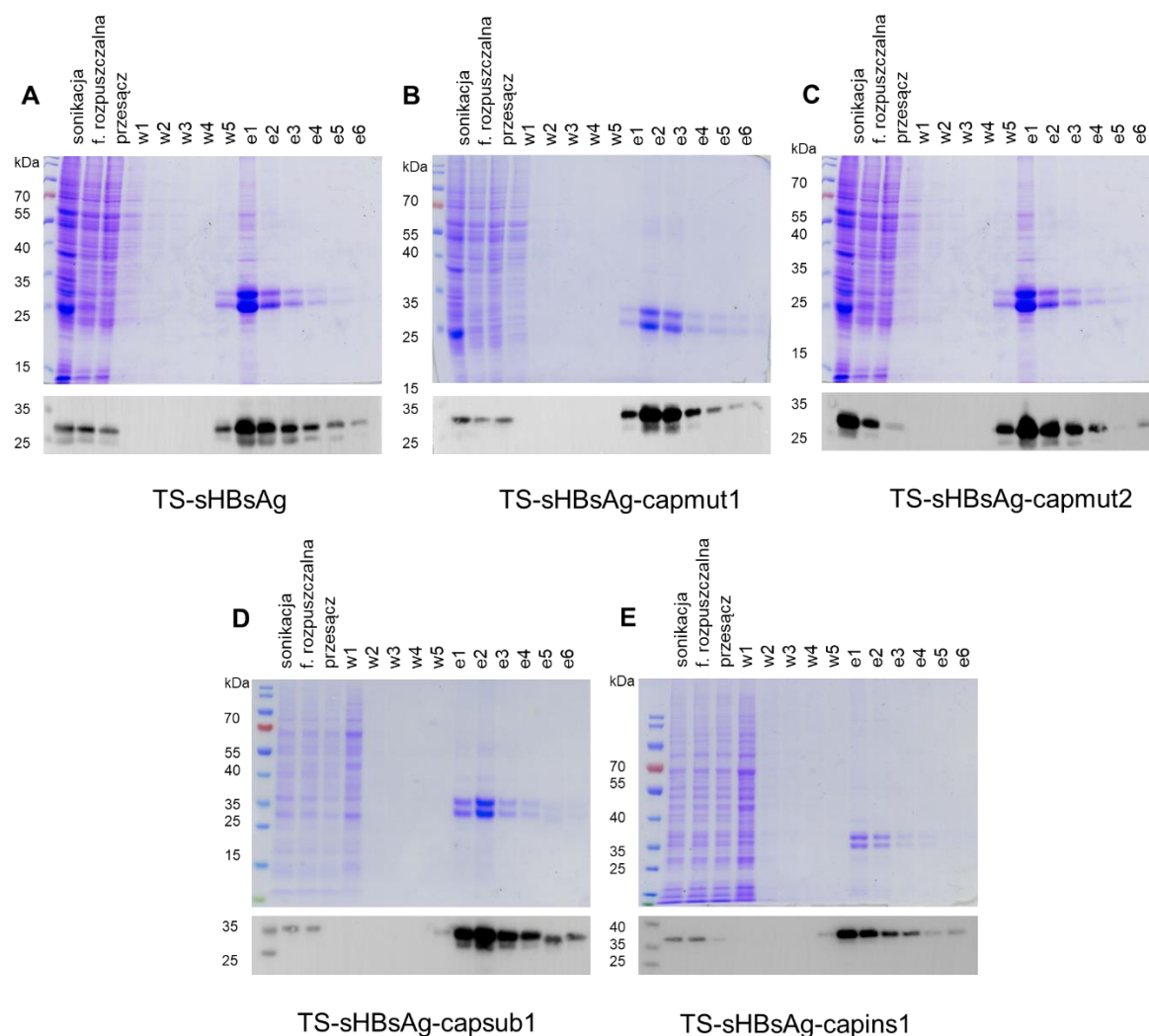
Ryc. 19 Immunodetekcja TS-sHBsAg-capsub1 przeciwciałami anti-HBsAg we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych po lizie komórek owadzych. Oczekiwana wielkość białka – ok. 30 kDa, marker PageRuler. **A** – analiza nadprodukcji w różnych czasach inkubacji po infekcji. **B** – analiza nadprodukcji przy różnych MOI. Widoczne są dwie formy białka – nieglikozylowana (mniejsza masa cząsteczkowa) oraz glikozylowana.



Ryc. 20 Immunodetekcja TS-sHBsAg-capins1 przeciwciałami anti-HBsAg we frakcjach rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych po lizie komórek owadzych. Oczekiwana wielkość białka – ok. 33 kDa, marker PageRuler. **A** – analiza nadprodukcji w różnych czasach inkubacji po infekcji. **B** – analiza nadprodukcji przy różnych MOI. Widoczne są dwie formy białka – nieglikozylowana (mniejsza masa cząsteczkowa) oraz glikozylowana.

Po ustaleniu najbardziej optymalnych warunków do produkcji rekombinowanych białek sHBsAg w komórkach owadzych przeprowadziłam nadprodukcję dla TS-sHBsAg na większą skalę (30 ml), celem oczyszczenia za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnie ze streptawidyną. Frakcję rozpuszczalną po lizie z dodatkiem Tween20 oraz nukleazy Viscolase nałożyłam na kolumnę Strep-Tactin® 4Flow® high capacity column, charakteryzującą się wysoką pojemnością złoża (wiązanie 20 mg białka na 1 ml złoża). Po zebraniu frakcji z płukania białko eluowałam za pomocą buforu z dodatkiem destiobiotyny. W efekcie uzyskałam rekombinowane białko

o dużym stopniu czystości we frakcjach elucyjnych, co potwierdziła immunodetekcja przeciwciałami anti-HBsAg oraz barwienie Coomassie Brilliant Blue (Ryc. 21A). Zaobserwowałam w tych frakcjach obecność prążków o masach molekularnych odpowiadających monomerom TS-sHBsAg (forma glikozylowana oraz nieglikozylowana, o których już wspomniano wcześniej). Analogicznie przeprowadziłam procedurę izolacji oraz analizy dla pozostałych wariantów, dla których uzyskałam podobne wyniki (Ryc. 21B-E). Po oczyszczeniu frakcje elucyjne zostały połączone i następnie określiłam stężenie białek w próbkach za pomocą testu BCA. Każdy z wariantów rekombinowanych białek został oczyszczony z 30 ml hodowli w trzech niezależnych powtórzeniach, na podstawie których obliczyłam średni uzysk z nadprodukcji. Wyniki przedstawiono w Tabeli 10 – warianty niemodyfikowany ze znacznikiem Twin-Strep-tag oraz capsul1 charakteryzują się największym uzyskiem białka z takiej objętości hodowli.

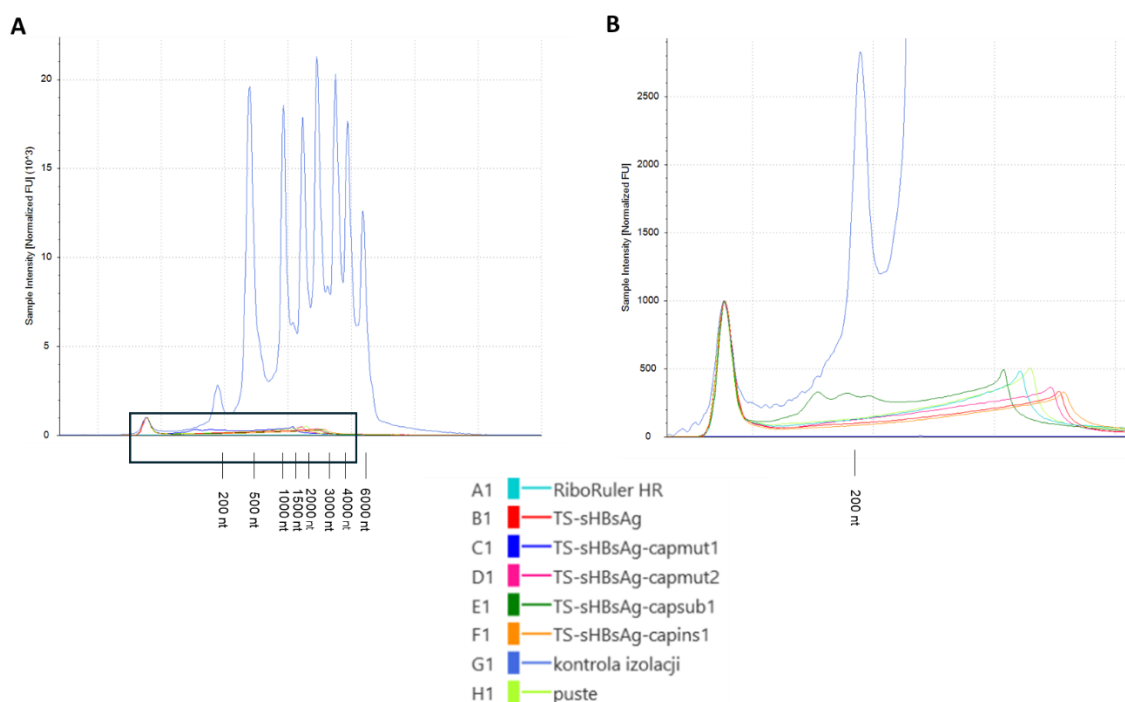


Ryc. 21 Analiza poszczególnych frakcji po oczyszczeniu za pomocą chromatografii powinowactwa dla wszystkich wariantów TS-sHBsAg. Górny panel dla każdego wariantu – barwienie Coomassie Brilliant Blue R-250, dolny – immunodetekcja rekombinowanych sHBsAg przeciwciałami anti-HBsAg. Marker PageRuler, oczekiwana wielkość białka: ok. 30 kDa (ok. 33 kDa dla capsin1).

Tabela 10. Średni uzysk oczyszczonych białek rekombinowanych.

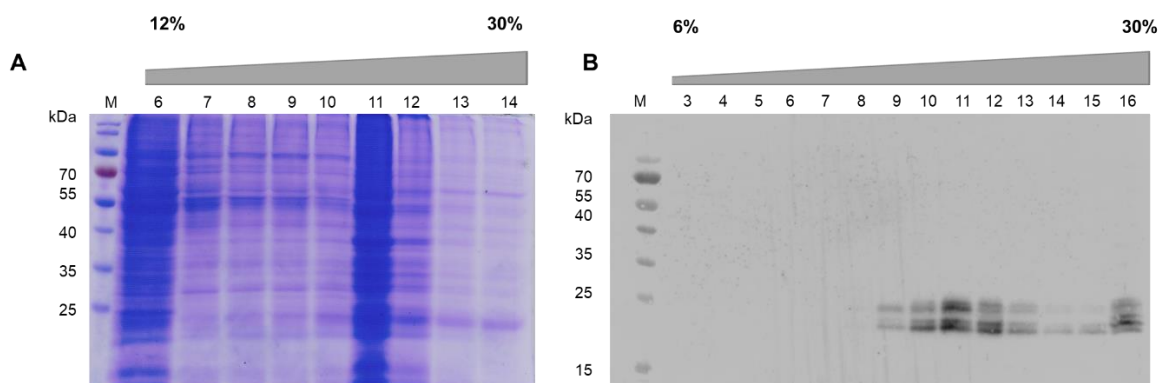
wariant	uzysk z 30 ml hodowli [ $\mu\text{g}$ ]	przewidywany uzysk z 1 l hodowli [mg]
TS-sHBsAg	$739,3 \pm 41,36$	24,6
TS-sHBsAg-capmut1	$423,3 \pm 17,56$	14,1
TS-sHBsAg-capmut2	$326,5 \pm 89,90$	10,9
TS-sHBsAg-capsub1	$623,7 \pm 25,38$	20,8
TS-sHBsAg-capins1	$457,0 \pm 42,23$	15,2

Przeprowadziłam również analizę obecności endogennych RNA i DNA w VLPs pochodzenia owadziego lub bakulowirusowego. Do tej procedury użyłam po 100  $\mu\text{g}$  VLPs każdego z wariantów. Po izolacji kwasów nukleinowych określiłam ich stężenie za pomocą spektrofлуorymetru oraz wykonałam elektroforezę w celu oceny, czy w próbkach znajdują się fragmenty endogennego RNA pozostałe po oczyszczaniu (Ryc. 22). Stężenia RNA i DNA dla każdego z wariantów były niemal identyczne jak dla kontroli negatywnej (zawierającej tylko bufor, w którym znajdowały się VLPs). Rozdział elektroforetyczny również nie potwierdził obecności specyficznych fragmentów RNA w żadnej z próbek.



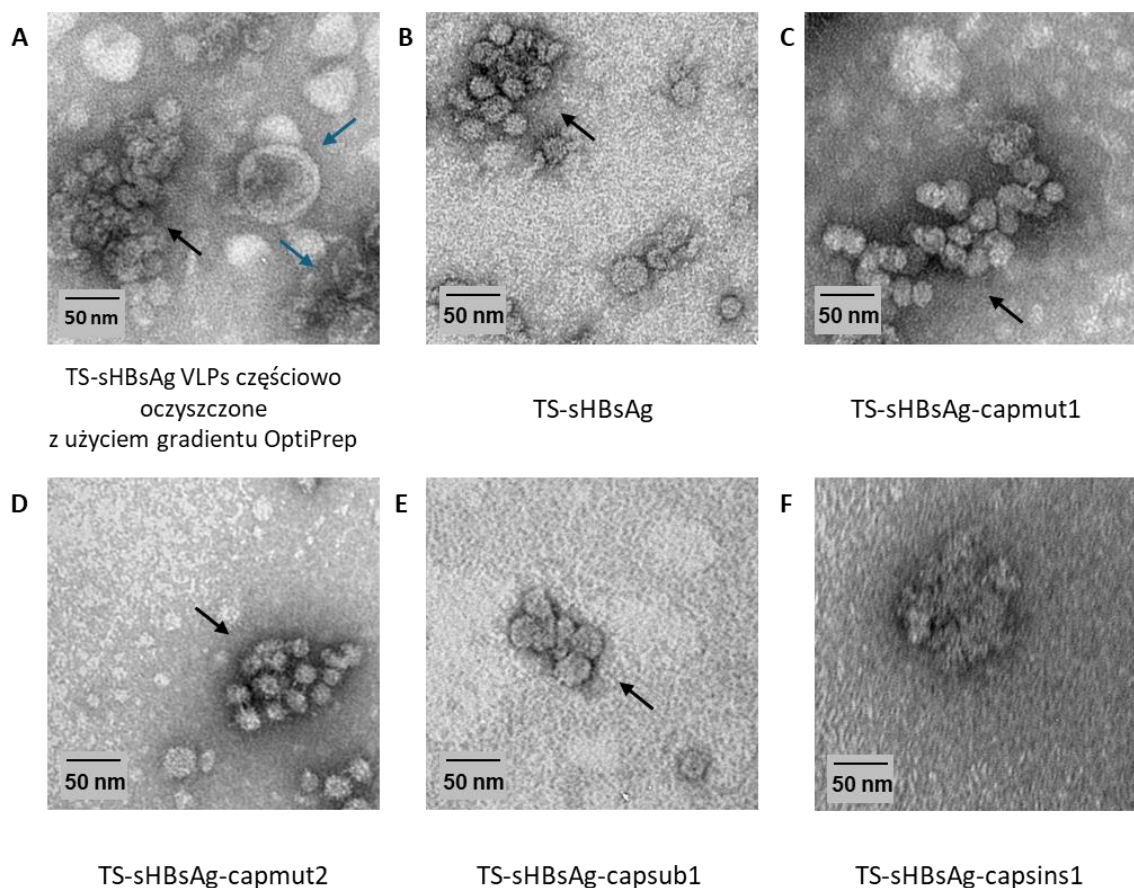
Ryc. 22 Rozdział elektroforetyczny fragmentów RNA dla próbek po izolacji z wariantów VLPs (wynik reprezentatywny). **A** – wykres przedstawiający wszystkie próbki oraz marker masowy RNA. **B** – powiększony fragment z wykresu A.

Następnie za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronicznej oraz dynamicznego rozpraszania światła sprawdziłam czy oczyszczone warianty TS-sHBsAg są w stanie samoistnie składać się do VLPs. W ramach porównania morfologii i wielkości uzyskanych cząstek, oczyściłam również VLPs oparte na TS-sHBsAg z użyciem ultrawierowania w gradiencie OptiPrep według procedury już wcześniej opisanej<sup>187</sup>. Frakcje po ultrawierowaniu (każda po ok. 0,5 ml) również rozdzieliłam na żelach SDS-PAGE w celu sprawdzenia, w których frakcjach znajduje się białko (Ryc. 23). Do późniejszych analiz wybrano frakcje 9-12.



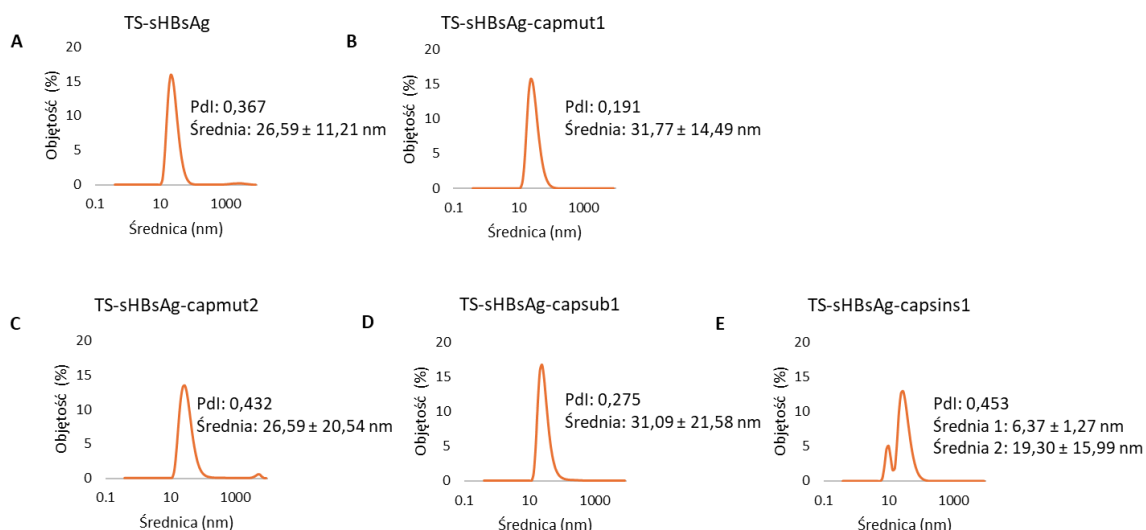
Ryc. 23 Analiza poszczególnych frakcji po ultrawierowaniu w gradiencie Opti-Prep. **A** – barwienie Coomassie Brilliant Blue R-250. **B** – immunodetekcja sHBsAg przeciwciałami anti-HBsAg. Marker PageRuler.

Próbki do TEM i DLS odpowiednio rozcieńczyłam i przygotowałam według metod opisanych w punktach 7.27 i 7.28. Na Rycinie 24 pokazano mikrografie otrzymanych VLPs. Potwierdziłam składanie się w cząstki wszystkich konstruktów oprócz jednego z wariantów (capins1, Ryc. 24F). Cząstki uzyskane po oczyszczaniu na złożu ze streptawidyną były podobne pod względem wielkości oraz morfologii do cząstek uzyskanych po ultrawierowaniu. Średnica cząstek wyniosła około 22 nm, co jest zgodne z danymi literaturowymi<sup>57,187</sup>. Na mikroografiach przedstawiających cząstki uzyskane po chromatografii powinowactwa (Ryc. 24B-E) nie stwierdziłam obecności pęcherzyków komórkowych, które z kolei w dużej liczbie są obecne w próbce po ultrawierowaniu (Ryc. 24A).



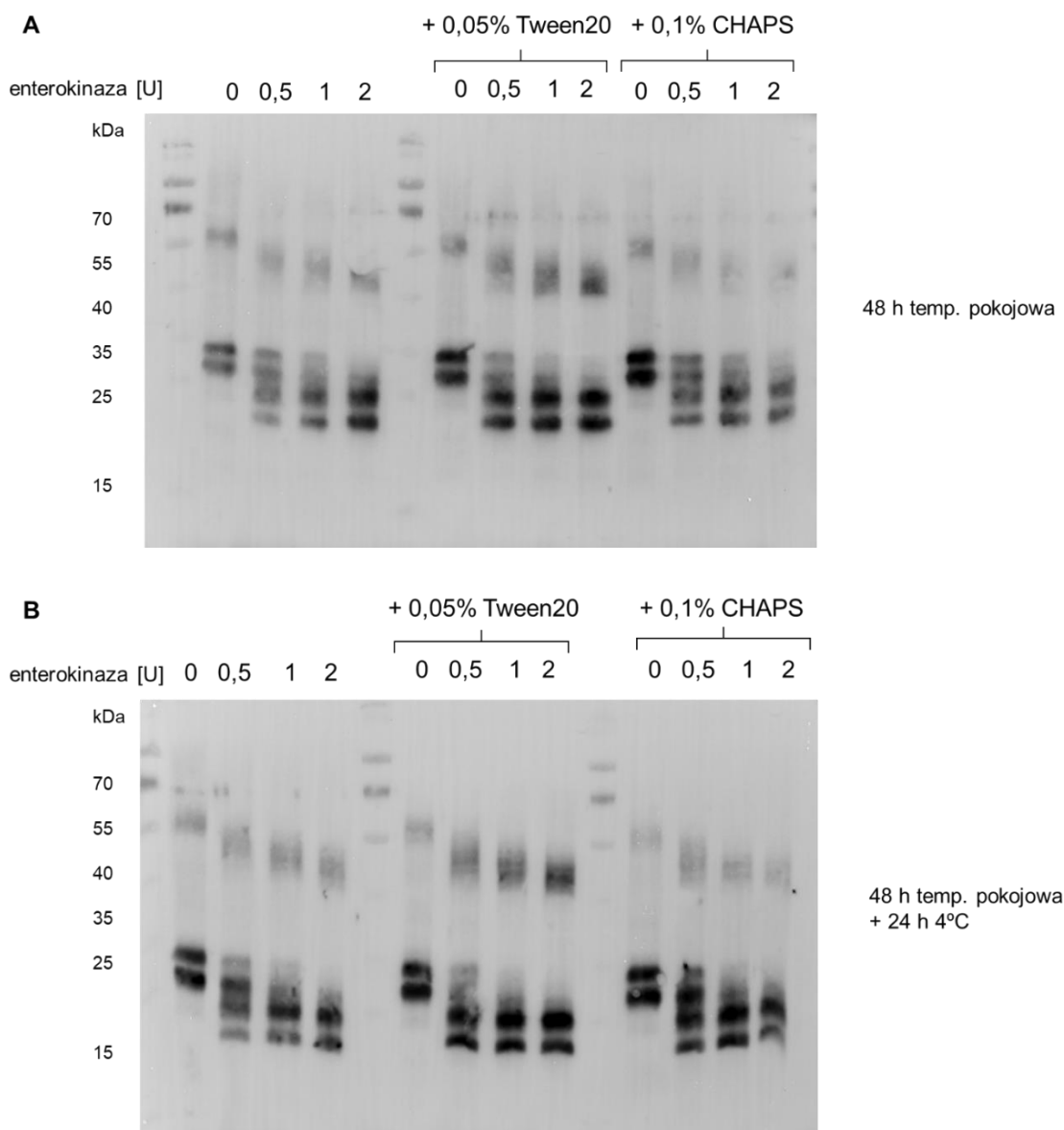
Ryc. 24 Transmisyjna mikroskopia elektronowa uzyskanych VLPs. Wielkość uzyskanych cząstek – ok. 22 nm. Czarnymi strzałkami zaznaczono skupiska VLPs, niebieską – pęcherzyki komórkowe.

Do analizy DLS użyłam oprogramowania Zetasizer. Pomiar przeprowadziłam w trzech powtórzeniach, każdy po 10 pomiarów, które następnie uśredniono. Dla wariantów TS-sHBsAg, -capmut1, -capmut2 i -capsub1 uzyskałam pojedyncze piki odpowiadające średnicy ok. 26-32 nm (Ryc. 25A-D), co sugeruje homogenność próbek w tym zakresie wielkości. Dla wariantu capsins1 nie udało mi się uzyskać podobnych wyników – analiza rozkładu objętości cząstek (Ryc. 25E) pokazuje obecność dwóch rodzajów cząstek w mieszaninie. Średnica VLPs określona za pomocą DLS różni się od średnicy cząstek obserwowanych za pomocą TEM – jest to związane ze sposobem przygotowania próbek. Przy użyciu TEM można zmierzyć faktyczny rozmiar cząstki, natomiast w DLS mierzony jest promień hydrodynamiczny cząstek.



Ryc. 25 Analiza dynamicznego rozpraszania światła dla uzyskanych VLPs. Dla każdego wariantu uzyskano wykresy rozkładu objętości cząstek w próbce. Pdl – stopień polidispersyjności.

Sprawdziłam również, czy możliwe będzie odcięcie znacznika Twin-Strep-tag za pomocą enterokinazy. Enzym ten wybrałam ze względu na fakt, iż cięcie następuje po sekwencji aminokwasowej specyficznej dla tego enzymu. Znacznik został umieszczony na N-końcu rekombinowanego białka, więc zaprojektowałam miejsce cięcia tak, aby po zajściu reakcji uzyskać białka jak najbardziej zbliżone do natywnych pod względem struktury. W ramach tego eksperymentu sprawdziłam, czy dodatek detergentu (0,05% Tween20 lub 0,1% CHAPS) wpłynie na szybkość i wydajność reakcji cięcia. Zbadałam również, czy ilość użytego enzymu będzie miała również wpływ na te parametry. Próbki inkubowałam przez 48 h w temperaturze pokojowej i następnie 24 h w 4°C. Po każdym 24 h inkubacji rozdzieliłam próbki w 12% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturująco-redukujących (Ryc. 26) i przeprowadziłam immunodetekcję z użyciem przeciwciał anti-HBsAg. W wyniku cięcia enterokinazą wielkość rekombinowanego białka powinna zmniejszyć się o ok. 5 kDa. Po 24 h inkubacji w temperaturze pokojowej doszło do częściowego odcięcia znacznika we wszystkich badanych warunkach reakcji (dane niepokazane). Po upływie kolejnych 24 h, w próbkach z dodatkiem 0,05% Tween20 i dwoma jednostkami enzymu, trawienie zaszło niemal całkowicie (Ryc. 26A). Kolejna inkubacja, tym razem w 4°C, tylko zwiększyła wydajność cięcia – zaszło ono również w próbkach bez dodatku detergentu (Ryc. 26B). Na podstawie uzyskanych danych można stwierdzić, że dodatek 0,05% Tween20 do mieszaniny reakcyjnej wpływa pozytywnie w większym stopniu na efektywność cięcia oraz 1 jednostka enterokinazy jest optymalną ilością enzymu na 10 µg VLPs w tych warunkach.



Ryc. 26 Immunodetekcja sHBsAg przeciwciałami anti-HBsAg po odcięciu znacznika Twin-Strep-tag z konstruktu TS-sHBsAg za pomocą enterokinazy w różnych warunkach. **A** – próbki po inkubacji 48 h w temperaturze pokojowej. **B** – próbki po dodatkowej inkubacji przez 24 h w 4°C. Marker PageRuler, oczekiwana wielkość białka bez znacznika: ok. 25 kDa, ze znacznikiem – 30 kDa. Widoczne są również formy glikozylowane i nieglikozylowane białka oraz dimeryczne.

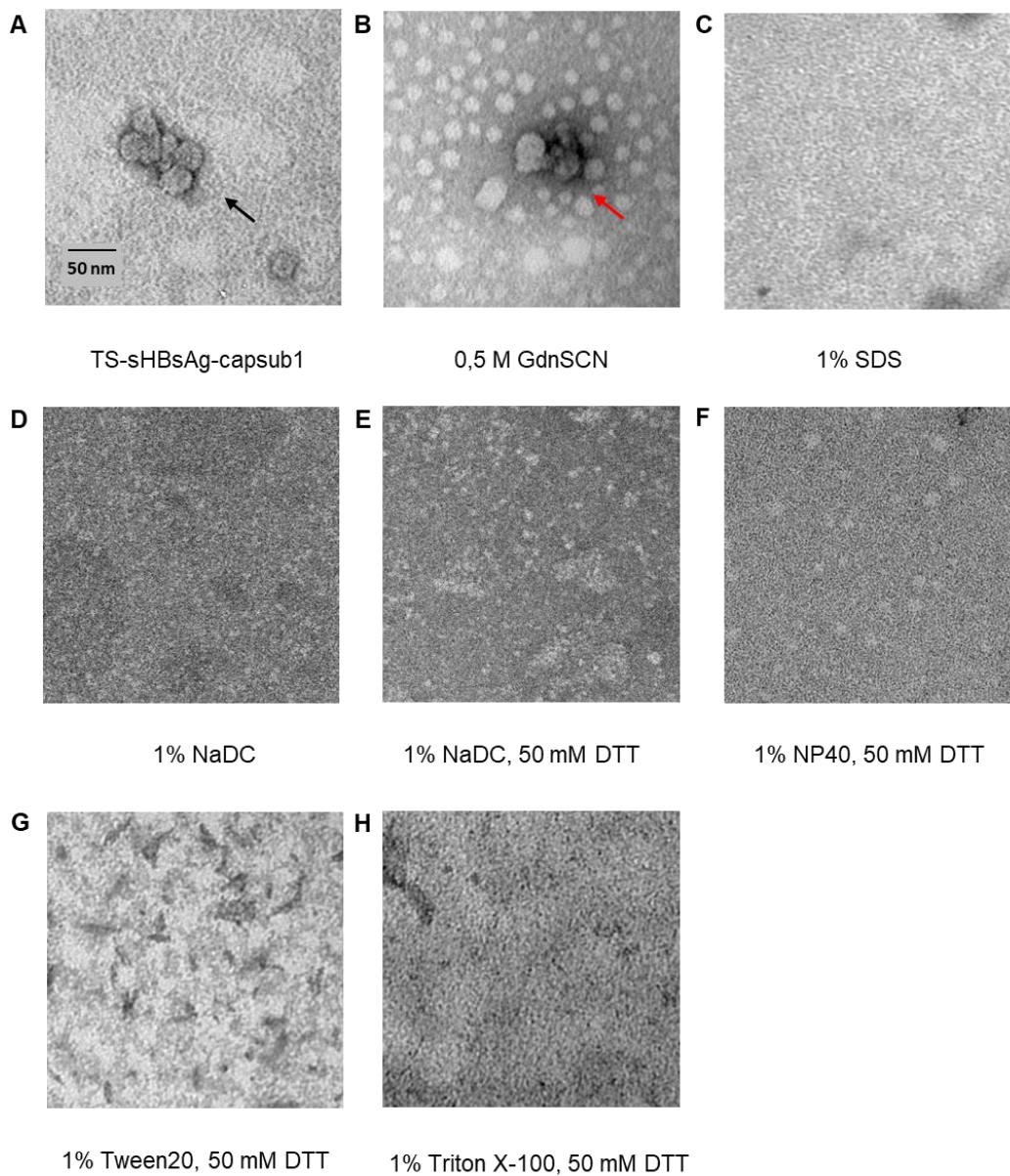
W toku pracy sprawdziłam również szereg czynników denaturujących oraz detergentów celem analizy możliwości rozłożenia VLPs na mniejsze podjednostki. Do tak rozłożonych VLPs miało później zostać zapakowane mRNA, które potem planowałam złożyć ponownie – taki proces z powodzeniem można przeprowadzić w przypadku cząstek opartych o białka kapsydowe wirusów. Wszystkie użyte odczynniki, detergenty i ich stężenia podano w Tabeli 11. Każdy z użytych buforów zawierał 100 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, rekombinowane białko

TS-sHBsAg-capsub1 w stężeniu 0,1 µg/µl oraz wybrany dodatek. Próbkę zanalizowałam za pomocą DLS (z uwzględnieniem zmienionej lepkości buforów) oraz TEM.

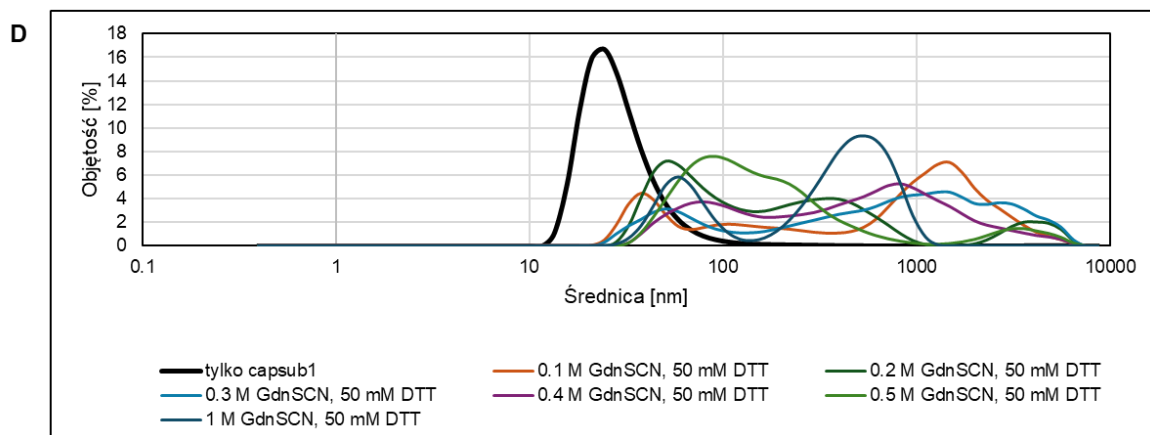
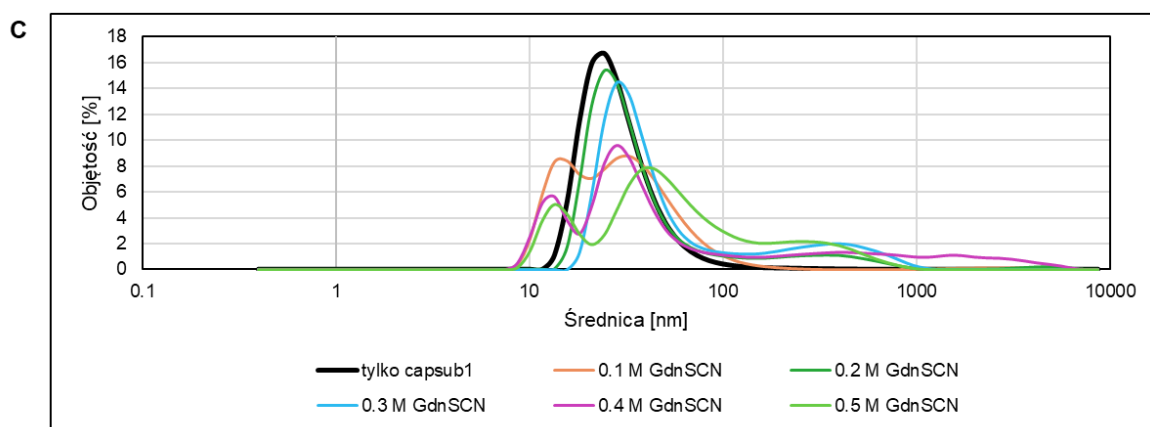
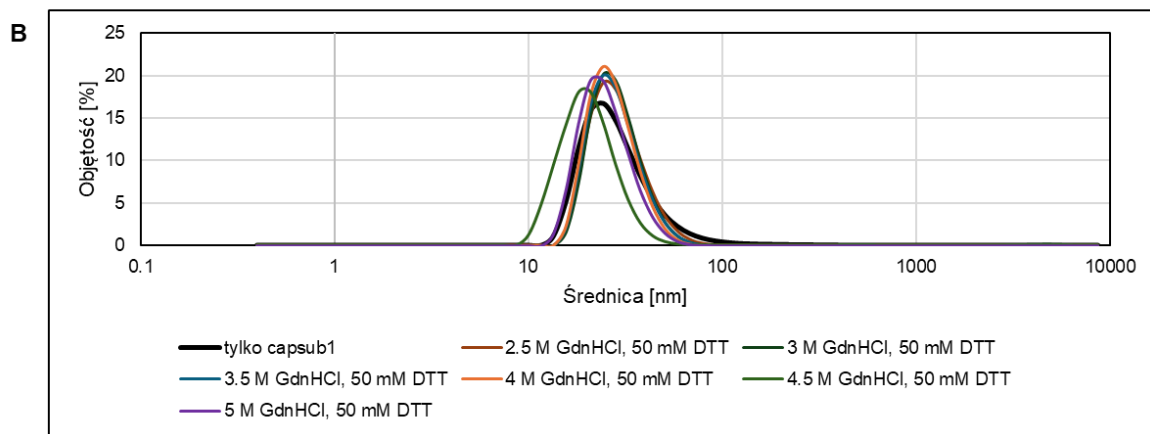
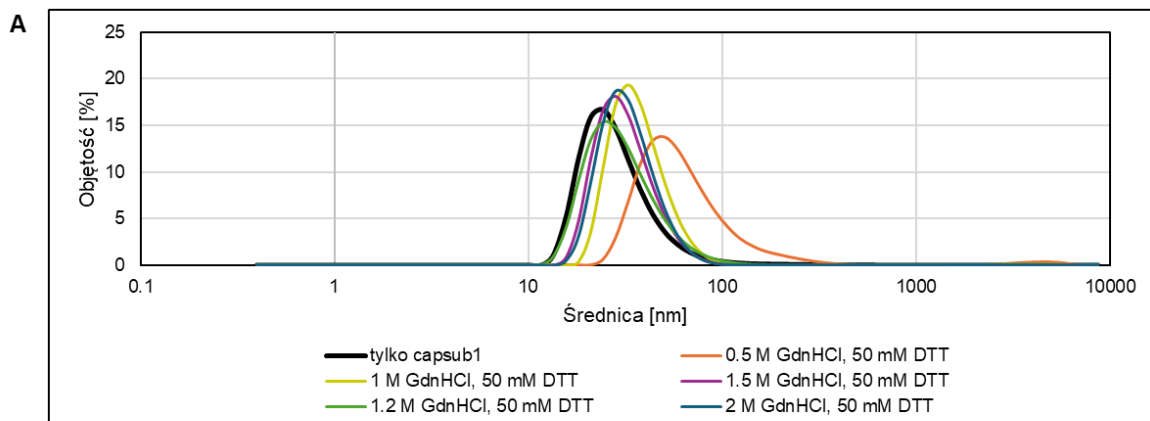
W przypadku zastosowania czynników denaturujących takich jak GdnHCl czy GdnSCN w stężeniach w zakresie 0,1 – 5 M nie zaobserwowałam efektywnego rozkładania się cząstek na mniejsze podjednostki (Ryc. 27B, Ryc. 28 A-D). Przy zastosowaniu GdnSCN i DTT nastąpiło jednak przesunięcie rozkładu objętości na wykresie w stronę wyższych wartości średnic cząstek (Ryc. 28D), co sugeruje powstawanie agregatów. Natomiast w przypadku użycia detergentów z dodatkiem lub bez DTT następuje przesunięcie maksimum wykresu w stronę mniejszych średnic (Ryc. 28E-J), podobnych lub identycznych jak dla próbek zawierających tylko detergent w danym stężeniu, co sugeruje powstanie kompleksów detergentu z białkiem. Wszystkie badane stężenia detergentów znajdowały się powyżej krytycznego stężenia formowania się miceli (ang. critical micelle concentration, CMC). Na zdjęciach TEM (Ryc. 27C-H) również nie zaobserwowałam struktur o wielkości i morfologii VLPs, czy struktur oligomerycznych. Na podstawie tych wyników stwierdziłam, że jedynie użycie detergentu powoduje rozkładanie się VLPs opartych na sHBsAg na mniejsze podjednostki. Późniejsze próby usunięcia detergentu z próbek nie powiodły się i skutkowały formacją agregatów o średnicy ok. 1000 nm (dane niepokazane).

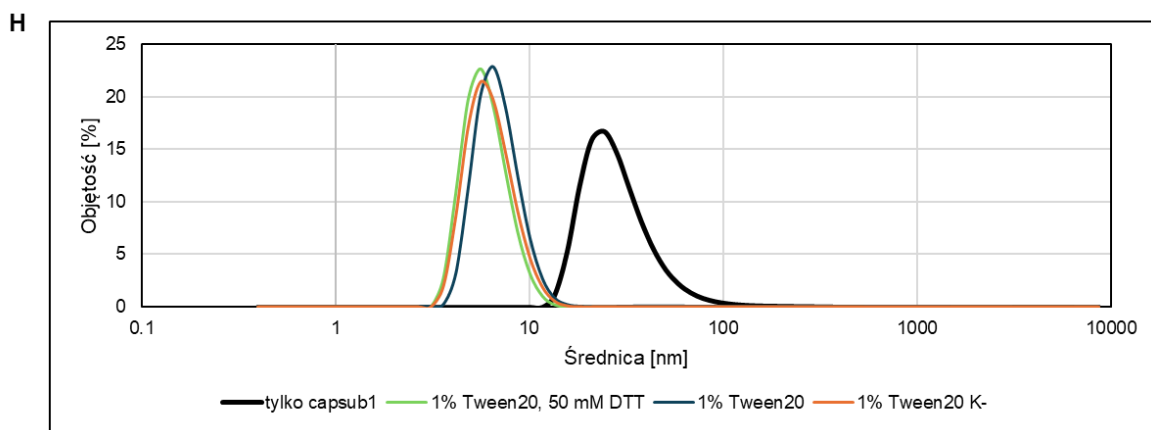
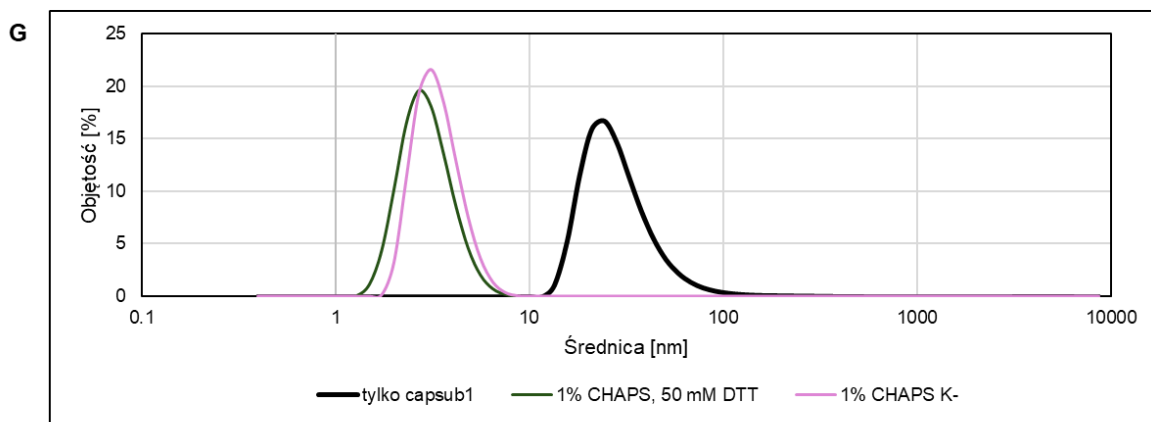
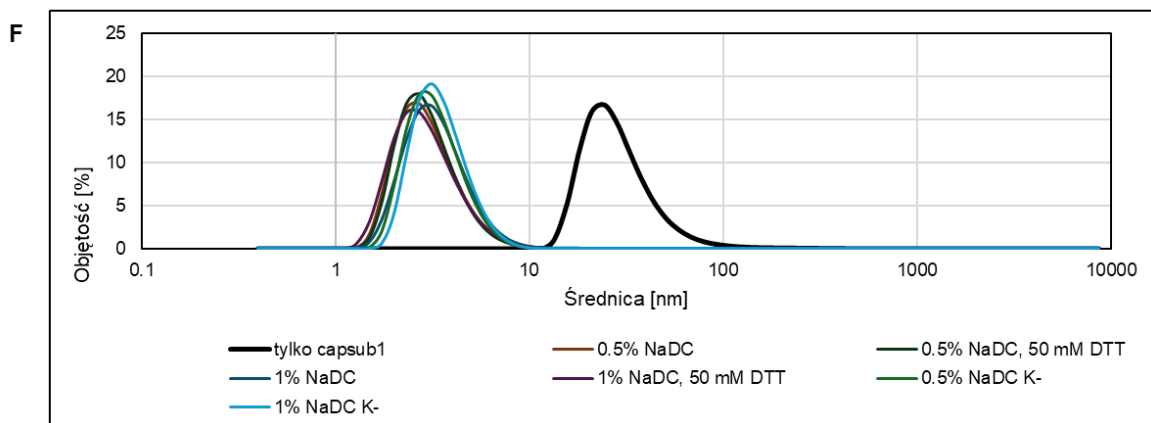
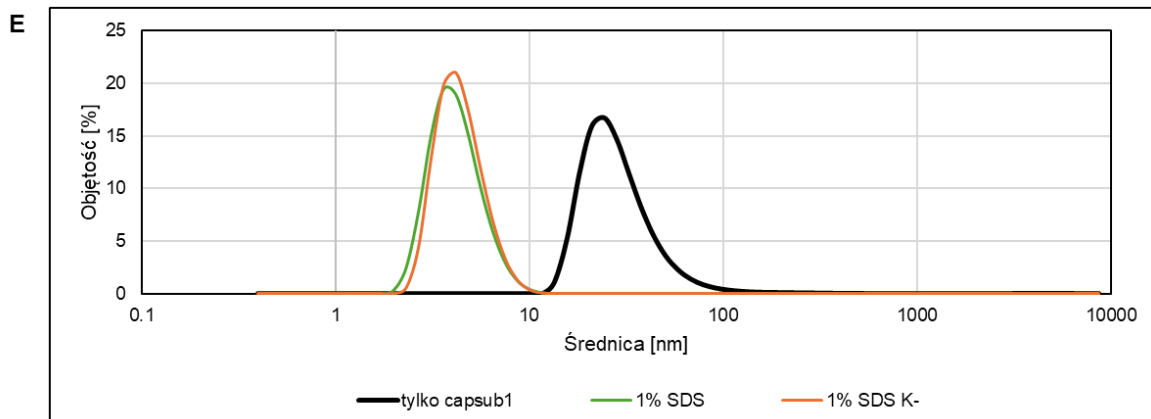
Tabela 11. Formulacja buforów użytych do rozkładania VLPs

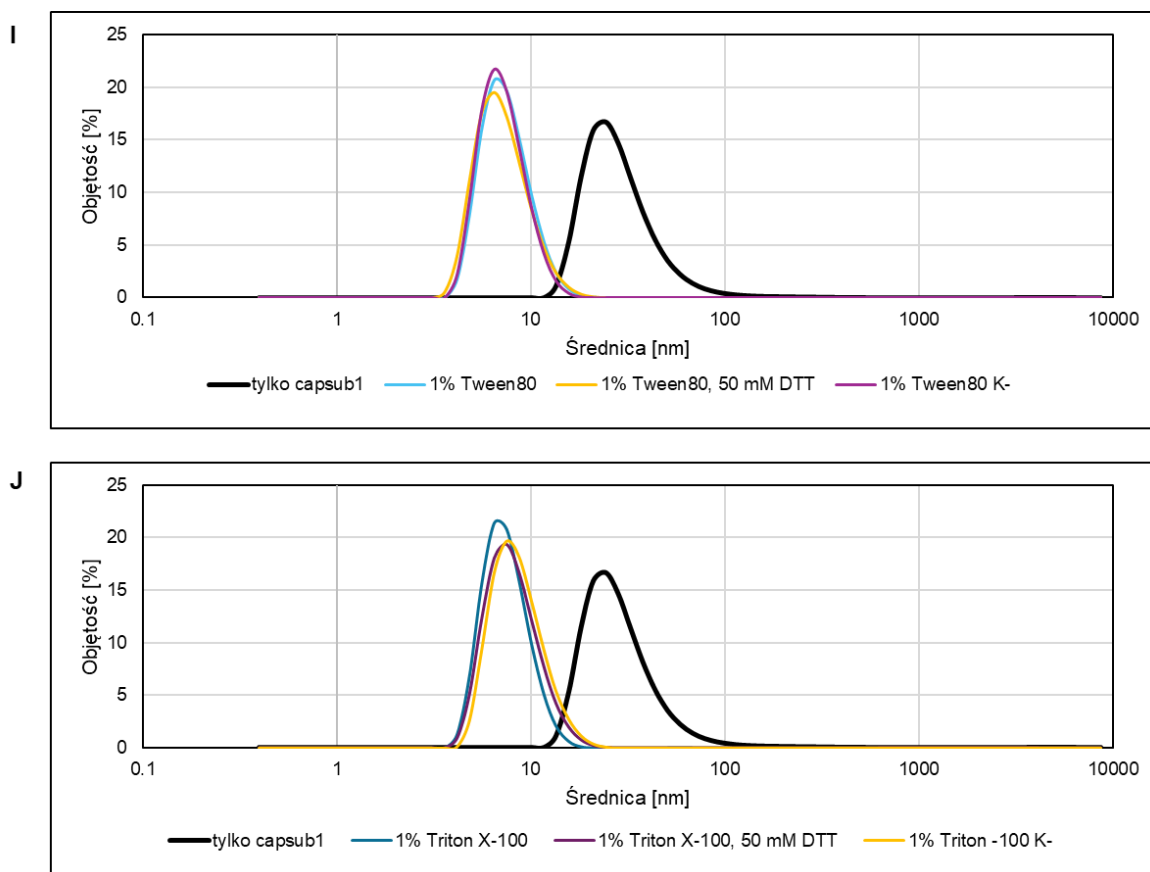
Lp.	Skład	Lp.	Skład
1	0.5 M GdnHCl, 50 mM DTT	19	0,2 M GdnSCN 50 mM DTT
2	1 M GdnHCl, 50 mM DTT	20	0,3 M GdnSCN 50 mM DTT
3	1.2 M GdnHCl, 50 mM DTT	21	0,4 M GdnSCN 50 mM DTT
4	1.5 M GdnHCl, 50 mM DTT	22	0,5 M GdnSCN 50 mM DTT
5	2 M GdnHCl, 50 mM DTT	23	1 M GdnSCN, 50 mM DTT
6	2,5 M GdnHCl, 50 mM DTT	24	1 % SDS
7	3 M GdnHCl, 50 mM DTT	25	0.5% NaDC
8	3,5 M GdnHCl, 50 mM DTT	26	0.5% NaDC, 50 mM DTT
9	4 M GdnHCl, 50 mM DTT	27	1% NaDC
10	4,5 M GdnHCl, 50 mM DTT	28	1% NaDC, 50 mM DTT
11	5 M GdnHCl, 50 mM DTT	29	1% CHAPS, 50 mM DTT
12	0,1 M GdnSCN	30	1% NP40, 50 mM DTT
13	0,2 M GdnSCN	31	1% Tween20
14	0,3 M GdnSCN	32	1% Tween20, 50 mM DTT
15	0,4 M GdnSCN	33	1% Tween80
16	0,5M GdnSCN	34	1% Tween80, 50mm DTT
17	1 M GdnSCN	35	1% Triton X-100, 50 mM DTT
18	0,1 M GdnSCN 50 mM DTT		



Ryc. 27 Analiza rozkładania VLPs dla wybranych buforów. **A** – kontrola negatywna, nierozłożone VLPs (średnica ok. 22 nm); **B-H** – VLPs z dodatkami czynników denaturujących, redukujących i detergentów, w takiej samej skali jak na mikrografii **A**.





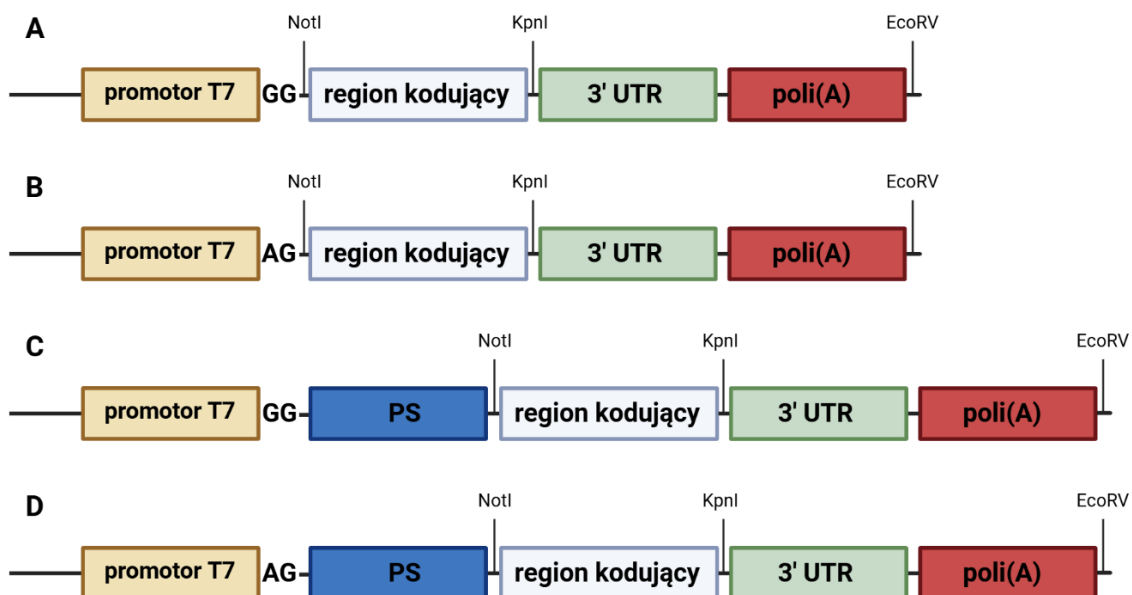


Ryc. 28 Analiza rozkładu objętości cząstek w próbach rozkładania VLPs w różnych warunkach. Do analiz użyto wariantu capsub1 (ok. 31 nm średnicy w analizie DLS). K- – bufor + detergent. Każdą próbkę zmierzono w trzech powtórzeniach (10 pomiarów w każdym) i uśredniony wynik pokazano na wykresie.

## 8.2. Zaprojektowanie matrycy do transkrypcji mRNA oraz wiązanie do VLPs

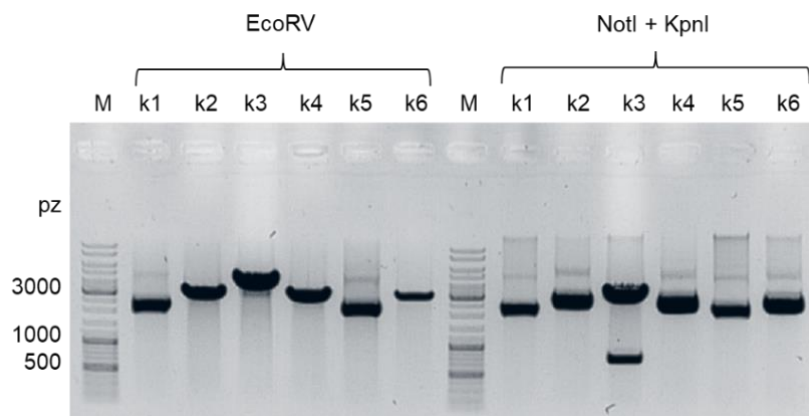
Wyjściową matrycę do transkrypcji mRNA *in vitro* (Ryc. 29A, IVT GG) zaprojektowałam na podstawie danych literaturowych. Jako sekwencji kodującej użyłam gen białka EGFP, 3' UTR pochodzi z regionu niekodującego 3' dla  $\beta$ -globiny *Xenopus laevis*<sup>188</sup> i na końcu dołączyłam ogon poli(A) o długości 128 adenin. Obecność 3' UTR w dużej mierze wpływa na stabilność mRNA i efektywność translacji – w tej roli najlepiej się sprawdzają sekwencje UTR  $\beta$ -globiny<sup>105</sup>. Ogon poli(A) również ma ogromny wpływ na wymienione wcześniej parametry – optymalna długość to ok. 120-128 nukleotydów<sup>105,111</sup>. Są dwa sposoby na wprowadzenie go do cząsteczki mRNA: wprowadzenie tej sekwencji od razu na matrycy – wtedy uzyskuje się cząsteczki mRNA z ogonem poli(A) jednakowej długości; drugim sposobem jest dodanie go enzymatycznie po zakończonej reakcji transkrypcji – jednak jego długość zależy wtedy od warunków reakcji<sup>189</sup> i wymaga odpowiedniej optymalizacji, aby reakcja była jak najbardziej powtarzalna. W związku z tym zdecydowałam się na dodanie sekwencji poli(A) już na matrycy. Po zaprojektowaniu konstruktu został on zsyntetyzowany przez firmę Eurofins Genomics (Niemcy) i następnie wklonowałam

go do plazmidu pJET1.2/blunt za pomocą enzymów restrykcyjnych NotI i EcoRV. Wektor ten wybrałam ze względu na obecność sekwencji dla promotora polimerazy RNA faga T7. Potem zaprojektowałam kolejne konstrukty – aby móc prowadzić reakcję transkrypcji z czapeczką typu CleanCap AG (zmiana pierwszego nukleotydu po sekwencji promotora z G na A – Ryc. 29B) i następnie wprowadziłam również zmodyfikowaną sekwencję sygnałową pochodzącą z genomu HBV<sup>40</sup> (Ryc. 29C-D). Zadaniem tej sekwencji miało być specyficzne wiązanie do modyfikowanych motywów z domeny ARD, dzięki czemu możliwe byłoby wiązanie lub pakowanie mRNA do rekombinowanych wariantów sHBsAg-VLPs, a poza tym służyć też jako 5' UTR. Opisane zmiany wprowadziłam na matrycy wyjściowej (IVT GG) za pomocą mutagenyzy miejscowo-insercyjnej (sekwencje starterów podano w Tabeli 9).

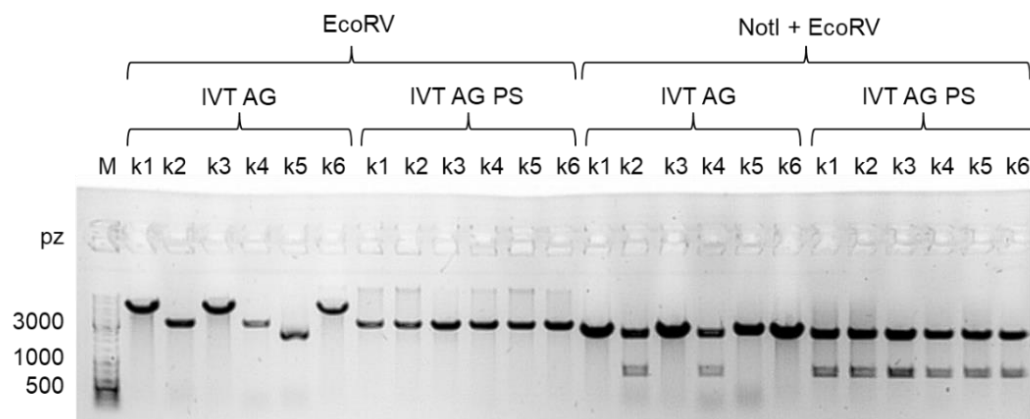


Ryc. 29 Konstrukty użyte do transkrypcji mRNA *in vitro*. **A** – IVT GG, **B** – IVT AG, **C** – IVT GG PS, **D** – IVT AG PS. PS – sekwencja sygnałowa pakująca pochodząca z genomu HBV.

Plazmidy do transkrypcji *in vitro* zostały namnożone w komórkach *E. coli* NEB stable, które są odpowiednie dla wektorów zawierających powtórzenia i niestabilne sekwencje. Po analizie restrykcyjnej matryc po mutagenyzy (Ryc. 30-31) wybrałam klony, które posiadały poprawne długości fragmentów po trawieniu enzymatycznym (IVT GG – klon 3, IVT AG – klon 2, IVT PS AG – klon 3) i dodatkowo zweryfikowałam je poprzez sekwencjonowanie Sangera.

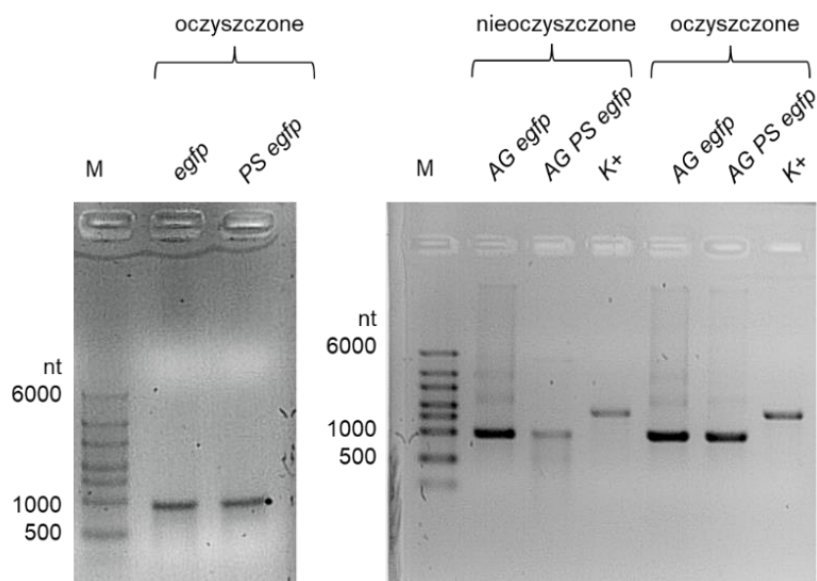


Ryc. 30 Analiza restrykcyjna klonów po mutagenezie miejscowo-insercyjnej do konstruktowi IVT GG PS. Plazmidy strawiono jednym (zliniowanie matryc, weryfikacja długości całego konstruktowi) lub dwoma enzymami (weryfikacja obecności wstawki). Marker GeneRuler, oczekiwana długość całego konstruktowi po mutagenezie: ok. 3900 pz; długość wstawki po trawieniu NotI i KpnI – ok. 720 bp.



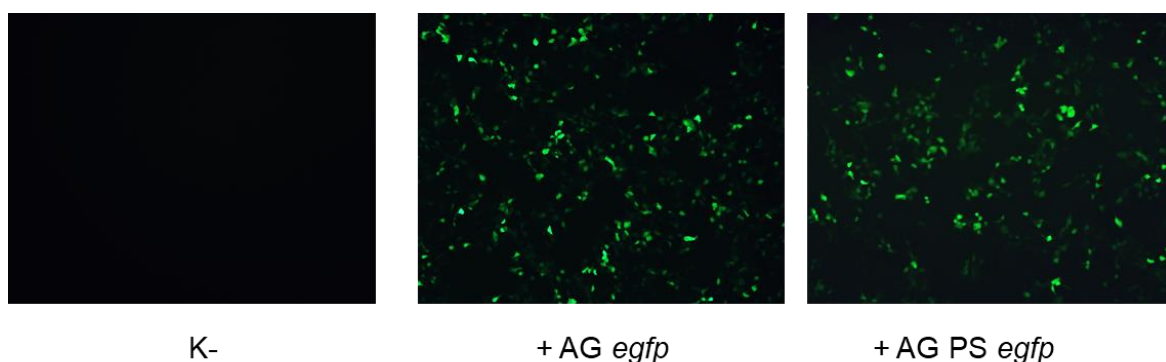
Ryc. 31 Analiza restrykcyjna klonów po mutagenezie miejscowo-insercyjnej do konstruktowi IVT AG i IVT AG PS. Plazmidy strawiono jednym (zliniowanie matryc, weryfikacja długości całego konstruktowi) lub dwoma enzymami (weryfikacja obecności wstawki). Marker GeneRuler, oczekiwana długość całego konstruktowi po mutagenezie: ok. 3900 pz; długość wstawki po trawieniu NotI i EcoRV – ok. 1000 bp.

Po potwierdzeniu poprawności sekwencji nukleotydowych i wybraniu odpowiednich klonów przeprowadziłam transkrypcję mRNA *in vitro* zgodnie z protokołem producenta z matrycami kodującymi białko EGFP bez lub z czapczką CleanCap AG. Po reakcji IVT wyjściową matrycę DNA strawiłam DNAzą, a mRNA wytrąciłam z roztworu za pomocą chlorku litu i przepłukałam 70% etanolem. W osobnej probówce wykonałam również reakcję kontrolną z wektorem pochodzącym z zestawu producenta. Następnie otrzymane mRNA rozdzieliłam w żelu agarozowym celem oceny jakości oraz długości produktu (Ryc. 32) i zmierzyłam jego stężenie za pomocą spektrofлуorymetru. Uzyskałam stężenie zgodne z protokołem producenta (ok. 100 µg mRNA z 20 µl reakcji).



Ryc. 32 Analiza długości i jakości otrzymanego mRNA kodującego EGFP. K+ – kontrola pozytywna reakcji z zestawu do IVT. Marker – RiboRuler HR; oczekiwana długość mRNA kodującego EGFP – ok. 1000 nt; oczekiwana długość mRNA kontroli pozytywnej – ok. 1760 nt.

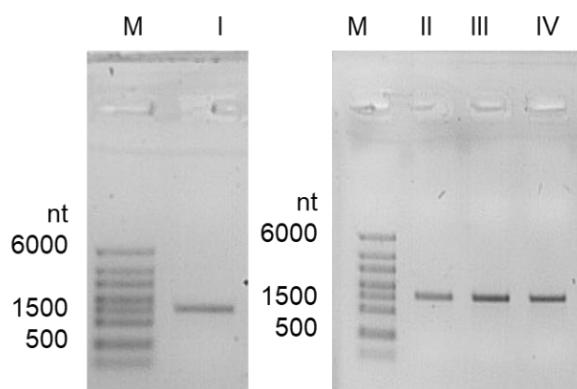
W celu sprawdzenia, czy wyprodukowane mRNA kodujące białko zielonej fluorescencji z czapeczką CleanCap AG jest funkcjonalne, wykorzystałam je do transfekcji komórek linii HEK293T z użyciem odczynnika Lipofectamine MessengerMAX. Następnie za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego sprawdziłam, czy zachodzi produkcja białka EGFP. Po 16 h od transfekcji zaobserwowałam pojawienie się białka EGFP w komórkach (Ryc. 33) w obu wersjach użytego mRNA (AG *egfp* i AG PS *egfp*).



Ryc. 33 Komórki HEK293T 16 godzin po transfekcji mRNA kodującym EGFP.

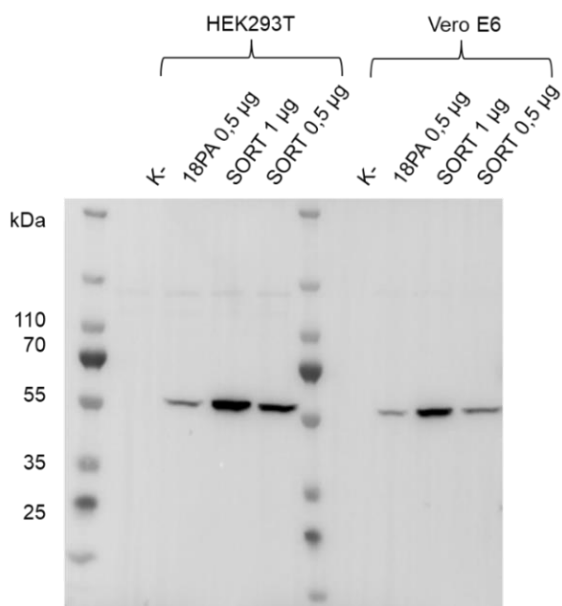
Po potwierdzeniu prawidłowości i funkcjonalności konstruktów do transkrypcji, do dalszych badań związanych z immunizacją myszy wybrałam matrycę IVT AG PS (do transkrypcji z czapeczką CleanCap oraz sekwencją sygnałową jako 5' UTR), w której sekwencję kodującą białko EGFP zamieniłam na sekwencję kodującą białko NP wirusa grypy typu A H5N1. Uzyskane mRNA miało

zostać zanalizowane pod kątem wywoływania odpowiedzi immunologicznej u myszy. Dodatkowo, podczas transkrypcji zamiast urydyny użyłam N1-metylo-pseudourydyny (aby zwiększyć stabilność uzyskanego produktu i poziomu produkcji białka w komórkach docelowych<sup>116</sup>). Po wstępnym oczyszczeniu wyprodukowanego mRNA za pomocą chlorku litu (Ryc. 34) zostało ono wysłane do Laboratorium Chemii Biologicznej w Centrum Nowych Technologii Uniwersytetu Warszawskiego, żeby oczyścić je za pomocą chromatografii HPLC. Ze względu na wysoką specyficzność tego procesu, mającego na celu usunięcie pojedynczych nukleotydów oraz dwuniciowych RNA, z początkowej ilości ok. 1800 µg, otrzymałam końcowo około 400 µg mRNA.



Ryc. 34 Analiza długości i jakości otrzymanego mRNA kodującego NP w czterech reakcjach z czapeczką CleanCap AG i mψ1. Marker RiboRuler HR; oczekiwana długość mRNA – ok. 1850 nukleotydów.

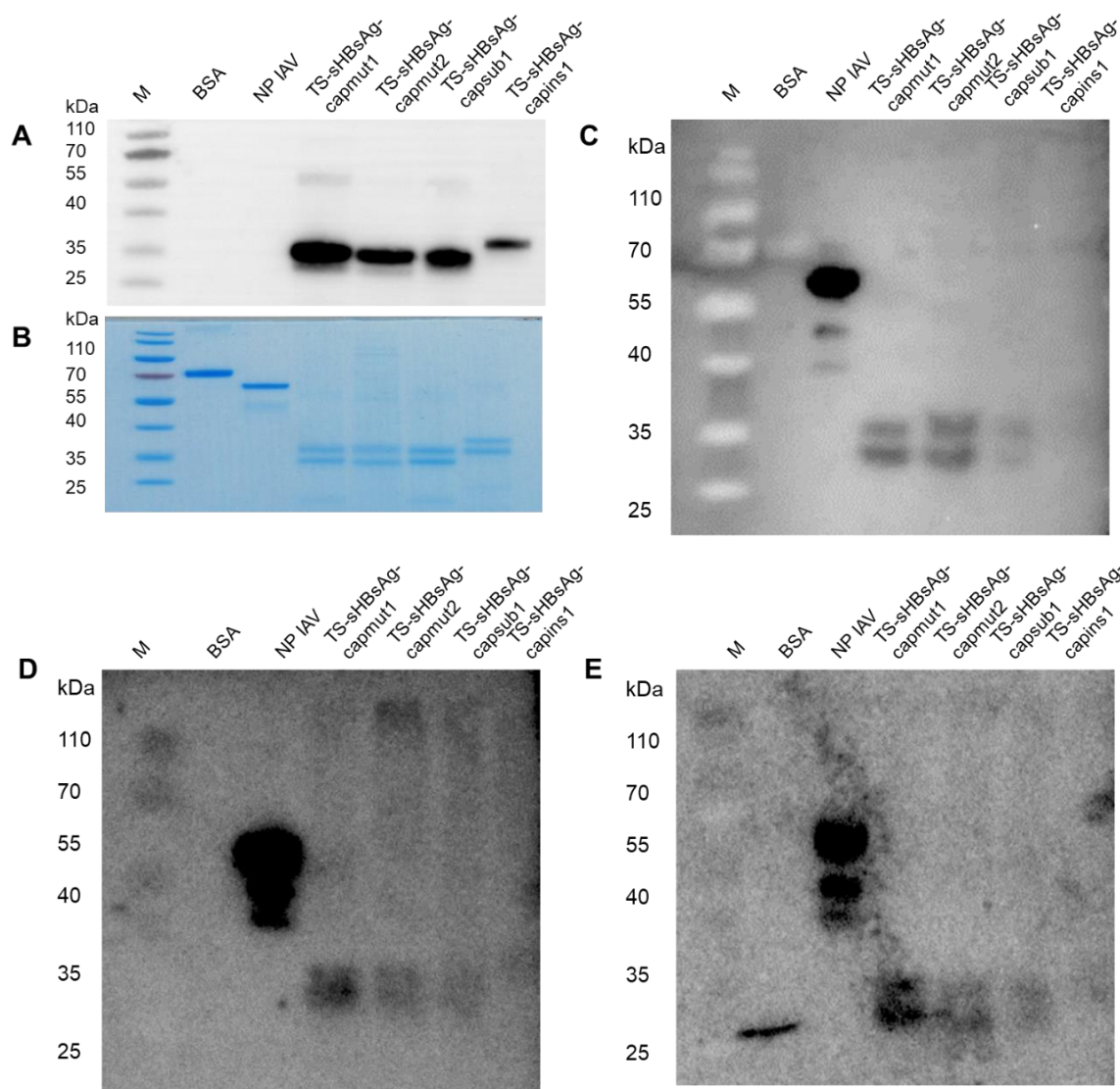
Sprawiłam również, czy mRNA oczyszczone za pomocą HPLC jest nadal funkcjonalne. W tym celu użyłam nanocząstek lipidowych typu SORT 4A3-SC8 (kierowanie do wątroby) oraz SORT 4A3-SC8-18PA (kierowanie do śledziony)<sup>122</sup> do transfekcji komórek HEK293T oraz Vero E6 (Ryc. 35). Po upływie ok. 16 h od transfekcji sprawdziłam, czy w lizatach komórkowych znajduje się NP z użyciem specyficznych przeciwciał anti-NP. Potwierdziłam obecność tego białka w lizatach komórek transfekowanych z użyciem obu formułacji LNPs.



Ryc. 35 Immunodetekcja NP w lizatach komórkowych HEK293T i Vero E6 po transfekcji mRNA kodującym NP, oczyszczonym na HPLC i zapakowanym do nanocząstek lipidowych. K- – kontrola negatywna, nietransfekowana; 18PA (SORT 4A3-SC8-18PA, kierowanie do śledziony), SORT (SORT 4A3-SC8, kierowanie do wątroby) – typy nanocząstek lipidowych niosących NP-mRNA. Marker PageRuler, oczekiwana wielkość białka NP – ok. 55 kDa.

W ramach badań sprawdziłam również funkcjonalność wiązania mRNA do rekombinowanych wariantów białka TS-sHBsAg (capmut1, capmut2, capsul1 i capins1). W tym celu przeprowadziłam eksperyment z wiązaniem radioaktywnie znakowanego mRNA do częściowo zrenaturowanych białek na błonie PVDF. W pierwszej kolejności przeprowadziłam rozdzielanie białek w żelu poliakrylamidowym Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4-12% w warunkach denaturująco-redukujących w buforze MES w pięciu powtórzeniach (Ryc. 36). Pierwszy z żeli wykorzystałam po rozdzielaniu do transferu na błonę PVDF i immunodetekcji przeciwciałami specyficznymi dla HBsAg (Ryc. 36A), kolejny do barwienia Coomassie w celu oceny czystości badanych białek (Ryc. 36B), natomiast pozostałe – do transferu na błonę PVDF, częściowej renaturacji białek i następnie wiązania z mRNA (Ryc. 36C-E). Jako kontrolę negatywną użyłam 1 µg BSA, jako pozytywną – 0,6 µg oczyszczonego białka NP IAV (które charakteryzuje się wysokim stopniem powinowactwa do RNA) i resztę próbek stanowiły badane rekombinowane warianty TS-sHBsAg (po 1 µg). Przygotowałam również radioaktywnie znakowane mRNA kodujące antygeny E (1629 nt) i NS5 (2778 nt) wirusa kleszczowego zapalenia mózgu oraz NP wirusa grypy typu A (1494 nt). Wybrałam takie antygeny ze względu na konieczność sprawdzenia czy długość lub skład sekwencji nukleotydowej mają wpływ na wiązanie do białek. Po oczyszczeniu każdego z tych mRNA przeprowadziłam reakcję wiązania ich do częściowo zrenaturowanych białek na błonie PVDF w buforze zawierającym 30 mM HEPES pH 7,4, 50 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Następnie błony

płukałam buforem SSC o stężeniu 2x oraz 0,2x – w celu odplukania niespecyficznie związanych mRNA. Za pomocą ekranu fosforowego zebrałam sygnał z błon PVDF pochodzący ze związanego mRNA i zanalizowałam go za pomocą czytnika Amersham Typhoon RGB Biomolecular Imager.

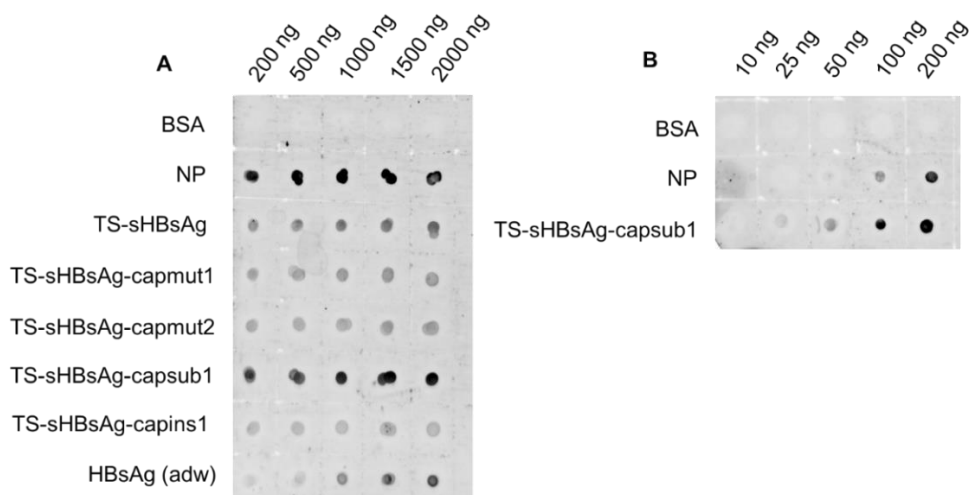


Ryc. 36 Analiza wiązania radioaktywnego mRNA do białek na błonie. **A** – immunodetekcja wariantów TS-sHBsAg przeciwciałami anti-HBsAg. **B** – barwienie Coomassie żelu SDS-PAGE po rozdziale elektroforetycznym. **C-E** – autoradiografia znakowanego mRNA związanego do częściowo renaturowanych białek na błonie PVDF (**C** – mRNA kodujące E wirusa TBEV, **D** – mRNA kodujące NS5 wirusa TBEV, **E** – mRNA kodujące NP wirusa grypy typu A). Marker PageRuler, wielkości białek: BSA ok. 70 kDa, NP IAV – 55 kDa, TS-sHBsAg-capmut1, -capmut2, capsup1 – ok. 30 kDa, -capins1 – ok. 33 kDa.

Dla wszystkich trzech rodzajów mRNA uzyskałam bardzo podobne wyniki – silny sygnał wiązania do kontroli pozytywnej oraz mniej intensywne, ale jednoznaczne sygnały dla trzech wariantów TS-sHBsAg: capmut1, capmut2 oraz capsup1. Dla wariantu capins1 nie zaobserwowałam obecności sygnału, czego powodem mogła być np. niedostępność sekwencji wiążącej RNA po

częściowej renaturacji białek. Jednak ze względu na fakt, iż ten wariant nie jest w stanie tworzyć VLPs, nie był on brany pod uwagę jako kandydat do późniejszej immunizacji myszy. Najsilniejszy sygnał z wiązania w tym eksperymencie, pomijając kontrolę negatywną, uzyskano dla wariantu capmut1.

Ze względu na fakt, iż nie udało mi się opracować efektywnej metody rozkładania i ponownego składania VLPs sprawdziłam, czy mRNA jest w stanie związać się do natywnych form rekombinowanych wariantów i przeprowadziłam eksperyment oparty o metodę typu dot blot. Na błonę nitrocelulozową nałożyłam różne ilości białek (BSA, NP IAV, rekombinowane warianty TS-sHBsAg oraz komercyjne białko HBsAg adw), którą potem zablokowałam 3% roztworem BSA i inkubowałam z fluorescencyjnie znakowanym mRNA (0,5 µg mRNA/ml) kodującym NP wirusa grypy typu A, zawierającym sygnał pakowania oraz czapeczkę CleanCap AG. UTP użyte podczas reakcji transkrypcji było w koniugacie z barwnikiem Atto488, dzięki czemu przy odpowiedniej długości fali odczytano sygnał z miejsc, gdzie mRNA się związało (Ryc. 37). Po odptukaniu niespecyficznie związanego mRNA zaobserwowałam sygnał dla białka NP (kontroli pozytywnej) oraz dla wariantu TS-sHBsAg-capsub1 (Ryc. 37A). W celu określenia limitu detekcji tej metody przygotowałam kolejną błonę nitrocelulozową, na którą to nałożyłam BSA, NP IAV oraz TS-sHBsAg-capsub1 w ilościach od 10 do 200 ng i powtórzyłam procedurę. W przypadku NP IAV najniższy sygnał został zaobserwowany dla białka w ilości 100 ng, natomiast dla TS-sHBsAg-capsub1 – poniżej 100 ng. Nie mogłam jednak określić jednoznacznie, czy sygnał dla 50 ng pochodzi ze związanego mRNA – może to być sygnał tła (Ryc. 37B). Pozytywny wynik wiązania w tym eksperymencie dla wariantu capsub1 może sugerować, iż wprowadzony do sekwencji TS-sHBsAg motyw do wiązania mRNA może znajdować się na zewnątrz cząstki, lecz niestety nie udało mi się potwierdzić dokładnej lokalizacji tej domeny.



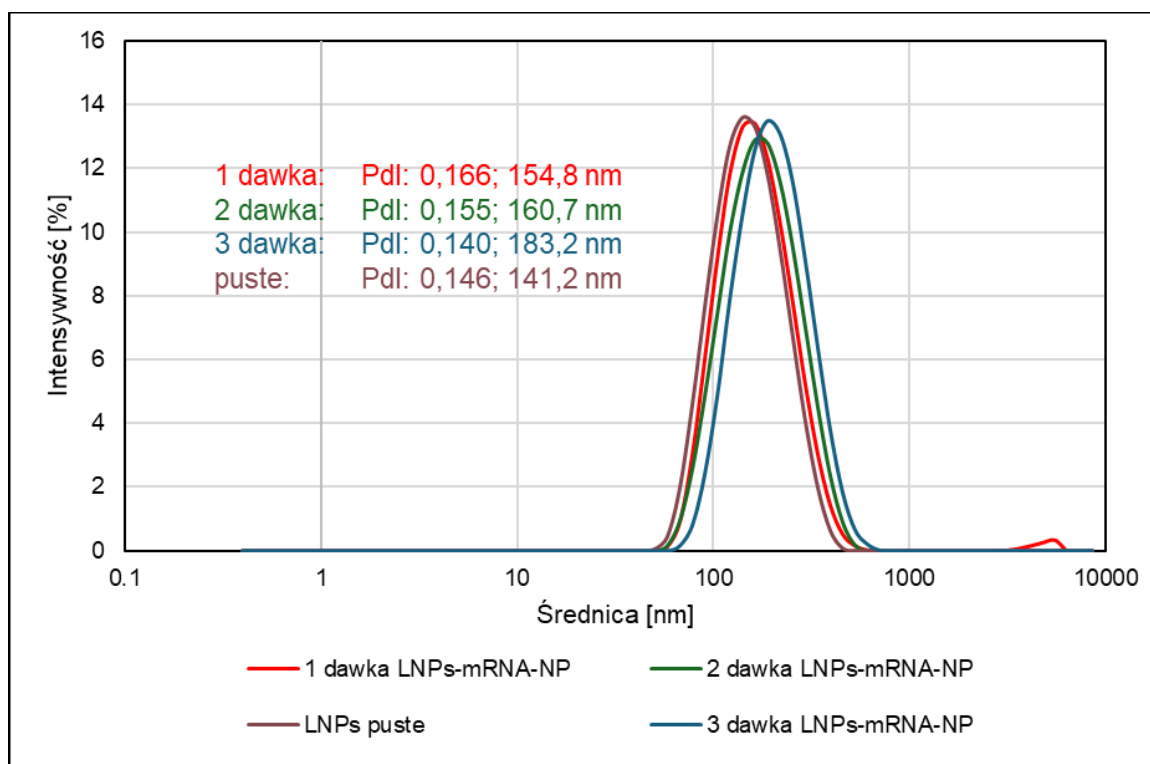
Ryc. 37 Wiązanie fluorescencyjnie znakowanego mRNA do białek w formie natywnej na błonie nitrocelulozowej. BSA – kontrola negatywna, NP – kontrola pozytywna. **A** – wiązanie mRNA do różnych ilości badanych wariantów białek. **B** – sprawdzenie limitu detekcji metody.

### 8.3. Doświadczenia na zwierzętach i ewaluacja kandydatów szczepionkowych

Kolejnym z celów pracy była analiza immunogenności mieszanin VLPs-mRNA w modelu mysim. Jako komponent białkowy wybrałam warianty capmut1 oraz capsb1 na podstawie wyników z wiązania mRNA przedstawionych powyżej (oraz kontrolnie TS-sHBsAg w jednej z grup). Jako adiuwantu w niektórych mieszaninach użyłam adiuwantu AddaVax (analog adiuwantu MF59, zatwierdzonego do użycia w szczepionkach) w celu zwiększenia poziomu odpowiedzi immunologicznej. Ze względu na fakt, iż nie udało mi się uzyskać VLPs z zapakowanym wewnątrz mRNA, zdecydowałam się na dodanie dodatkowych grup szczepionkowych – były to mieszaniny zawierające VLPs oraz nanocząstki lipidowe z mRNA-NP bez dodatku odczynnika AddaVax. Obecność nanocząstek lipidowych sama w sobie może służyć jako adiuwant dla szczepionki białkowej<sup>190–192</sup>. W celach porównania poziomu odpowiedzi immunologicznej myszy zaszczepiono również mieszaninami zawierającymi tylko nanocząstki lipidowe z mRNA-NP lub tylko oczyszczone białko NP z adiuwantem AddaVax. Ponadto, stworzono również grupy, które immunizowano samym buforem PBS, buforem PBS z pustymi LNPs lub buforem PBS z dodatkiem AddaVaxu.

Jak wspomniano wcześniej, mRNA kodujące NP przed immunizacją myszy zostało oczyszczone z użyciem chromatografii HPLC. Dzień przed planowanym szczepieniem przygotowałam nanocząstki lipidowe z mRNA według protokołu opisanego przez Wang *et al.*<sup>122</sup>. Zdecydowałam się na formułację typu SORT 4A3-SC8 z dodatkiem 10% 18PA. 18PA jest anionowym lipidem, którego zadaniem jest kierowanie LNPs w kierunku śledziony, co może skutkować zwiększonym poziomem odpowiedzi immunologicznej na dany antygen. Poziom enkapsulacji mRNA-NP

sprawdziłam poprzez pomiar wolnego mRNA w roztworze z użyciem zestawu QuantiFluor® RNA System i spektrofлуorymetru Quantus. Poziom ten wynosił około 70-72% za każdym przygotowaniem LNPs-mRNA-NP, co jest zgodne z wytycznymi podanymi przez autorów protokołu co do jakości LNPs z zapakowanym mRNA. Ponadto, wielkość LNPs sprawdziłam również za pomocą DLS (Ryc. 38). W każdej próbce uzyskałam pojedynczą populację cząstek o średnicy mniejszej niż 200 nm i stopniu polidispersyjności poniżej 0,2, co również wskazuje na wysoką jakość nanocząstek lipidowych.



Ryc. 38 Analiza rozkładu intensywności nanocząstek lipidowych z i bez mRNA. Każdą próbkę zmierzono w trzech powtórzeniach (10 pomiarów w każdym) i uśredniony wynik pokazano na wykresie. Pdl – stopień polidispersyjności.

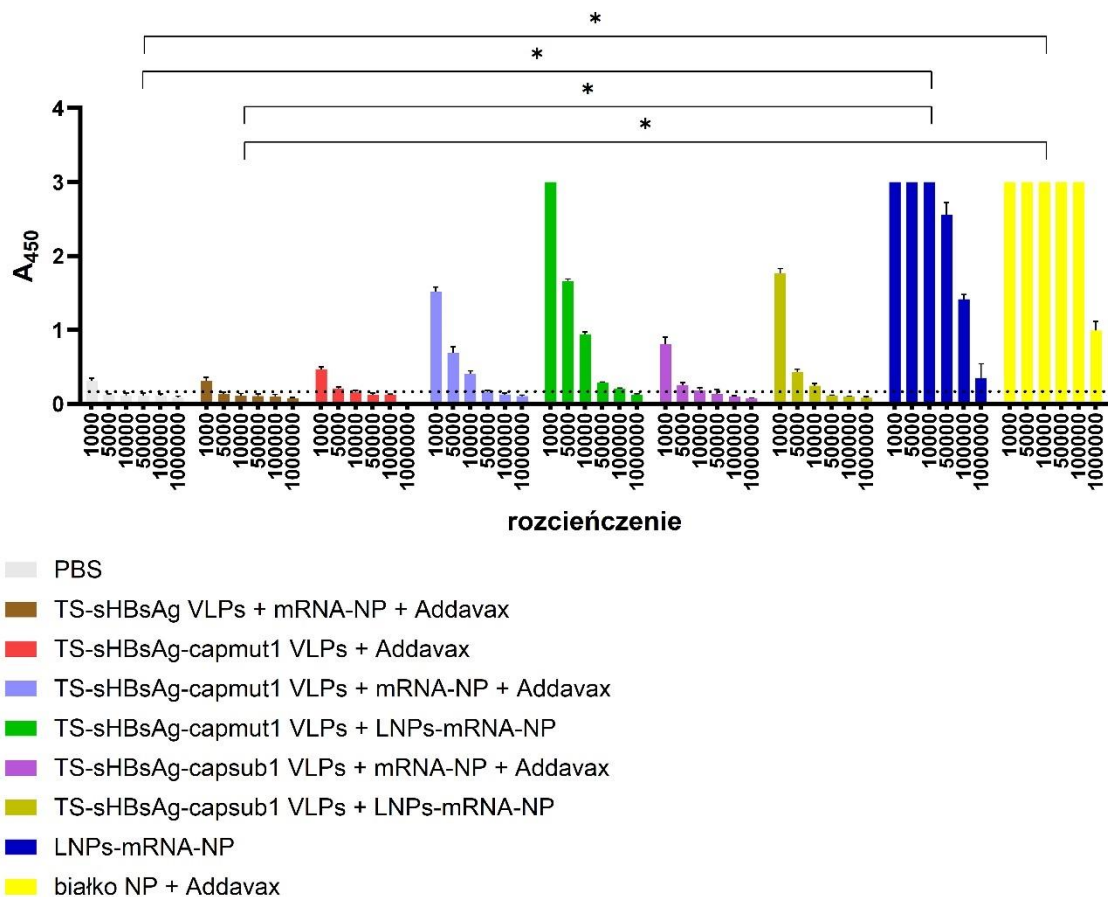
Po 2 tygodniach od podania trzeciej dawki od zaszczepionych myszy pobrano krew i śledzono do przeprowadzania analizy immunogenności. Poziom wytworzonych przeciwciał skierowanych przeciwko nukleoproteinie wirusa grypy typu A oraz HBsAg sprawdziłam za pomocą testów ELISA i zbiorcze wyniki przedstawiono na Ryc. 39 i 40. Surowice myszy w obrębie danej grupy złączyłam i następnie odpowiednio rozcieńczyłam. Dodatkowe grupy kontrolne (szczepione mieszaninami bufor PBS + AddaVax oraz bufor PBS + puste LNPs) wykazały podobną wartość absorbancji jak kontrola ze szczepienia samym buforem PBS, więc zostały pominięte na wykresach. Uzyskane wyniki poddałam analizie statystycznej w celu określenia istotności różnic pomiędzy badanymi

grupami z wykorzystaniem programu GraphPad Prism. Normalność rozkładu danych w poszczególnych grupach oceniłam za pomocą testu Shapiro–Wilka. Ze względu na niespełnienie założeń o normalności rozkładu, zastosowałam nieparametryczny jednoczynnikowy test analizy wariancji Kruskala–Wallisa (one-way non-parametric ANOVA). W przypadku stwierdzenia istotnych różnic pomiędzy grupami wykonałam analizę post-hoc z zastosowaniem testu Dunna, pozwalającą na identyfikację par porównawczych odpowiedzialnych za obserwowane różnice. Poziom istotności statystycznej ustalono na  $p < 0,05$ .

Najwyższy poziom przeciwciał anti-NP zaobserwowałam u myszy zaszczepionych białkiem NP z AddaVaxem oraz nanocząstkami lipidowymi z mRNA-NP. We wszystkich przypadkach użycie mRNA-NP przyczyniło się do powstania odpowiedzi humoralnej oprócz jednej grupy. Poziom odpowiedzi anti-NP u myszy zaszczepionych mieszaniną TS-sHBsAg-VLPs + mRNA-NP + AddaVax jest na porównywalnym poziomie jak u myszy, którym podano sam bufor PBS (Ryc. 39).

Pomiędzy kandydatami zawierającymi nanocząstki lipidowe z zapakowanym mRNA-NP najwyższą odpowiedź przeciwko NP zaobserwowałam w grupie myszy szczepionych tylko LNPs-mRNA-NP, a w przypadku dodatku VLPs – poziom tej odpowiedzi był znacznie niższy. Może to być spowodowane zbyt dużym obciążeniem układu immunologicznego – mniejsza ilość VLPs mogłaby być tutaj bardziej odpowiednia. Odnotowałam również, iż u myszy zaszczepionych mieszaninami LNPs-mRNA-NP i VLPs mniejszy spadek odpowiedzi humoralnej przeciwko NP jest widoczny w grupie z dodatkiem cząstek wariantu capmut1 niż wariantu capsul1.

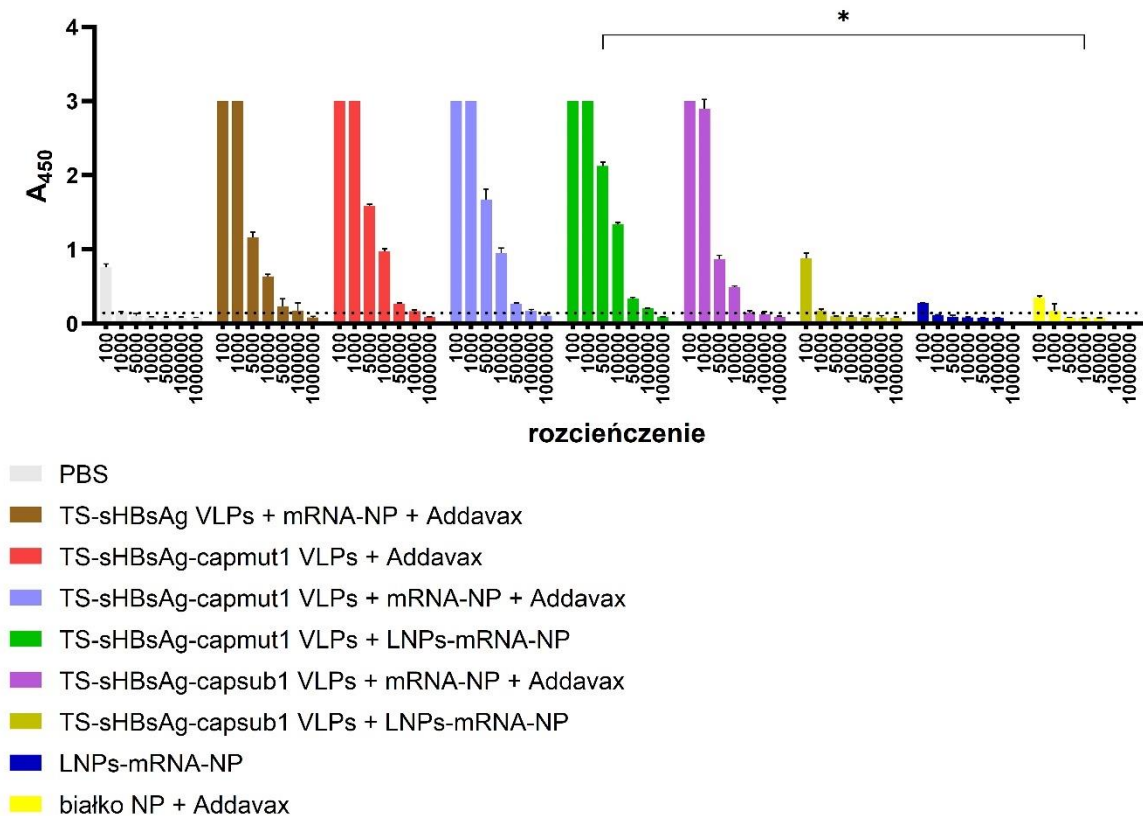
Porównując grupy szczepione wariantami VLPs + mRNA-NP + AddaVax, najwyższą odpowiedź zaobserwowałam u myszy immunizowanych mieszaniną TS-sHBsAg-capmut1-VLPs + mRNA-NP + AddaVax. Jak już zaznaczyłam wcześniej, odpowiedź przeciwko NP u myszy zaszczepionych mieszaniną TS-sHBsAg VLPs + mRNA-NP + AddaVax jest na podobnym lub niższym poziomie niż dla myszy immunizowanych samym buforem PBS czy TS-sHBsAg-capmut1 VLPs + AddaVax – na tej podstawie wnioskuję, że mRNA nie jest wiązane i chronione przez TS-sHBsAg VLPs, przez co nie jest w efektywny sposób dostarczane do komórek docelowych.



Ryc. 39 Analiza poziomu odpowiedzi humoralnej przeciwko NP w surowicach myszy po immunizacji. Kropkowaną linią oznaczono na wykresie linię odcięcia (średnie tło + 3 wartości odchylenia standardowego). Dane przedstawione na wykresie pochodzą z trzech niezależnych powtórzeń, a słupki błędów pokazują odchylenie standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: \*  $p < 0,05$ .

Zestawiając ze sobą myszy immunizowane cząstkami TS-sHBsAg-capmut1, najwyższy poziom odpowiedzi anty-NP względem kontroli pozytywnych zaobserwowałam w grupach, gdzie zastosowałam mieszaninę VLPs oraz LNPs-mRNA-NP, a najniższy – gdy mRNA-NP nie było chronione przez LNPs. Poziom ten był jednak wyższy niż u myszy szczepionych tylko buforem PBS lub VLPs z dodatkiem AddaVaxu – na tej podstawie wnioskuję, iż mRNA-NP jest w jakiś sposób chronione przez VLPs i transportowane do komórek. Analogiczną sytuację zanotowałam w przypadku TS-sHBsAg-capsub1 VLPs, ale ze znacznie niższym poziomem odpowiedzi anty-NP.

Poziom odpowiedzi humoralnej przeciwko białku HBsAg zanalizowałam w takim sam sposób, jak dla NP. Najwyższy poziom odpowiedzi humoralnej przeciwko HBsAg uzyskałam w grupie zaszczepionej mieszaniną TS-sHBsAg-capmut1 VLPs + LNPs-mRNA-NP.



Ryc. 40 Analiza poziomu odpowiedzi humoralnej przeciwko HBsAg w surowicach myszy po immunizacji. Kropkowaną linią oznaczono na wykresie linię odcięcia (średnie tło + 3 wartości odchylenia standardowego). Dane przedstawione na wykresie pochodzą z trzech niezależnych powtórzeń, a słupki błędów pokazują odchylenie standardowe. Oznaczenie istotności statystycznej: \*  $p < 0,05$ .

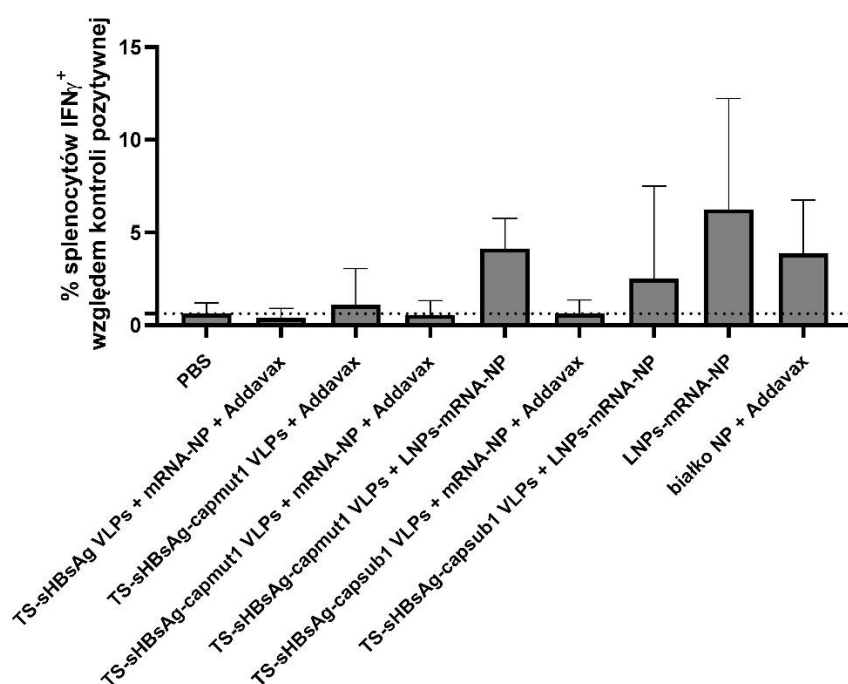
Dodatek wolnego mRNA-NP i AddaVaxu nie wpłynął w istotny sposób na poziom odpowiedzi przeciwko HBsAg pomiędzy trzema zastosowanymi wariantami VLPs – nie spowodował jej spadku, ani znacznego wzrostu. Nie zaobserwowałam też istotnych różnic w odpowiedzi humoralnej na HBsAg dla wariantu capmut1 – obecność AddaVaxu, LNPs z zapakowanym mRNA-NP czy wolnego mRNA-NP i Addavaxu nie zmieniły znacząco poziomu przeciwciał. Natomiast w grupach z wariantem capsul1 takie różnice się pojawiły – obecność LNPs-mRNA-NP znacząco obniżyła poziom odpowiedzi humoralnej przeciwko HBsAg. Może to być skutkiem zbyt dużego obciążenia układu odpornościowego u zaszczepionych myszy, co również zaobserwowałam w analizie odpowiedzi anty-NP dla tej grupy.

Na podstawie wyników z testu ELISA najlepszym kandydatem zawierającym zarówno i VLPs, jak i mRNA-NP, jest mieszanina wariantu TS-sHBsAg-capmut1-VLPs + LNPs-mRNA-NP. Wprowadzie odpowiedź przeciwko NP jest znacznie niższa niż w przypadku użycia samych LNPs z zapakowanym

mRNA-NP czy rekombinowanego białka NP z AddaVaxem, natomiast konieczne byłyby dalsze badania w celu dokładniejszej analizy wytworzonej odpowiedzi humoralnej.

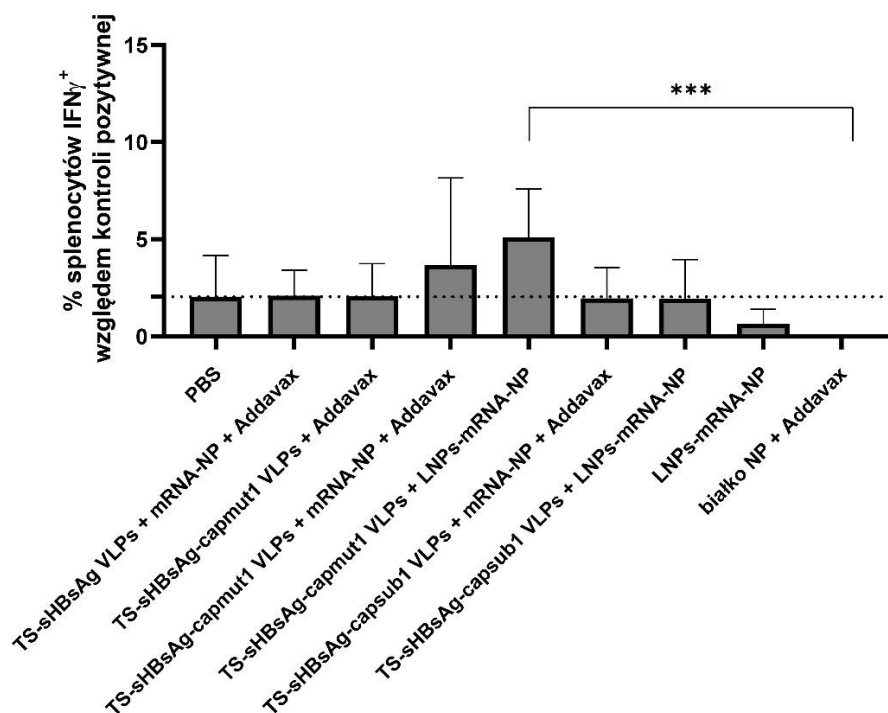
Oprócz sprawdzenia obecności i poziomu przeciwciał, przeprowadziłam również analizę odpowiedzi komórkowej za pomocą testu ELISpot. W tym celu wyizolowałam splenocyty i zastymulowałam je mieszaninami peptydów mapujących białka HBsAg i NP do produkcji interferonu  $\gamma$  (cytokina odpowiedzialna za stan zapalny i aktywację innych komórek układu odpornościowego do walki z patogenami wewnątrzkomórkowymi). Uzyskane wyniki zostały również poddane analizie istotności statystycznej (nieparametryczny jednoczynnikowy test analizy wariancji Kruskala–Wallisa, z zastosowaniem analizy post-hoc za pomocą testu Dunna; poziom istotności statystycznej ustalono na  $p < 0,05$ ).

Najwyższy poziom aktywacji odpowiedzi komórkowej przeciwko NP uzyskałam kolejno u myszy immunizowanych LNPs-mRNA-NP, białkiem NP + AddaVax oraz mieszaniną TS-sHBsAg-capmut1 VLPs + LNPs-mRNA-NP (Ryc. 41). W grupach, gdzie użyto wolnego mRNA-NP z VLPs i AddaVaxem nie zaobserwowałam aktywacji splenocytów do produkcji IFN $\gamma$ .



Ryc. 41 Analiza odpowiedzi komórkowej poprzez pomiar uwolnionego IFN $\gamma$  z mysich splenocytów zastymulowanych mieszaniną peptydów dla białka NP. Dla każdej z myszy (w duplikacie) obliczono procent aktywowanych splenocytów względem kontroli pozytywnej i następnie wyniki te uśredniono wewnątrz każdej z grup oraz obliczono odchylenie standardowe. Linia kropkowana – procent aktywowanych splenocytów z myszy immunizowanych tylko buforem PBS.

Analogicznie zanalizowałam również wyniki dla splenocytów stymulowanych peptydami dla białka HBsAg. Nie zaobserwowałam istotnych różnic w poziomie produkcji IFN $\gamma$  u myszy szczepionych danymi wersjami mieszanin oprócz jednej grupy. Były to myszy immunizowane cząstkami TS-sHBsAg-capmut1 z dodatkiem LNPs-mRNA-NP – u nich odnotowałam większy procent zastymulowanych splenocytów niż w grupach, które otrzymały tylko bufor PBS lub inną kombinację (Ryc. 42).



Ryc. 42 Analiza odpowiedzi komórkowej poprzez pomiar uwolnionego IFN $\gamma$  ze splenocytów zastymulowanych mieszaniną peptydów dla białka HBsAg. Dla każdej z myszy (w duplikacie) obliczono procent aktywowanych splenocytów względem kontroli pozytywnej i następnie wyniki te uśredniono wewnątrz każdej z grup oraz obliczono odchylenie standardowe. Linia kropkowana – procent aktywowanych splenocytów z myszy immunizowanych tylko buforem PBS. Oznaczenie istotności statystycznej: \*\*\*  $p < 0,001$ .

Na podstawie wyników z testu ELISpot, najlepszym kandydatem szczepionkowym zawierającym zarówno i VLPs, i mRNA-NP, jest ponownie mieszanina cząstek wariantu capmut1 i LNPs-mRNA-NP. Nie wykazała się ona wyższym poziomem aktywacji odpowiedzi komórkowej niż same LNPs-mRNA-NP (Ryc. 41) w przypadku białka NP, jednak porównując odpowiedź na HBsAg – takie różnice już były obecne (Ryc. 42).

## 9. Dyskusja

### 9.1. Opracowanie wydajnej metody produkcji i oczyszczania chimerycznych VLPs opartych na sHBsAg w systemie owadzi

Cząstki wirusopodobne oparte na sHBsAg od ponad 30 lat są stosowane jako skuteczna i bezpieczna szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B. Dzięki zdolności do łatwego samoskładania się w struktury przypominające wirusy, stały się one atrakcyjną platformą do prezentacji antygenów lub epitopów pochodzących z różnych patogenów, w tym innych wirusów i mikroorganizmów. Najczęściej wybieranym miejscem do wprowadzania zmiany jest pętla hydrofilowa znajdująca się na zewnątrz VLPs<sup>162,166,169,171</sup>, ale fuzje na końcach sHBsAg<sup>164,167,168</sup> czy substytucje w pętlach cytozolowych<sup>165</sup> również były badane. W zaprezentowanej pracy przedstawiłam nowatorskie podejście do oczyszczania VLPs opartych na sHBsAg oraz jego modyfikowanych wariantów. Aby uprościć proces oczyszczania cząstek, dodałam sekwencję zawierającą znacznik Twin-Strep-tag, krótki łącznik oraz sygnał dla enterokinazy na N-końcu białka. Zastosowanie chromatografii powinowactwa pozwoliło mi uzyskać rekombinowane białka o wysokiej czystości po tylko jednym etapie oczyszczania, co jest dużą zaletą w porównaniu do innych opisanych procedur oczyszczania sHBsAg-VLPs. Składają się one zazwyczaj z kombinacji chromatografii hydrofobowej, chromatografii jonowymiennej i filtracji żelowej, z dodatkowymi etapami jak ultrawierowanie, wytrącanie glikolem polietylenowym czy ultrafiltracją w różnej kolejności<sup>50</sup>. Metody te opierają się na właściwościach fizykochemicznych sHBsAg niż na specyficzności sekwencji białkowej – w związku z tym proces oczyszczania jest długotrwały oraz wymaga kombinacji różnych metod, aby w efekcie końcowym uzyskać produkt o wysokim stopniu czystości. Podczas nadprodukcji sHBsAg w komórkach drożdży czy owadzi konieczna jest liza tych komórek – rekombinowane białko nie jest wydzielane do pożywki i akumuluje się wewnątrz komórek, co znacznie utrudnia proces oczyszczania w związku z obecnością wielu innych białek komórkowych czy kwasów nukleinowych<sup>3,50,60,193</sup>. W przypadku komórek ssaczych VLPs mogą być wydzielane do pożywki, co może uprościć proces oczyszczania<sup>15</sup>. Najważniejszą zaletą tego systemu jest fakt, iż profil modyfikacji potranslacyjnych, głównie glikozylacji, jest najbardziej zbliżony do obserwowanego w natywnym wirusie<sup>194</sup>. Do takiej ekspresji wykorzystuje się odpowiednie linie komórek ssaczych, co znacznie podnosi koszty produkcji, nie zawsze charakteryzuje się większą wydajnością produkcji rekombinowanego białka oraz jest trudniej skalować produkcję na większe objętości, w porównaniu do systemu drożdżowego czy owadziego<sup>195</sup>. Jednakże, brak glikozylacji sHBsAg (system drożdżowy)<sup>15,50,196</sup> czy jej uproszczony profil (system owadzi)<sup>195,197</sup> nie sprawia, że cząstki wirusopodobne oparte na tym białku nadprodukowane w tych systemach charakteryzują się znacznie zmniejszoną immunogennością.

Dodatek nukleazy degradującej zarówno DNA, jak i RNA podczas oczyszczania pozwolił również na usunięcie kwasów nukleinowych pochodzących z komórek owadzych czy bakulowirusów. Mogłyby one zakłócać późniejsze badania nad wiązaniem mRNA do rekombinowanych białek – brak ich obecności potwierdziłam za pomocą pomiaru stężenia RNA i DNA oraz elektroforezy próbek uzyskanych po izolacji z oczyszczonych VLPs (Ryc. 22).

Zaproponowane zmiany mające na celu zwiększenie powinowactwa do mRNA, oparte na domenie ARD z białka kapsydowego wirusa HBV, nie wpływają negatywnie na proces samoskładania się VLPs z wyjątkiem wariantu capins1. Tak duża insercja (ponad 30 aa) w przypadku capins1 prawdopodobnie zaburza strukturę przestrzenną oraz formowanie oddziaływań koniecznych do powstania VLPs. Składanie się opisanych w pracy wariantów VLPs potwierdziłam za pomocą TEM oraz DLS. Zdjęcia z TEM pokazują cząstki o odpowiedniej wielkości i morfologii dla wariantów TS-sHBsAg, TS-sHBsAg-capmut1, TS-sHBsAg-capmut2 oraz TS-sHBsAg-capsub1, a dane z analizy DLS również potwierdzają obecność cząstek wirusopodobnych. Zaprezentowane w pracy motywy do wiązania mRNA, prócz samej długości, różnią się ilością fragmentów z resztami argininowymi (krótki – dwa fragmenty, długi – cztery fragmenty), które podczas replikacji wirusa mają wpływ na wiązanie pgRNA oraz późniejsze procesy dojrzewania wirionu<sup>28</sup>.

Ważnym aspektem, mogącym mieć duży wpływ na proces wiązania mRNA, jest stopień fosforylacji domeny ARD białka HBcAg. To właśnie ona odpowiada za wiązanie kompleksu pgRNA-polimeraza *in vivo*. W jej sekwencji znajduje się siedem miejsc fosforylacji, z których trzy to reszty serynowe, uważane za główne akceptory<sup>25,58</sup>. Gdy HBcAg jest nadprodukowane w komórkach bakteryjnych, niespecyficzne endogenne RNA wiąże się z białkiem i jest pakowane do wnętrza kapsydów, co jest efektem stanu hipofosforylacji. Taka sytuacja nie jest z kolei obserwowana, gdy HBcAg jest produkowane w innych systemach, takich jak owadzi czy ssaczy, gdzie obecne są odpowiednie kinazy, które mogą dodawać reszty fosforanowe do reszt aminokwasowych w białku kapsydowym wirusa HBV<sup>27,42,198,199</sup>. Fosforylacja kapsydu prawdopodobnie zwiększa specyficzność pakowania pgRNA wirusa HBV niż endogennego RNA komórkowego<sup>200</sup>. Wpływ ilości reszt argininowych oraz fosforylacji białka kapsydowego HBV na procesy wiązania i późniejszego pakowania kwasów nukleinowych nie jest nadal do końca dobrze poznany i znajduje się w kręgu zainteresowań wielu grup badawczych.

W ramach badań dowiodłam również, że znacznik Twin-Strep-tag można z powodzeniem odciąć za pomocą enterokinazy, jeśli zaszłaby taka potrzeba (np. występowałyby problemy przy składaniu się VLPs). Nie było jednak takiej konieczności w dalszych eksperymentach, więc badałam warianty rekombinowanych białek zawierające znacznik. Przedstawiony protokół reakcji cięcia można

poddać dalszej optymalizacji (np. inkubacja tylko w 4°C), aby móc określić najbardziej optymalne warunki reakcji. Kolejnym krokiem byłoby oddzielenie VLPs od znacznika i enterokinazy, co można by wykonać za pomocą np. filtracji żelowej – masa VLPs znacznie różni się od mas cząsteczkowych znacznika i enzymu (znacznik – ok. 5 kDa, enterokinaza – ok. 26 kDa, VLPs – ok. 2 000 kDa).

Jednym z celów pracy było również znalezienie optymalnych warunków do rozłożenia VLPs opartych na TS-sHBsAg w celu zapakowania do nich mRNA. Użycie odczynników denaturujących, takich jak chlorowoderek lub tiocyjanian guanidyny, nie przyniosło satysfakcjonujących wyników – nie powodowały one rozkładu VLPs lub prowadziły do agregacji cząstek. Dopiero zastosowanie detergentów umożliwiło rozłożenie VLPs, jednak późniejsze usunięcie detergentu i ponowne odtworzenie struktury VLPs okazało się niemożliwe – powstawały agregaty białkowe, które nie nadawały się do dalszych analiz. Z tego powodu zdecydowałam się nie kontynuować badań w tym kierunku.

## 9.2. Zaprojektowanie matryc do transkrypcji mRNA oraz wiązanie do VLPs

Pandemia SARS-CoV-2 przyczyniła się do intensyfikacji prac nad szczepionkami mRNA, które wyróżniają się dużą elastycznością w zakresie modyfikacji kodowanego antygeny, szybkim procesem produkcji (w porównaniu do szczepionek podjednostkowych lub opartych na całym wirusie) oraz niższymi kosztami<sup>201</sup>. Technologia mRNA umożliwia szybkie dostosowanie szczepionek do nowo pojawiających się wariantów wirusa, co jest szczególnie istotne w przypadku patogenów o wysokiej zmienności genetycznej, jak np. wirus grypy typu A. Ze względu na nieustanne badania w kierunku opracowania uniwersalnej szczepionki przeciwko temu patogenowi, zdecydowałam się na analizę immunogenności mRNA kodującego białko NP tego wirusa w połączeniu z sHBsAg-VLPs, jako potencjalnej platformy szczepionkowej.

W ramach pracy zaprojektowałam sumarycznie cztery matryce do transkrypcji mRNA, umożliwiające użycie różnych typów czapek, do których to można wklonować sekwencję kodującą wybrany antygen. Dodatkowo, aby ułatwić wiązanie mRNA do rekombinowanych wariantów TS-sHBsAg, dodałam sekwencję sygnału pakującego z genomu HBV jako 5' UTR<sup>40</sup> – nie zaobserwowałam, aby jej obecność wpłynęła znacząco na stabilność cząsteczki mRNA czy poziom translacji w komórkach ssaczych. Potwierdziłam funkcjonalność tych konstruktyw, używając sekwencji kodujących białko EGFP czy NP wirusa grypy typu A.

Do dalszych badań użyłam konstruktu w wersji z czapczką typu CleanCap AG i sekwencją sygnałową pakującą (IVT AG PS), kodującego białko NP. Do transkrypcji *in vitro* mRNA

do późniejszej immunizacji myszy użyłam N1-metylo-pseudourydyny (zamiast zwykłej urydyny), w celu zwiększenia stabilności cząsteczek mRNA<sup>116,202</sup>. Po wstępnym oczyszczeniu i analizie, mRNA zostało poddane kolejnemu procesowi oczyszczania, tym razem za pomocą chromatografii HPLC. Miało to na celu usunięcie zanieczyszczeń, w szczególności dsRNA. Dwuniciowe RNA samo w sobie jest wysoce immunogenne – wiąże się m.in. do receptorów typu Toll (np. TLR3). Powoduje to aktywację odpowiedzi układu odpornościowego i indukcję ekspresji genów kodujących cytokiny, takich jak interferon lub innych białek przeciwwirusowych czy przeciwzapalnych. W rezultacie spada efektywność translacji i poziom produkcji oczekiwanego antygeny<sup>203,204</sup>.

Jednym z celów przedstawionej pracy doktorskiej było również sprawdzenie, czy wprowadzone do sekwencji sHBsAg zmodyfikowane motywy pochodzące z ARD białka kapsydowego HBV są zdolne do wiązania mRNA. Z uzyskanych wyników wnioskuję, iż warianty capmut1, capmut2 i capsul1 są potencjalnymi kandydatami do dalszych badań – zaobserwowałam wiązanie mRNA do częściowo zrenaturowanych białek na błonie PVDF (Ryc. 36). Dla białek w warunkach natywnych (czyli złożonych VLPs) pozytywny sygnał wiązania z fluorescencyjnym mRNA zaobserwowałam tylko w przypadku wariantu capsul1 (Ryc. 37). Taki wynik może sugerować, że tak duża substytucja (ponad 30 aa) wpływa na zmianę struktury VLPs i ten motyw, z zakładanej wcześniej lokalizacji wewnętrznej, jest eksponowany na zewnątrz VLPs. Niestety, z powodu braku odpowiednich przeciwciał nie mogłam dokładnie potwierdzić lokalizacji tego motywu za pomocą testów typu ELISA czy barwienia immunogold (znakowanie preparatów mikroskopowych TEM przeciwciałami sprzężonymi z nanocząstkami złota). W przypadku wariantów capmut1 i capmut2 nie wykryłam sygnału dla wiązania mRNA do VLPs w warunkach natywnych przy pomocy metody typu dot blot (Ryc. 37), co pozwala mi wysunąć wniosek, że wprowadzona zmiana (substytucja 10 aa) jest zbyt niewielka, aby wywołać znaczące zmiany w strukturze VLPs oraz lokalizacji tej domeny.

### 9.3. Doświadczenia na zwierzętach i ewaluacja kandydatów szczepionkowych

Doświadczenia na zwierzętach przeprowadzone w trakcie badań miały charakter pilotażowy, co ograniczyło liczbę możliwych kombinacji kandydatów szczepionkowych. Ze względu na fakt, iż nie udało mi się znaleźć optymalnych warunków do rozkładania i ponownego składania później VLPs bez użycia detergentu, zdecydowałam się na dodanie do immunizacji myszy wersji mieszanin zawierających VLPs oraz nanocząstki lipidowe z mRNA-NP. Nośniki oparte na lipidach mogą również działać jako adiuwant<sup>190–192</sup>, więc w tych wersjach mieszanin zrezygnowałam z dodatku AddaVaxu, aby nie przeciążyć układu immunologicznego myszy. Poprzez analizy odpowiedzi

humoralnej i komórkowej sprawdziłam, czy oczyszczone VLPs wariantów TS-sHBsAg, TS-sHBsAg-capmut1 i TS-sHBsAg-capsub1 są w stanie związać i chronić mRNA kodujące NP – warianty capmut1 i capsub1 wykazały się pewnym stopniem ochrony mRNA-NP. Nie udało mi się ocenić, ile dokładnie mRNA-NP w każdym z tych przypadków było chronione przez wyżej wymienione VLPs, więc też trudno wnioskować, czy np. zwiększenie ilości mRNA (a zostawienie takiej samej ilości mikrogramów VLPs) nie spowodowałoby podwyższenia poziomu odpowiedzi na NP. Nieznacznie wyższy poziom przeciwciał skierowanych przeciwko NP zaobserwowałam, gdy w mieszaninie do szczepienia zostało użyte VLPs wariantu capmut1 niż VLPs wariantu capsub1.

W przypadku wszystkich kombinacji zawierających zarówno i VLPs, jak i mRNA, kandydatem charakteryzującym się najwyższym poziomem wywołanej odpowiedzi, jest mieszanina wariantu TS-sHBsAg-capmut1-VLPs z LNPs-mRNA-NP. Porównując poziom odpowiedzi wywołanej tym kandydatem, a zastosowaniem samych nanocząstek lipidowych z mRNA-NP, jest widoczny znaczny spadek poziomu przeciwciał przeciwko NP, gdy dodany został komponent białkowy. Obecność dwóch różnych antygenów pod różnymi postaciami mogła spowodować zbyt duże obciążenie układu immunologicznego, przez co odpowiedź przeciwko NP obniżyła się. Poziomy przeciwciał anti-HBsAg w każdej wersji mieszanin z TS-sHBsAg-capmut1 były podobne do siebie. Wartym zauważenia jest jednak fakt, iż obecność nanocząstek lipidowych z mRNA-NP w mieszaninie szczepionkowej wpłynęła pozytywnie na zwiększenie poziomu odpowiedzi komórkowej przeciwko HBsAg. Aby móc jednoznacznie określić wpływ LNPs jako adiuwantu, konieczna byłaby również immunizacja kolejnych grup myszy samymi VLPs wariantu capmut1 (bez adiuwantu), TS-sHBsAg-capmut1 VLPs + mRNA-NP (również bez adiuwantu) czy też TS-sHBsAg-capmut1 VLPs z pustymi LNPs – jednak ze względu na ograniczenia ilościowe myszy, nie miałam możliwości sprawdzenia kolejnych kombinacji mieszanin.

Zaskakująco, wariant capsub1 indukował bardzo słabą odpowiedź anti-HBsAg w połączeniu z nanocząstkami lipidowymi z mRNA-NP. Istnieje możliwość, że takie połączenie prowadzi do agregacji VLPs między sobą lub z LNPs, bądź do wzajemnej dezintegracji VLPs i LNPs. Wariant capsub1 charakteryzuje się modyfikacją sekwencji w postaci substytucji 30 aa, która może skutkować zmianami właściwości cząstek takimi jak organizacja podjednostek białka i lipidów budujących VLPs, zmniejszeniem stabilności czy zmianą wypadkowego ładunku<sup>205–207</sup>. Odpowiedź humoralna skierowana przeciwko NP po użyciu mieszaniny z wariantem VLPs capsub1 również była na niskim poziomie.

mRNA-NP w mieszaninie z VLPs i AddaVaxem charakteryzuje się słabszą immunogennością wobec NP niż nanocząstki lipidowe z mRNA-NP plus VLPs. Jak już wspomniałam wcześniej, nie udało

mi się określić, ile dokładnie mRNA jest związane i chronione przez VLPs – przez co nie można porównać tej ilości z ilością mRNA-NP zapakowanego do LNPs i na tej podstawie dostosować dawek (tak, aby taka sama ilość mRNA-NP została podana w obu przypadkach).

Na podstawie analizy odpowiedzi humoralnej i komórkowej lepszym nośnikiem dla mRNA-NP są nanocząstki lipidowe ze względu na lepszą ochronę podczas transportu do komórek docelowych niż VLPs oparte na sHBsAg. Jednak, jak już zaznaczyłam wcześniej, w kombinacji obu antygenów (mieszaniny zawierające zarówno VLPs, jak i mRNA) najlepszym kandydatem szczepionkowym na podstawie przeprowadzonych przeze mnie badań jest mieszanina składająca się z VLPs wariantu capmut1 i nanocząstek lipidowych z mRNA-NP. Poziom odpowiedzi humoralnej przeciwko HBsAg jest na podobnym poziomie jak w przypadku użycia VLPs wariantu capmut1 tylko z AddaVaxem lub z AddaVaxem i mRNA-NP, więc użycie LNPs z zapakowanym mRNA-NP nie powoduje jej obniżenia. Zaobserwowałam również zwiększenie poziomu odpowiedzi komórkowej wobec HBsAg, gdy do TS-sHBsAg-capmut1 VLPs dodano mRNA-NP z AddaVaxem lub LNPs-mRNA-NP. Wprawdzie poziom odpowiedzi przeciwko nukleoproteinie wirusa grypy typu A obniżył się, gdy do nanocząstek lipidowych z mRNA-NP dodano VLPs wariantu capmut1, natomiast konieczne są dalsze badania nad dawkowaniem oraz składem mieszaniny do szczepień.

Niższy poziom odpowiedzi humoralnej przeciwko NP w przypadku użycia z VLPs wariantu capmut1 (niż przy użyciu tylko LNPs-mRNA-NP lub rekombinowanego białka NP z AddaVaxem) nie musi jednak oznaczać, iż ta odpowiedź będzie mniej efektywna czy długotrwała. W ramach przedstawionej pracy doktorskiej sprawdzono tylko poziom odpowiedzi humoralnej i komórkowej po 14 dniach od podania trzeciej dawki. Wyniki przeprowadzonych badań *in vivo* nie dają jednoznacznych wyjaśnień – aby móc dokładniej zanalizować długotrwałość i skuteczność tej odpowiedzi, kolejnym etapem byłoby pogłębione sprawdzenie poziomu przeciwciał (różne klasy) i odpowiedzi komórkowej (uwalnianie IFN $\gamma$  i innych cytokin) po kilku miesiącach do szczepienia, w wybranych odstępach czasowych (np. 1, 3 i 6 miesięcy).

Na przestrzeni kilku ostatnich lat opublikowano liczne badania analizujące skuteczność i bezpieczeństwo jednoczesnego podania szczepionek przeciwko COVID-19 (opartej na mRNA) oraz grypie (opartej na antygenach białkowych), przy czym preparaty te były aplikowane w przeciwległe ramiona. W wyniku tych badań potwierdzono, iż podanie obu preparatów szczepionkowych w tym samym czasie jest skuteczne i prowadzi do pojawienia się odpowiedzi immunologicznej przeciwko obu wirusom. Nie zaobserwowano też znaczących zmian w występowaniu oraz natężeniu skutków ubocznych po przyjęciu obu szczepionek naraz<sup>208–212</sup>. Przyczyniło się to do sformułowania rekomendacji, aby podawać oba preparaty szczepionkowe

jednocześnie, dzięki czemu możliwe jest zwiększenie poziomu wyszczepialności społeczeństwa (jedna wizyta zamiast dwóch). Temat jednoczesnego podania dwóch różnych szczepionek, opartych na odmiennych platformach technologicznych, wciąż nie został dostatecznie zbadany i wymaga dalszych, pogłębionych analiz — zwłaszcza w kontekście potencjalnych interakcji pomiędzy odpowiedziami immunologicznymi. Niemniej jednak, taki kierunek badań niesie ze sobą liczne korzyści. Kandydat szczepionki dwuwalentnej zaproponowany w powyższej pracy doktorskiej świetnie wpisuje się w aktualne kierunki badań i rozwoju, a jego dodatkową zaletą jest fakt, iż może on zostać podany w jednym preparacie, łączącym cząstki wirusopodobne (oparte na sHBsAg) oraz mRNA (kodujące NP wirusa grypy typu A).

## 10. Podsumowanie

- Opracowałam nową metodę oczyszczania VLPs opartych na sHBsAg z systemu bakulowirusowego z użyciem znacznika Twin-Strep-tag z możliwością jego odcięcia.
- Zaprojektowałam nowe konstrukty oparte na sHBsAg zawierające modyfikowane motywy do wiązania mRNA i sprawdziłam ich potencjał do składania się w VLPs oraz wiązania mRNA.
- Zaprojektowałam i sprawdziłam funkcjonalność konstruktów do syntezy mRNA zawierającego sekwencję kodującą nukleoproteinę wirusa grypy typu A.
- Zbadałam immunogenność mieszanin zawierających mRNA-NP i nowe warianty sHBsAg-VLPs oraz wytypowałam najlepszego kandydata szczepionkowego do dalszych badań.
- Część wyników przedstawionych w pracy doktorskiej została opublikowana w artykule zatytułowanym „Affinity-purified sHBsAg-based virus-like particles as a platform for foreign mRNA binding” w czasopiśmie *Virology*<sup>213</sup>.

## 11. Bibliografia

1. *Fields Virology*. (Lippincott Williams & Wilkins, New York, NY, 2013).
2. McNaughton, A. L., Revill, P. A., Littlejohn, M., Matthews, P. C. & Ansari, M. A. Analysis of genomic-length HBV sequences to determine genotype and subgenotype reference sequences. *Journal of General Virology* **101**, 271–283 (2020).
3. Patil, A. & Khanna, N. Novel membrane extraction procedure for the purification of hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Journal of Chromatography B* **898**, 7–14 (2012).
4. Gozlan, Y. *et al.* HBV-RNA, quantitative HBsAg, levels of HBV in peripheral lymphocytes and HBV mutation profiles in chronic hepatitis B. *Viruses* **14**, 584 (2022).
5. *Global Hepatitis Report 2024: Action for Access in Low- and Middle-Income Countries*. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672> (2024) [dostęp: 04.01.2025].
6. Toyé, R. M. *et al.* The hepatitis B virus genotypes E to J: the overlooked genotypes. *Microorganisms* **11**, 1908 (2023).
7. Pourkarim, M. R. *et al.* Evolutionary analysis of HBV “S” antigen genetic diversity in Iranian blood donors: A nationwide study. *Journal of Medical Virology* **86**, 144–155 (2014).
8. Lin, C.-L. & Kao, J.-H. Natural history of acute and chronic hepatitis B: the role of HBV genotypes and mutants. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **31**, 249–255 (2017).
9. Löffler-Mary, H., Dumortier, J., Klentsch-Zimmer, C. & Prange, R. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology* **270**, 358–367 (2000).
10. Li, S., Wang, Z., Li, Y. & Ding, G. Adaptive evolution of proteins in hepatitis B virus during divergence of genotypes. *Sci Rep* **7**, 1990 (2017).

11. Yang, C.-C., Huang, E.-Y., Li, H.-C., Su, P.-Y. & Shih, C. Nuclear export of human hepatitis B virus core protein and pregenomic RNA depends on the cellular NXF1-p15 machinery. *PLoS ONE* **9**, e106683 (2014).
12. Liang, J. T. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology* **49**, S13–S21 (2009).
13. Liu, S., Koh, S. & Lee, C. Hepatitis B virus X protein and hepatocarcinogenesis. *IJMS* **17**, 940 (2016).
14. Ueda, K., Tsurimoto, T. & Matsubara, K. Three envelope proteins of hepatitis B virus: large S, middle S, and major S proteins needed for the formation of Dane particles. *J Virol* **65**, 3521–3529 (1991).
15. 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* **15**, 637–647 (1997).
16. Hossain, Md. G., Suwanmanee, Y., Du, K. & Ueda, K. Analysis of the physicochemical properties, replication and pathophysiology of a massively glycosylated hepatitis B virus HBsAg escape mutant. *Viruses* **13**, 2328 (2021).
17. Carman, W. F. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis* **4**, 11–20 (1997).
18. Ni, F. *et al.* A new immune escape mutant of hepatitis B virus with an Asp to Ala substitution in aa144 of the envelope major protein. *Research in Virology* **146**, 397–407 (1995).
19. Pondé, R. A. D. A. & Amorim, G. D. S. P. Exchanges in the ‘a’ determinant of the hepatitis B virus surface antigen revisited. *Virology* **599**, 110184 (2024).
20. Wu, C. *et al.* Biological significance of amino acid substitutions in hepatitis B surface antigen (HBsAg) for glycosylation, secretion, antigenicity and immunogenicity of HBsAg and hepatitis B virus replication. *Journal of General Virology* **91**, 483–492 (2010).

21. Yu, D.-M. *et al.* N-glycosylation mutations within hepatitis B virus surface major hydrophilic region contribute mostly to immune escape. *Journal of Hepatology* **60**, 515–522 (2014).
22. Gilbert, R. J. C. *et al.* Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 14783–14788 (2005).
23. Oliver, R. C. *et al.* Assembly of capsids from hepatitis B virus core protein progresses through highly populated intermediates in the presence and absence of RNA. *ACS Nano* **14**, 10226–10238 (2020).
24. Selzer, L. & Zlotnick, A. Assembly and release of hepatitis B virus. *Cold Spring Harb Perspect Med* **5(12)**, (2015).
25. De Rocquigny, H. *et al.* Phosphorylation of the arginine-rich C-terminal domains of the hepatitis B virus (HBV) core protein as a fine regulator of the interaction between HBc and nucleic acid. *Viruses* **12**, 738 (2020).
26. Le Pogam, S., Chua, P. K., Newman, M. & Shih, C. Exposure of RNA templates and encapsidation of spliced viral RNA are influenced by the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core antigen (HBcAg 165-173). *J Virol* **79**, 1871–1887 (2005).
27. Ludgate, L. *et al.* Cell-free hepatitis B virus capsid assembly dependent on the core protein C-terminal domain and regulated by phosphorylation. *J Virol* **90**, 5830–5844 (2016).
28. Su, P.-Y. *et al.* HBV maintains electrostatic homeostasis by modulating negative charges from phosphoserine and encapsidated nucleic acids. *Sci Rep* **6**, 38959 (2016).
29. Padarath, K., Deroubaix, A. & Kramvis, A. The complex role of HBeAg and its precursors in the pathway to hepatocellular carcinoma. *Viruses* **15**, 857 (2023).
30. Bouchard, M. J., Puro, R. J., Wang, L. & Schneider, R. J. Activation and inhibition of cellular calcium and tyrosine kinase signaling pathways identify targets of the HBx protein involved in hepatitis B virus replication. *J Virol* **77**, 7713–7719 (2003).
31. Choi, Y., Gyoo Park, S., Yoo, J. & Jung, G. Calcium ions affect the hepatitis B virus core assembly. *Virology* **332**, 454–463 (2005).

32. Yan, H. *et al.* Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049 (2012).
33. Paran, N. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *The EMBO Journal* **20**, 4443–4453 (2001).
34. Le, C. *et al.* In vitro infection with hepatitis B virus using differentiated human serum culture of Huh7.5-NTCP cells without requiring dimethyl sulfoxide. *Viruses* **13**, 97 (2021).
35. Iwamoto, M. *et al.* Evaluation and identification of hepatitis B virus entry inhibitors using HepG2 cells overexpressing a membrane transporter NTCP. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **443**, 808–813 (2014).
36. Zhou, M. *et al.* Productive HBV infection of well-differentiated, hNTCP-expressing human hepatoma-derived (Huh7) cells. *Viol. Sin.* **32**, 465–475 (2017).
37. Herrscher, C., Roingeard, P. & Blanchard, E. Hepatitis B virus entry into cells. *Cells* **9**, 1486 (2020).
38. Chen, C., Wang, J. C.-Y. & Zlotnick, A. A kinase chaperones hepatitis B virus capsid assembly and captures capsid dynamics in vitro. *PLoS Pathog* **7**, e1002388 (2011).
39. Giraud, G., El Achi, K., Zoulim, F. & Testoni, B. Co-transcriptional regulation of HBV replication: RNA quality also matters. *Viruses* **16**, 615 (2024).
40. Patel, N. *et al.* HBV RNA pre-genome encodes specific motifs that mediate interactions with the viral core protein that promote nucleocapsid assembly. *Nat Microbiol* **2**, 17098 (2017).
41. Seitz, S., Habjanič, J., Schütz, A. K. & Bartenschlager, R. The hepatitis B virus envelope proteins: molecular gymnastics throughout the viral life cycle. *Annu. Rev. Virol.* **7**, 263–288 (2020).
42. Ning, X. *et al.* Secretion of genome-free hepatitis B virus – single strand blocking model for virion morphogenesis of para-retrovirus. *PLoS Pathog* **7**, e1002255 (2011).
43. Jiang, B. & Hildt, E. Intracellular trafficking of HBV particles. *Cells* **9**, 2023 (2020).

44. Lünsdorf, H., Gurramkonda, 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* **10**, 48 (2011).
45. Rydell, G. E., Prakash, K., Norder, H. & Lindh, M. Hepatitis B surface antigen on subviral particles reduces the neutralizing effect of anti-HBs antibodies on hepatitis B viral particles in vitro. *Virology* **509**, 67–70 (2017).
46. Szmuness, W. *et al.* Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med* **303**, 833–841 (1980).
47. Zhao, H., Zhou, X. & Zhou, Y.-H. Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **16**, 1533–1544 (2020).
48. Lagoutte, P. *et al.* Scalable chromatography-based purification of virus-like particle carrier for epitope based influenza A vaccine produced in *Escherichia coli*. *Journal of Virological Methods* **232**, 8–11 (2016).
49. Huzair, F. & Sturdy, S. Biotechnology and the transformation of vaccine innovation: the case of the hepatitis B vaccines 1968–2000. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* **64**, 11–21 (2017).
50. Gurramkonda, C. *et al.* Purification of hepatitis B surface antigen virus-like particles from recombinant *Pichia pastoris* and in vivo analysis of their immunogenic properties. *Journal of Chromatography B* **940**, 104–111 (2013).
51. André, F. E. Overview of a 5-year clinical experience with a yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* **8**, S74–S78 (1990).
52. Roldão, A., Mellado, M. C. M., Castilho, L. R., Carrondo, M. J. & Alves, P. M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Review of Vaccines* **9**, 1149–1176 (2010).
53. Diminsky, D., Moav, N., Gorecki, M. & Barenholz, Y. Physical, chemical and immunological stability of CHO-derived hepatitis B surface antigen (HBsAg) particles. *Vaccine* **18**, 3–17 (1999).

54. Jezek, J. *et al.* A heat-stable hepatitis B vaccine formulation. *Human Vaccines* **5**, 529–535 (2009).
55. Lopes, J. L. S. *et al.* Antigenic and physicochemical characterization of hepatitis B surface protein under extreme temperature and pH conditions. *Vaccine* **37**, 6415–6425 (2019).
56. Gallagher, J. R., Torian, U., McCraw, D. M. & Harris, A. K. Characterization of the disassembly and reassembly of the HBV glycoprotein surface antigen, a pliable nanoparticle vaccine platform. *Virology* **502**, 176–187 (2017).
57. Zahid, M., Lünsdorf, H. & Rinas, U. Assessing stability and assembly of the hepatitis B surface antigen into virus-like particles during down-stream processing. *Vaccine* **33**, 3739–3745 (2015).
58. Porterfield, J. Z. *et al.* Full-length hepatitis B virus core protein packages viral and heterologous RNA with similarly high levels of cooperativity. *J Virol* **84**, 7174–7184 (2010).
59. Petrovskis, I. *et al.* Production of the HBc protein from different HBV genotypes in *E. coli*. Use of reassociated HBc VLPs for packaging of ss- and dsRNA. *Microorganisms* **9**, 283 (2021).
60. Hosseini, S. N., Sarvari, T., Bashiri, G., Khatami, M. & Shojaosadati, S. A. Assessing virus like particles formation and r-HBsAg aggregation during large scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *International Journal of Biological Macromolecules* **139**, 697–711 (2019).
61. Relich, R. F. & Loeffelholz, M. J. Taxonomic changes for human viruses, 2020 to 2022. *J Clin Microbiol* **61**, e00337-22 (2023).
62. Kosik, I. & Yewdell, J. W. Influenza hemagglutinin and neuraminidase: yin–yang proteins coevolving to thwart immunity. *Viruses* **11**, 346 (2019).
63. Jang, Y. H. & Seong, B. L. The quest for a truly universal influenza vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, 344 (2019).
64. Zhu, Z., Fodor, E. & Keown, J. R. A structural understanding of influenza virus genome replication. *Trends in Microbiology* **31**, 308–319 (2023).

65. Lessler, J. *et al.* Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases* **9**, 291–300 (2009).
66. Baccam, P., Beauchemin, C., Macken, C. A., Hayden, F. G. & Perelson, A. S. Kinetics of influenza A virus infection in humans. *J Virol* **80**, 7590–7599 (2006).
67. World Health Organization. *Global Influenza Strategy 2019-2030*. (World Health Organization, Geneva, 2019).
68. Oxford, J. *et al.* World War I may have allowed the emergence of “Spanish” influenza. *The Lancet Infectious Diseases* **2**, 111–114 (2002).
69. Pandemic Influenza Risk Management: a WHO guide to inform and harmonize national and international pandemic preparedness and response. (2017).
70. Carrat, F. & Flahault, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine* **25**, 6852–6862 (2007).
71. Gong, X. *et al.* Reassortment network of influenza A virus. *Front. Microbiol.* **12**, 793500 (2021).
72. Muramoto, Y., Noda, T., Kawakami, E., Akkina, R. & Kawaoka, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. *J Virol* **87**, 2455–2462 (2013).
73. Bouvier, N. M. & Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine* **26 Suppl 4**, D49-53 (2008).
74. Noda, T. & Kawaoka, Y. Structure of influenza virus ribonucleoprotein complexes and their packaging into virions. *Reviews in Medical Virology* **20**, 380–391 (2010).
75. Rossman, J. S. *et al.* Influenza virus M2 ion channel protein is necessary for filamentous virion formation. *J Virol* **84**, 5078–5088 (2010).
76. Trombetta, C. M., Kistner, O., Montomoli, E., Viviani, S. & Marchi, S. Influenza viruses and vaccines: the role of vaccine effectiveness studies for evaluation of the benefits of influenza vaccines. *Vaccines* **10**, 714 (2022).

77. Opanda, S., Bulimo, W., Gachara, G., Ekuttan, C. & Amukoye, E. Assessing antigenic drift and phylogeny of influenza A (H1N1) pdm09 virus in Kenya using HA1 sub-unit of the hemagglutinin gene. *PLoS ONE* **15**, e0228029 (2020).
78. Simmons, H. C. *et al.* A protective and broadly binding antibody class engages the influenza virus hemagglutinin head at its stem interface. *mBio* **16**, e00892-25 (2025).
79. Chen, Y.-Q. *et al.* Influenza infection in humans induces broadly cross-reactive and protective neuraminidase-reactive antibodies. *Cell* **173**, 417-429.e10 (2018).
80. Noton, S. L. *et al.* Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. *Journal of General Virology* **88**, 2280–2290 (2007).
81. Burleigh, L. M., Calder, L. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. Influenza A viruses with mutations in the M1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J Virol* **79**, 1262–1270 (2005).
82. Fodor, E. & Te Velthuis, A. J. W. Structure and function of the influenza virus transcription and replication machinery. *Cold Spring Harb Perspect Med* **10**, a038398 (2020).
83. Gonzalez, S. Distinct regions of influenza virus PB1 polymerase subunit recognize vRNA and cRNA templates. *The EMBO Journal* **18**, 3767–3775 (1999).
84. Pflug, A. *et al.* Capped RNA primer binding to influenza polymerase and implications for the mechanism of cap-binding inhibitors. *Nucleic Acids Research* **46**, 956–971 (2018).
85. Hale, B. G., Albrecht, R. A. & García-Sastre, A. Innate immune evasion strategies of influenza viruses. *Future Microbiol.* **5**, 23–41 (2010).
86. Nacken, W., Schreiber, A., Masemann, D. & Ludwig, S. The effector domain of the influenza A virus nonstructural protein NS1 triggers host shutoff by mediating inhibition and global deregulation of host transcription when associated with specific structures in the nucleus. *mBio* **12**, e02196-21 (2021).

87. O'Neill, R. E. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *The EMBO Journal* **17**, 288–296 (1998).
88. Teo, Q. W. *et al.* Probing the functional constraints of influenza A virus NEP by deep mutational scanning. *Cell Reports* **44**, 115196 (2025).
89. Cheung, P.-H. H., Lee, T.-W. T., Chan, C.-P. & Jin, D.-Y. Influenza A virus PB1-F2 protein: an ambivalent innate immune modulator and virulence factor. *Journal of Leukocyte Biology* **107**, 763–771 (2020).
90. Tauber, S., Ligertwood, Y., Quigg-Nicol, M., Dutia, B. M. & Elliott, R. M. Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo. *Journal of General Virology* **93**, 840–849 (2012).
91. Hao, W., Wang, L. & Li, S. Roles of the non-structural proteins of influenza A virus. *Pathogens* **9**, 812 (2020).
92. Khapersky, D. A., Schmaling, S., Larkins-Ford, J., McCormick, C. & Gaglia, M. M. Selective degradation of host RNA polymerase II transcripts by influenza A virus PA-X host shutoff protein. *PLoS Pathog* **12**, e1005427 (2016).
93. Levene, R. E., Shrestha, S. D. & Gaglia, M. M. The influenza A virus host shutoff factor PA-X is rapidly turned over in a strain-specific manner. *J Virol* **95**, e02312-20, JVI.02312-20 (2021).
94. Dou, D., Revol, R., Östbye, H., Wang, H. & Daniels, R. Influenza A virus cell entry, replication, virion assembly and movement. *Front. Immunol.* **9**, 1581 (2018).
95. Li, X., Gu, M., Zheng, Q., Gao, R. & Liu, X. Packaging signal of influenza A virus. *Virology* **18**, 36 (2021).
96. Einfeld, A. J., Neumann, G. & Kawaoka, Y. Influenza A virus isolation, culture and identification. *Nat Protoc* **9**, 2663–2681 (2014).
97. Pau, M. G. *et al.* The human cell line PER.C6 provides a new manufacturing system for the production of influenza vaccines. *Vaccine* **19**, 2716–2721 (2001).

98. Taaffe, J. *et al.* Advancing influenza vaccines: a review of next-generation candidates and their potential for global health impact. *Vaccine* **42**, 126408 (2024).
99. Russell, C. A. *et al.* Seasonal influenza vaccine performance and the potential benefits of mRNA vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **20**, 2336357 (2024).
100. Jackson, L. A. *et al.* An mRNA vaccine against SARS-CoV-2 — preliminary report. *N Engl J Med* **383**, 1920–1931 (2020).
101. Wolff, J. A. *et al.* Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* **247**, 1465–1468 (1990).
102. Michel, T. *et al.* Cationic nanoliposomes meet mRNA: efficient delivery of modified mRNA using hemocompatible and stable vectors for therapeutic applications. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **8**, 459–468 (2017).
103. Vishweshwaraiah, Y. L. & Dokholyan, N. V. mRNA vaccines for cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 1029069 (2022).
104. Deng, Z., Tian, Y., Song, J., An, G. & Yang, P. mRNA vaccines: the dawn of a new era of cancer immunotherapy. *Front. Immunol.* **13**, 887125 (2022).
105. Sahin, U., Karikó, K. & Türeci, Ö. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 759–780 (2014).
106. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S.-H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* **44**, 7511–7526 (2016).
107. Jemielity, J. *et al.* Novel “anti-reverse” cap analogs with superior translational properties. *RNA* **9**, 1108–1122 (2003).
108. Stepinski, J., Waddell, C., Stolarski, R., Darzynkiewicz, E. & Rhoads, R. E. Synthesis and properties of mRNAs containing the novel ‘anti-reverse’ cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl (3'-deoxy)GpppG. *RNA* **7**, 1486–1495 (2001).
109. Henderson, J. M. *et al.* Cap 1 messenger RNA synthesis with co-transcriptional CleanCap analog by in vitro transcription. *Current Protocols* **1**, e39 (2021).

110. Vaidyanathan, S. *et al.* Uridine depletion and chemical modification increase Cas9 mRNA activity and reduce immunogenicity without HPLC purification. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* **12**, 530–542 (2018).
111. Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009–4017 (2006).
112. Mockey, M. *et al.* mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **340**, 1062–1068 (2006).
113. Silva-Pilipich, N., Beloki, U., Salaberry, L. & Smerdou, C. Self-amplifying RNA: a second revolution of mRNA vaccines against COVID-19. *Vaccines* **12**, 318 (2024).
114. Schmidt, C. & Schnierle, B. S. Self-amplifying RNA vaccine candidates: alternative platforms for mRNA vaccine development. *Pathogens* **12**, 138 (2023).
115. Vogel, A. B. *et al.* Self-amplifying RNA vaccines give equivalent protection against influenza to mRNA vaccines but at much lower doses. *Molecular Therapy* **26**, 446–455 (2018).
116. Andries, O. *et al.* N1-methylpseudouridine-incorporated mRNA outperforms pseudouridine-incorporated mRNA by providing enhanced protein expression and reduced immunogenicity in mammalian cell lines and mice. *Journal of Controlled Release* **217**, 337–344 (2015).
117. Kim, K. Q. *et al.* N1-methylpseudouridine found within COVID-19 mRNA vaccines produces faithful protein products. *Cell Reports* **40**, 111300 (2022).
118. Mulrone, T. E. *et al.* N1-methylpseudouridylation of mRNA causes +1 ribosomal frameshifting. *Nature* **625**, 189–194 (2024).
119. Monroe, J. *et al.* N1-Methylpseudouridine and pseudouridine modifications modulate mRNA decoding during translation. *Nat Commun* **15**, 8119 (2024).
120. Stiving, A. Q. *et al.* Functionality and translation fidelity characterization of mRNA vaccines using platform based mass spectrometry detection. *npj Vaccines* **10**, 38 (2025).

121. Hajj, K. A. & Whitehead, K. A. Tools for translation: non-viral materials for therapeutic mRNA delivery. *Nat Rev Mater* **2**, 17056 (2017).
122. Wang, X. *et al.* Preparation of selective organ-targeting (SORT) lipid nanoparticles (LNPs) using multiple technical methods for tissue-specific mRNA delivery. *Nat Protoc* **18**, 265–291 (2023).
123. Akinc, A. *et al.* The Onpatro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.* **14**, 1084–1087 (2019).
124. Tuma, J. *et al.* Lipid nanoparticles deliver mRNA to the brain after an intracerebral injection. *Biochemistry* **62**, 3533–3547 (2023).
125. Tang, X. *et al.* Simultaneous dendritic cells targeting and effective endosomal escape enhance sialic acid-modified mRNA vaccine efficacy and reduce side effects. *Journal of Controlled Release* **364**, 529–545 (2023).
126. Liu, Y. *et al.* Development of mRNA lipid nanoparticles: targeting and therapeutic aspects. *IJMS* **25**, 10166 (2024).
127. Patel, R., Kaki, M., Potluri, V. S., Kahar, P. & Khanna, D. A comprehensive review of SARS-CoV-2 vaccines: Pfizer, Moderna & Johnson & Johnson. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **18**, 2002083 (2022).
128. Dickerman, B. A. *et al.* Comparative effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 vaccines in U.S. veterans. *N Engl J Med* **386**, 105–115 (2022).
129. Grant, R. *et al.* When to update COVID-19 vaccine composition. *Nat Med* **29**, 776–780 (2023).
130. Doria-Rose, N. *et al.* Antibody persistence through 6 months after the second dose of mRNA-1273 vaccine for Covid-19. *N Engl J Med* **384**, 2259–2261 (2021).
131. Hickey, T. E. *et al.* SARS-CoV-2 IgG Spike antibody levels and avidity in natural infection or following vaccination with mRNA-1273 or BNT162b2 vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **19**, 2215677 (2023).

132. Bullock, J. L. *et al.* Longitudinal assessment of BNT162b2- and mRNA-1273-induced anti-SARS-CoV-2 spike IgG levels and avidity following three doses of vaccination. *Vaccines* **12**, 516 (2024).
133. Coronavirus (COVID-19) Update: FDA authorizes changes to simplify use of bivalent mRNA COVID-19 vaccines. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19-update-fda-authorizes-changes-simplify-use-bivalent-mrna-covid-19-vaccines> (2023) [dostęp: 04.01.2025].
134. Ivanova, E. N. *et al.* mRNA COVID-19 vaccine elicits potent adaptive immune response without the acute inflammation of SARS-CoV-2 infection. *iScience* **26**, 108572 (2023).
135. Kato, H. *et al.* Vaccine-induced humoral response against SARS-CoV-2 dramatically declined but cellular immunity possibly remained at 6 months post BNT162b2 vaccination. *Vaccine* **40**, 2652–2655 (2022).
136. GeurtsvanKessel, C. H. *et al.* Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Sci Immunol* **7**, eabo2202 (2022).
137. Moderna Receives U.S. FDA Approval for RSV Vaccine mRESVIA(R). <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2024/Moderna-Receives-U.S.-FDA-Approval-for-RSV-Vaccine-mRESVIAR/default.aspx> (2024) [dostęp: 04.01.2025].
138. Wilson, E. *et al.* Efficacy and safety of an mRNA-based RSV PreF vaccine in older adults. *N Engl J Med* **389**, 2233–2244 (2023).
139. Al Fayed, N. *et al.* Recent advancement in mRNA vaccine development and applications. *Pharmaceutics* **15**, 1972 (2023).
140. Brandi, R. *et al.* mRNA vaccines against COVID-19 as trailblazers for other human infectious diseases. *Vaccines* **12**, 1418 (2024).
141. Hauguel, T. *et al.* Preclinical immunogenicity and safety of hemagglutinin-encoding modRNA influenza vaccines. *npj Vaccines* **9**, 183 (2024).

142. BioNTech announces positive topline Phase 2 results for mRNA immunotherapy candidate BNT111 in patients with advanced melanoma. <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/biontech-announces-positive-topline-phase-2-results-mrna> (2024) [dostęp: 04.01.2025].
143. Freyn, A. W. *et al.* A multi-targeting, nucleoside-modified mRNA influenza virus vaccine provides broad protection in mice. *Molecular Therapy* **28**, 1569–1584 (2020).
144. McMahon, M. *et al.* Assessment of a quadrivalent nucleoside-modified mRNA vaccine that protects against group 2 influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **119**, e2206333119 (2022).
145. Kheirvari, M., Liu, H. & Tumban, E. Virus-like particle vaccines and platforms for vaccine development. *Viruses* **15**, 1109 (2023).
146. Bayer, M. E., Blumberg, B. S. & Werner, B. Particles associated with Australia Antigen in the sera of patients with leukaemia, Down's syndrome and hepatitis. *Nature* **218**, 1057–1059 (1968).
147. Tariq, H., Batool, S., Asif, S., Ali, M. & Abbasi, B. H. Virus-like particles: revolutionary platforms for developing vaccines against emerging infectious diseases. *Front. Microbiol.* **12**, 790121 (2022).
148. Donaldson, B. *et al.* Virus-like particles, a versatile subunit vaccine platform. in *Subunit Vaccine Delivery* (eds Foged, C., Rades, T., Perrie, Y. & Hook, S.) 159–180 (Springer New York, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-1417-3\_9.
149. Spice, A. J., Aw, R., Bracewell, D. G. & Polizzi, K. M. Synthesis and assembly of hepatitis B virus-like particles in a *Pichia pastoris* cell-free system. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **8**, 72 (2020).
150. Wang, D. *et al.* Rational design of a multi-valent human papillomavirus vaccine by capsomere-hybrid co-assembly of virus-like particles. *Nat Commun* **11**, 2841 (2020).

151. Leroux-Roels, I. *et al.* Immunogenicity, safety, and preliminary efficacy evaluation of OVX836, a nucleoprotein-based universal influenza A vaccine candidate: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet Infectious Diseases* **23**, 1360–1369 (2023).
152. Groth, N. *et al.* Safety and immunogenicity of OVX836, a nucleoprotein-based universal influenza vaccine, co-administered with Fluarix® Tetra, a seasonal hemagglutinin-based vaccine. *Vaccines* **13**, 558 (2025).
153. Ho, J. K.-T., Jeevan-Raj, B. & Netter, H.-J. Hepatitis B virus (HBV) subviral particles as protective vaccines and vaccine platforms. *Viruses* **12**, 126 (2020).
154. Ross, T. M. *et al.* A trivalent virus-like particle vaccine elicits protective immune responses against seasonal influenza strains in mice and ferrets. *PLoS ONE* **4**, e6032 (2009).
155. Liu, J. *et al.* Influenza virus-like particles composed of conserved influenza proteins and GPI-anchored CCL28/GM-CSF fusion proteins enhance protective immunity against homologous and heterologous viruses. *International Immunopharmacology* **63**, 119–128 (2018).
156. Merck GARDASIL9 (Human Papillomavirus 9-Valent Vaccine, Recombinant) [dostęp: 04.01.2025].
157. GSK CERVARIX [Human Papillomavirus Bivalent (Types 16 and 18) Vaccine, Recombinant], [dostęp: 04.01.2025].
158. Zhang, X. *et al.* Design and immunogenicity assessment of HIV-1 virus-like particles as a candidate vaccine. *Sci. China Life Sci.* **54**, 1042–1047 (2011).
159. Ramani, S. *et al.* B-Cell responses to intramuscular administration of a bivalent virus-like particle human norovirus vaccine. *Clin Vaccine Immunol* **24**, (2017).
160. Tottey, S. *et al.* Engineering of a plant-produced virus-like particle to improve the display of the Plasmodium falciparum Pfs25 antigen and transmission-blocking activity of the vaccine candidate. *Vaccine* **41**, 938–944 (2023).

161. Yur, D., Sullivan, M. O. & Chen, W. Highly modular hepatitis B virus-like nanocarriers for therapeutic protein encapsulation and targeted delivery to triple negative breast cancer cells. *J. Mater. Chem. B* **11**, 3985–3993 (2023).
162. Delpeyroux, F., Peillon, N., Blondel, B., Crainic, R. & Streeck, R. E. Presentation and immunogenicity of the hepatitis B surface antigen and a poliovirus neutralization antigen on mixed empty envelope particles. *J Virol* **62**, 1836–1839 (1988).
163. 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).
164. 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).
165. 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 Research* **81**, 113–122 (2009).
166. Kotiw, M. *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* **19**, 268–276 (2012).
167. Collins, K. A., Snaith, R., Cottingham, M. G., Gilbert, S. C. & Hill, A. V. S. Enhancing protective immunity to malaria with a highly immunogenic virus-like particle vaccine. *Sci Rep* **7**, 46621 (2017).
168. Ramasamy, V. *et al.* A tetravalent virus-like particle vaccine designed to display domain III of dengue envelope proteins induces multi-serotype neutralizing antibodies in mice and macaques which confer protection against antibody dependent enhancement in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* **12**, e0006191 (2018).

169. Czarnota, A. *et al.* 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**, 294 (2020).
170. Joe, C. C. D. *et al.* Glycoengineered hepatitis B virus-like particles with enhanced immunogenicity. *Vaccine* **38**, 3892–3901 (2020).
171. Dooley, L. *et al.* Chimeric hepatitis B surface antigen virus-like particles expressing the strep A epitope p\*17 elicit a humoral immune response in mice. *Heliyon* **10**, e30606 (2024).
172. Hepatitis B vaccine safety. <https://www.cdc.gov/vaccine-safety/vaccines/hepatitis-b.html#toc> [dostęp: 04.01.2025].
173. Le, D. T. & Müller, K. M. In vitro assembly of virus-like particles and their applications. *Life* **11**, 334 (2021).
174. Shanmugaraj, B., Malla, A., Bulaon, C. J. I., Phoolcharoen, W. & Phoolcharoen, N. Harnessing the potential of plant expression system towards the production of vaccines for the prevention of human papillomavirus and cervical cancer. *Vaccines* **10**, 2064 (2022).
175. Jenkins, V. CHIKV VLP vaccine. Bavarian Nordic's chikungunya vaccine candidate. <https://www.cdc.gov/acip/downloads/slides-2024-10-23-24/03-Chikungunya-Jenkins-508.pdf> (2024) [dostęp: 04.01.2025].
176. D'Aoust, M. *et al.* The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza. *Plant Biotechnology Journal* **8**, 607–619 (2010).
177. Benvenuto, E. *et al.* Plant molecular farming in the wake of the closure of Medicago Inc. *Nat Biotechnol* **41**, 893–894 (2023).
178. Blanchet, M. & Sureau, C. Analysis of the cytosolic domains of the hepatitis B virus envelope proteins for their function in viral particle assembly and infectivity. *J Virol* **80**, 11935–11945 (2006).
179. Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System User Guide. (2018), [dostęp: 04.01.2025].

180. Hopkins, R. F. & Esposito, D. A rapid method for titrating baculovirus stocks using the Sf-9 Easy Titer cell line. *BioTechniques* **47**, 785–788 (2009).
181. Yoon, S.-J. *et al.* Optimized expression, purification, and rapid detection of recombinant influenza nucleoproteins expressed in Sf9 insect cells. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **28**, 1683–1690 (2018).
182. Li, M. *et al.* Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *Escherichia coli*: characterization of protein domains involved in DNA binding and capsid assembly. *J Virol* **71**, 2988–2995 (1997).
183. Hatton, T., Zhou, S. & Standring, D. N. RNA- and DNA-binding activities in hepatitis B virus capsid protein: a model for their roles in viral replication. *J Virol* **66**, 5232–5241 (1992).
184. Chu, T.-H., Liou, A.-T., Su, P.-Y., Wu, H.-N. & Shih, C. Nucleic acid chaperone activity associated with the arginine-rich domain of human hepatitis B virus core protein. *J Virol* **88**, 2530–2543 (2014).
185. Liu, S. *et al.* Structural comparisons of hepatitis B core antigen particles with different C-terminal lengths. *Virus Research* **149**, 241–244 (2010).
186. Attanasio, R. *et al.* Immunogenicity of hepatitis B surface antigen derived from the baculovirus expression vector system: a mouse potency study. *Biologicals* **19**, 347–353 (1991).
187. Czarnota, A. *et al.* 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).
188. Karikó, K., Kuo, A. & Barnathan, E. S. Overexpression of urokinase receptor in mammalian cells following administration of the in vitro transcribed encoding mRNA. *Gene Ther* **6**, 1092–1100 (1999).
189. Holtkamp, S. *et al.* Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* **108**, 4009–4017 (2006).

190. Swaminathan, G. *et al.* A novel lipid nanoparticle adjuvant significantly enhances B cell and T cell responses to sub-unit vaccine antigens. *Vaccine* **34**, 110–119 (2016).
191. Alameh, M.-G. *et al.* Lipid nanoparticles enhance the efficacy of mRNA and protein subunit vaccines by inducing robust T follicular helper cell and humoral responses. *Immunity* **54**, 2877-2892.e7 (2021).
192. Dai, W. *et al.* Lipid nanoparticles as adjuvant of norovirus VLP vaccine augment cellular and humoral immune responses in a TLR9- and type I IFN-dependent pathway. *J Virol* **98**, (2024).
193. Huang, Y. *et al.* A highly efficient integrated chromatographic procedure for the purification of recombinant hepatitis B surface antigen from *Hansenula polymorpha*. *Protein Expression and Purification* **56**, 301–310 (2007).
194. Jones, C. D. *et al.* Characterization of the T- and B-cell immune response to a new recombinant pre-S1, pre-S2 and SHBs antigen containing hepatitis B vaccine (Hepagene™); evidence for superior anti-SHBs antibody induction in responder mice. *Journal of Viral Hepatitis* **5**, 5–8 (1998).
195. Fuenmayor, J., Gòdia, F. & Cervera, L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology* **39**, 174–180 (2017).
196. Hardy, E. *et al.* Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* **77**, 157–167 (2000).
197. Lanford, R. E. *et al.* Expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen polypeptides in insect cells with a baculovirus expression system. *J Virol* **63**, 1549–1557 (1989).
198. Hilditch, C. M., Rogers, L. J. & Bishop, D. H. L. Physicochemical analysis of the hepatitis B virus core antigen produced by a baculovirus expression vector. *Journal of General Virology* **71**, 2755–2759 (1990).

199. Gazina, E. V., Fielding, J. E., Lin, B. & Anderson, D. A. Core protein phosphorylation modulates pregenomic RNA encapsidation to different extents in human and duck hepatitis B viruses. *J Virol* **74**, 4721–4728 (2000).
200. Hu, J. & Liu, K. Complete and incomplete hepatitis B virus particles: formation, function, and application. *Viruses* **9**, 56 (2017).
201. Jackson, N. A. C., Kester, K. E., Casimiro, D., Gurunathan, S. & DeRosa, F. The promise of mRNA vaccines: a biotech and industrial perspective. *npj Vaccines* **5**, 11 (2020).
202. Nance, K. D. & Meier, J. L. Modifications in an emergency: the role of N1-methylpseudouridine in COVID-19 vaccines. *ACS Cent. Sci.* **7**, 748–756 (2021).
203. Chattopadhyay, S. & Sen, G. C. dsRNA-activation of TLR3 and RLR signaling: gene induction-dependent and independent effects. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **34**, 427–436 (2014).
204. Mu, X. & Hur, S. Immunogenicity of *in vitro*-transcribed RNA. *Acc. Chem. Res.* **54**, 4012–4023 (2021).
205. Fiedler, J. D. *et al.* Engineered mutations change the structure and stability of a virus-like particle. *Biomacromolecules* **13**, 2339–2348 (2012).
206. Martino, M. L., Crooke, S. N., Manchester, M. & Finn, M. G. Single-point mutations in Q $\beta$  virus-like particles change binding to cells. *Biomacromolecules* **22**, 3332–3341 (2021).
207. Motsa, B. B., Sharma, T., Cioffi, M. D., Chapagain, P. P. & Stahelin, R. V. Minor electrostatic changes robustly increase VP40 membrane binding, assembly, and budding of Ebola virus matrix protein derived virus-like particles. *Journal of Biological Chemistry* **300**, 107213 (2024).
208. Izikson, R. *et al.* Safety and immunogenicity of a high-dose quadrivalent influenza vaccine administered concomitantly with a third dose of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in adults aged  $\geq 65$  years: a phase 2, randomised, open-label study. *The Lancet Respiratory Medicine* **10**, 392–402 (2022).

209. Gonen, T. *et al.* Immunogenicity and reactogenicity of coadministration of COVID-19 and influenza vaccines. *JAMA Netw Open* **6**, e2332813 (2023).
210. Murdoch, L. *et al.* Safety and Immunogenicity of the BNT162b2 Vaccine Coadministered with Seasonal Inactivated Influenza Vaccine in Adults. *Infect Dis Ther* **12**, 2241–2258 (2023).
211. Naficy, A. *et al.* No immunological interference or concerns about safety when seasonal quadrivalent influenza vaccine is co-administered with a COVID-19 mRNA-1273 booster vaccine in adults: A randomized trial. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **20**, 2327736 (2024).
212. Tan, L., Trevas, D. & Falsey, A. R. Adult vaccine coadministration is safe, effective, and acceptable: results of a survey of the literature. *Influenza Resp Viruses* **19**, e70090 (2025).
213. Gackowska, K. *et al.* Affinity-purified sHBsAg-based virus-like particles as a platform for foreign mRNA binding. *Virology* **611**, 110651 (2025).

## 12. Osiągnięcia naukowe

### 12.1. Dorobek naukowy powiązany z rozprawą doktorską

- **Gackowska, K.**, Krejmer-Rabalska, M., Drazkowska, K., Jemielity, J., Król, E., Szewczyk, B. (2025). Affinity-purified sHBsAg-based virus-like particles as a platform for foreign mRNA binding. *Virology*, 611, 110651. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2025.110651>

### 12.2. Dodatkowy dorobek naukowy

- Mazur-Panasiuk, N., Rabalski, L., Gromowski, T., Nowicki, G., Kowalski, M., Wydmanski, W., Szulc, P., Kosinski, M., **Gackowska, K.**, Drweska-Matelska, N., Grabowski, J., Piotrowska-Mietelska, A., Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K., Swadzba, J., Labaj, P., Grzybek, M., Pyrc, K. Expansion of a SARS-CoV-2 Delta variant with an 872 nt deletion encompassing ORF7a, ORF7b and ORF8, Poland, July to August 2021. *Eurosurveillance* 26, (2021). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.39.2100902>
- Rabalski, L., Milewska, A., Pohlmann, A., **Gackowska, K.**, Lepionka, T., Szczepaniak, K., Swiatalska, A., Sieminska, I., Arent, Z., Beer, M., Koopmans, M., Grzybek, M., Pyrc, K. Emergence and potential transmission route of avian influenza A (H5N1) virus in domestic cats in Poland, June 2023. *Eurosurveillance* 28, (2023). DOI: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.31.2300390>
- Zakrzewski, M., Beldzinska, P., Gajdowska, F., Golunski, G., **Gackowska, K.**, Strankowska, J., Jamrogiewicz, M., Wyrzykowski, D., Grzyb, K., Gutowska-Owsiak, D., Synak, A., Bojarski, P., Piosik, J. The effect of platinum nanoparticles on the physicochemical properties of daunorubicin. *RSC Adv.* 15, 35407–35420 (2025). DOI: <https://doi.org/10.1039/D5RA02827B>

### 12.3. Konferencje naukowe

- Ninth ESWI Influenza Conference (2023): **Karolina Gackowska**, Bogusław Szewczyk. *Novel virus like particles based on sHBsAg as potential platforms for delivery of mRNA vaccines* – plakat.
- 3rd International Conference of the World Society for Virology (2025): Martyna Krejmer-Rabalska, **Karolina Gackowska**, Ewelina Król, Aneta Jurkiewicz, Roman Szczesny, Bogusław Szewczyk. *Virus-like particles as vehicles for transporting viral mRNA – a novel approach for encapsulation of mRNA vaccines* – plakat.