

Prof. dr hab. Jacek Kuźmak

Państwowy Instytut Weterynaryjny-Państwowy Instytut Badawczy
w Puławach

Recenzja

pracy doktorskiej mgr Karoliny Gackowskiej pt. „Makrocząsteczkowe struktury oparte o cząstki wirusopodobne jako potencjalne nośniki szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA”

Praca doktorska mgr Karoliny Gackowskiej dotyczy opracowania nowej, innowacyjnej platformy do produkcji szczepionek opartych o mRNA, z wykorzystaniem rekombinowanych cząstek wirusopodobnych (VLPs).

Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, jednostce naukowej posiadającej wieloletnią tradycję badań nad cząstkami wirusopodobnymi, w tym nad ich zastosowaniem jako antygenów szczepionkowych.

W swoich badaniach Doktorantka podjęła się sprawdzenia możliwości opracowania i oceny działania szczepionki biwalentnej zawierającej cząstki wirusopodobne oparte o małe białko powierzchniowe wirusa zapalenia wątroby typu B (sHBsAg) i mRNA kodujący sekwencję nukleoproteiny białka wirusa grypy typu A. Przyjęcie takiego założenia w planie pracy doktorskiej jest jak najbardziej racjonalne biorąc pod uwagę ciągłą potrzebę doskonalenia i opracowywania nowych sposobów otrzymywania preparatów do immunoprofilaktyki swoistej zakażeń wirusami HBV i grypy u ludzi. Nie bez znaczenia jest także fakt, że występowanie zakażeń wywoływanych przez HBV i wirus grypy ma zasięg globalny, a liczba nowych zakażeń wg. danych WHO wynosi odpowiednio 1,5 mln i prawie miliard w ciągu roku.

Taka tematyka badawcza niewątpliwie wpisuje się w nowoczesny i bardzo aktualny kierunek badań nad poszukiwaniem nowych, efektywnych platform służących do opracowywania skutecznych narzędzi immunoprofilaktyki w odniesieniu do chorób zakaźnych ludzi i zwierząt. To wyzwanie nabiera szczególnego znaczenia biorąc pod uwagę fakt wysokiej zmienności antygenowej patogenów i związaną z tym ograniczoną skuteczność niektórych preparatów obecnych na rynku. Nie bez znaczenia jest także konieczność poszukiwania nowych narzędzi umożliwiających produkcję szczepionek taniej i w krótkim czasie. Badania zaprezentowane przez Doktorantkę oprócz niewątpliwych wartości poznawczych mają również bezpośredni związek z zastosowaniami praktycznymi w kontekście nowych możliwości wykorzystania platformy do produkcji szczepionek na bazie cząstek wirusopodobnych i mRNA. Perspektywy takie należy rozpatrywać nie tylko

w odniesieniu do wirusa HBV i wirusa grypy ale także innych patogennych wirusów. Jest to ważny, praktyczny efekt pracy doktorskiej mgr Karoliny Gackowskiej.

We Wstępie, który zajmuje 28 stron i relatywnie do pozostałych rozdziałów pracy jest dość obszernym fragmentem, Doktorantka przedstawiła przekrój zagadnień uwzględniających taksonomię wirusa HBV i wirusa grypy, bieżącą sytuację epidemiczną związaną z zakażeniami tymi wirusami, organizację ich genomu, cykl replikacyjny i strukturę białek wirionu. Następnie omówiła szczepionki aktualnie stosowane w immunoprofilaktyce zakażeń HBV i wirusem grypy, wskazując jednocześnie na ich ograniczenia i niedoskonałości. Kolejne rozdziały poświęcone są szeroko analizowanym zagadnieniom dotyczącym konstrukcji i zastosowaniu szczepionek opartych na mRNA oraz szczepionek wykorzystujących technologię cząstek wirusopodobnych. W mojej ocenie rozdział poświęcony szczepionkom mRNA zawiera wartościowe informacje przybliżające czytelnikowi ten nowy i innowacyjny sposób przygotowania preparatów szczepionkowych. Dobrym rozwiązaniem jest tu zestawienie danych w tabeli 1, przedstawiających cechy i stan zaawansowania badań klinicznych nad nowymi szczepionkami mRNA. Podobna uwaga dotyczy szczepionek opartych na cząstkach wirusopodobnych, a rozdział 4.4.2. dotyczący modyfikacji VLPs bazujących na białku sHBsAg dostarcza danych uwiarygadniających zasadność badań, podjętych w ocenianej pracy. Generalnie, ta część pracy wskazuje na znajomość aktualnego piśmiennictwa i dużą wiedzę Doktorantki z omawianego zakresu. Dzięki przedstawionym informacjom osoba czytająca dysertację jest dobrze wprowadzona w istotę zagadnienia jaką jest opracowanie platformy do otrzymywania szczepionek bazujących na cząstkach wirusopodobnych i mRNA.

Kolejny rozdział to prezentacja głównego celu pracy, którym było otrzymanie preparatu szczepionkowego łączącego w sobie cząstki wirusopodobne oparte na białku sHBsAg wirusa HBV i mRNA kodującym nukleoproteinę wirusa grypy typu A. Cel został ujęty w czterech wyszczególnionych, logicznie ze sobą powiązanych zadaniach, które dotyczyły: (I) opracowania metody produkcji i oczyszczania chimerycznych VLPs opartych na białku sHBsAg w systemie owadzim, (II) określenie potencjału cząstek sHBs-VLPs do prezentacji sekwencji mających za cel wiązanie mRNA, (III) badanie możliwości wiązania mRNA przez cząsteczki sHBsAg-VLPs, (IV) Analizy odpowiedzi immunologicznej u doświadczalnych zwierząt.

Rozdziały „Materiały i aparatura” i „Metody” zostały napisane wyczerpująco, a dobór oraz celowość zastosowanych metod w mojej ocenie nie budzi zastrzeżeń. Różnorodność zastosowanych metod obejmujących: manipulacje genetyczne związane z uzyskaniem rekombinowanych wariantów białka TS-sHBsAg, transkrypcję mRNA *in vitro*, sprawdzenie jego wiązania do VLPs, pakiet metod do analizy VLPs, immunizację myszy oraz ocenę odpowiedzi immunologicznej dobrze świadczy o technicznym przygotowaniu mgr Karoliny Gackowskiej do pracy laboratoryjnej. Rozdział ten wystarczająco przybliżył czytającemu część metodyczną pracy i jest dobrym zapleczem do analizy otrzymanych wyników. Można założyć, że jakkolwiek większość z użytych metod była dostępna w laboratorium Zakładu Szczepionek Rekombinowanych, który posiada długą i bogatą tradycję badań nad VLPs, to

musiały być one zoptymalizowane i zaadoptowane na potrzeby opisywanych badań. Dlatego trzeba docenić niewątpliwie duży wkład Doktorantki w metodyczne części pracy. Niemniej jednak mam dwie uwagi do tej części pracy. W opisie testu ELISA (punkt 7.47) brak informacji jakim antygenem opłaszczano płytki. Można przyjąć, że było to białko sHBsAg i NP. Druga uwaga dotyczy protokołu immunizacji myszy. Zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 7.47. surowice krwi immunizowanych myszy z danej grupy, reprezentujące dany punkt czasowy, łączono w jedną pulę i próbkę taką poddawano analizie, a uzyskane wyniki analizowano statystycznie. W mojej ocenie postępowanie takie powinno być poparte wstępnymi badaniami próbek surowicy krwi indywidualnych osobników, w celu potwierdzenia braku istotnych różnic pomiędzy nimi. Byłbym wdzięczny za odpowiedź czy takie badania były prowadzone.

Rozdział „Wyniki” został podzielony na trzy obszary badawcze, w których opisano wyniki licznych doświadczeń, które Doktorantka wykonała w celu osiągnięcia założonych celów pracy. Wyniki uzyskane w każdym z tych zadań badawczych były następnie dyskutowane oddzielnie, co jest moim zdaniem dobrym rozwiązaniem, biorąc pod uwagę dużą liczbę eksperymentów i różnorodność wyników będących ich rezultatem.

W pierwszym zadaniu badawczym Doktorantka zaprojektowała i otrzymała konstrukty zawierające sekwencję kodującą białko sHBsAg oraz dodatkową sekwencję znacznika Twin-Step-tag, dzięki czemu możliwe było zastosowanie chromatografii powinowadztwa do efektywnego oczyszczania tego białka TS-sHBsAg w jednoetapowym procesie. Jest to o tyle ważne że w systemie owadzim białko to nie jest wydzielane na zewnątrz komórek i konieczne jest jego oczyszczanie z lizatów. Równolegle sekwencja kodująca TS-sHBsAg została zmodyfikowana poprzez dodanie dodatkowych sekwencji z motywami mającymi na celu wiązanie mRNA. W efekcie uzyskano cztery konstrukty, które wykorzystano w badaniach nad zoptymalizowaniem procesu nadprodukcji, oczyszczania otrzymanych białek i badania wiązania mRNA.

Ważnym osiągnięciem tych badań z punktu widzenia użycia VLPs jako antygenów szczepionkowych było wykazanie, za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej oraz metody dynamicznego rozpraszania światła, że oczyszczone białka TS-sHBsAg są w stanie samoistnie składać się do cząstek VLPs, z wyjątkiem jednego wariantu, który został pominięty w dalszych badaniach. Badanie możliwości rozłożenia złożonych już VLPs na mniejsze podjednostki w celu zapakowania do nich mRNA możliwe było tylko przy zastosowaniu detergentu; jednak jego późniejsze usunięcie i odtworzenie natywnej struktury VLPs okazało się niemożliwe. W konkluzji nie zdecydowano się kontynuować badań w tym kierunku.

Kolejny etap związany był z zaprojektowaniem matrycy do transkrypcji *in vitro* mRNA w celu wykazania możliwości wiązania mRNA do białek tworzących struktury VLPs. W ramach tych badań zaprojektowano cztery matryce, wybierając do właściwych badań z użyciem protokołu immunizacji tę jedną, z czapczką typu CleanCap AG oraz sekwencją sygnału pakującego z genomu HBV jako 5'UTR. Funkcjonalność tego konstruktu została potwierdzona przy użyciu sekwencji kodujących białko zielonej fluorescencji (EGFP), która następnie została zastąpiona przez sekwencję kodującą białko docelowe tj. nukleoproteinę wirusa grypy typu A. Prawidłowość funkcjonowania takiego konstruktu została potwierdzona

poprzez immunodetekcję białka NP w lizatach transfekowanych komórek HEK293T i Vero. W związku z tym mam pytanie – z czego wynikała zasadność badania funkcjonalności tego konstruktów z użyciem sekwencji dla białka EGFP, a nie użycia w badaniach wyłącznie sekwencji dla białka NP.

Komplementarnymi badaniami wykonanymi przez Doktorantkę było sprawdzenie możliwości wiązania mRNA przez wybrane warianty rekombinowanego białka TS-sHBsAg. W mojej ocenie są to najbardziej atrakcyjne wyniki badań przedstawione w Dysertacji, ponieważ odnoszą się one bezpośrednio do wskazania, czy makrocząsteczkowe struktury oparte o VLPs mogą być potencjalnymi nośnikami szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA. Niewątpliwie ważnym osiągnięciem było wykazanie, że w warunkach białek częściowo zrenaturowanych, w przypadku trzech wariantów, możliwe było wiązanie mRNA białka NP, jakkolwiek proces taki w warunkach natywnych, czyli złożonych VLPs obserwowany był tylko w przypadku jednego wariantu, przy zastosowaniu metody dot blot i fluorescencyjnie znakowanego mRNA. Chociaż jak konkluduje Doktorantka w punkcie 8.3, wyniki takie nie potwierdzają jednoznacznie wewnętrznej lokalizacji mRNA w VLPs, to uważam, że są one atrakcyjne i obiecujące przy podejmowaniu kolejnych badań. Potwierdzają także potencjał wariantów capmut1, capmut2 i capsul1 jako nośników szczepionkowego mRNA. Do tej części pracy mam pytanie. W punkcie 8.2 do badania możliwości wiązania mRNA użyte zostały radioaktywnie znakowane mRNA, kodujące antygeny E i NS5 wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Doktorantka argumentuje wybór takich mRNA koniecznością sprawdzenia czy długość lub skład sekwencji nukleotydowej mają wpływ na wiązanie do białek. O ile kryterium długości zostało zweryfikowane wynikami przedstawianymi na ryc. 36 to w pracy nie znalazłem informacji odnoszących się do analizy składu sekwencji i ich wpływu na wiązanie się z białkiem. Byłbym wdzięczny za odpowiedź.

W ostatnim zadaniu Doktorantka podjęła próbę analizy immunogenności otrzymanych preparatów szczepionkowych na modelu mysim, który uwzględniały użycie: VLPs, mRNA-NP oraz mieszaniny VLPs i mRNA-NP, uzupełnione dodatkiem adiuwantu AddaVax lub nanocząstek lipidowych. W badaniach tych zarówno VLPs oparte na białku sHBsAg, jak i mRNA kodujące nukleoproteinę, były immunogenne indukując syntezę swoistych przeciwciał, wykrywanych testem ELISA jak i sekrecję uwolnionego IFN gamma. Pośród wszystkich użytych preparatów najwyższy poziom odpowiedzi humoralnej jak i komórkowej indukował wariant białka TS-sHBsAg-capmut1 w mieszaninie z mRNA-NP z nanocząsteczkami lipidowymi. Wyniki te można brać pod uwagę jako optymalna forma formulacji preparatu szczepionkowego otrzymanego przy zastosowaniu nowej platformy szczepionkowej.

W podsumowaniu rozdział „Wyniki” ocenić należy bardzo pozytywnie. Na uwagę zasługuje różnorodność przeprowadzonych obserwacji, ale jednocześnie ich tematyczna spójność, podporządkowana głównemu celowi pracy jakim było opracowanie nowej, innowacyjnej platformy do produkcji szczepionek z wykorzystaniem VLPs i mRNA.

Rozprawę kończy rozdział „Podsumowanie”, zawierający 5 punktów, będących rekapitulacją przeprowadzonych doświadczeń. Oceniana praca jest ważnym opracowaniem mogącym przyczynić się do optymalizacji procesu projektowania i otrzymywania antygenów szczepionkowych, opartych o na różnych platformach biotechnologicznych z wykorzystaniem rekombinowanych cząstek wirusopodobnych i mRNA. Otwiera to nowe perspektywy dla skutecznej immunoprofilaktyki chorób zakaźnych ludzi i zwierząt.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr Karoliny Gackowskiej pt.: „Makrocząsteczkowe struktury oparte o cząstki wirusopodobne jako potencjalne nośniki szczepionek bazujących na stabilizowanym mRNA” odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z dnia 14 marca 2003 roku ((Dz. U. z 2003 r., Nr 65, poz.595) z późniejszymi zmianami i przedstawiam Radzie Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii, Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego wniosek o dopuszczenie mgr Karoliny Gackowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Puławy, 12.03.2026r.


Prof. dr hab. Jacek Kuźmak