



Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Marta Zimna

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

Recombinant virus-like particles of tick-borne
encephalitis virus produced in *Leishmania tarentolae*
expression system as a potential vaccine antigen

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

Promotor: dr hab. Ewelina Król, prof. UG
Zakład Szczepionek Rekombinowanych

GDAŃSK 2024

Podziękowania

Dr hab. Ewelinie Król, prof. UG za motywację, opiekę nad przebiegiem mojej pracy naukowej, a przede wszystkim za wiarę i pomoc w realizacji kariery naukowej.

Dr Gabrieli Brzuska za przekazaną wiedzę i umiejętności, a także codzienną pomoc i wsparcie.

Wszystkim obecnym i byłym Koleżankom i Kolegom z Zakładu Szczepionek Rekombinowanych oraz Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów za wspaniałą atmosferę w pracy i wsparcie w realizacji eksperymentów. Eli, Oli i Gosi za pomoc administracyjną i techniczną. Ani, Klaudii, Ewie i Oli za codzienne wsparcie, umiłanie wielu godzin pracy oraz pomoc w realizacji eksperymentów, a także za wspaniałą atmosferę.

Mojej rodzinie za nieograniczone wsparcie, wiarę we mnie, zainteresowanie oraz motywację.

Z całego serca dziękuję!

Praca doktorska powstała dzięki finansowaniu ze środków projektów:

1. „Wirus kleszczowego zapalenia mózgu - poznanie mechanizmów użytecznych w leczeniu i profilaktyce” realizowanego pod kierownictwem dr hab. Eweliny Król, prof. UG, w ramach konkursu SONATA 10 Narodowego Centrum Nauki (2015/19/D/NZ6/01717).



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

2. „Opracowanie wydajnej metody oczyszczania rekombinowanych cząstek wirusopodobnych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu stanowiących potencjalny antygen szczepionkowy do zapobiegania zakażeniom wirusem kleszczowego zapalenia mózgu” realizowanego pod kierownictwem dr hab. Eweliny Król, prof. UG, w ramach konkursu Inkubator Innowacyjności Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW/2020/317/DIR).

3. „Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu oraz ich zastosowanie jako antygen szczepionkowy do zapobiegania zakażeniom wirusem kleszczowego zapalenia mózgu” realizowanego pod kierownictwem prof. dr. hab. Bogusława Szewczyka, w ramach konkursu Inkubator Innowacyjności Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (MNiSW/2020/317/DIR).



Minister
Nauki

4. „Opracowanie modyfikowanych, rekombinowanych cząstek wirusopodobnych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu jako potencjalnego antygeny szczepionkowego” realizowanego pod kierownictwem mgr Marty Zimnej, w ramach konkursu UGrants Uniwersytetu Gdańskiego (533-0C30-GS40-21).



Uniwersytet
Gdański

Spis treści

1.	Wykaz skrótów	6
2.	Streszczenie	8
3.	Abstract (streszczenie w języku angielskim)	11
4.	Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy	14
5.	Wstęp.....	15
5.1.	Wirus kleszczowego zapalenia mózgu.....	15
5.1.1.	Klasyfikacja taksonomiczna.....	15
5.1.2.	Genom i białka wirusowe.....	16
5.1.3.	Białka powierzchniowe prM/M i E.....	18
5.1.4.	Struktura wirionu.....	20
5.1.5.	Transmisja i wywoływane choroby.....	22
5.1.6.	Odpowiedź immunologiczna w infekcji TBEV	24
5.1.7.	Epidemiologia	25
5.1.8.	Metody prewencji i leczenia	26
5.2.	Cząstki wirusopodobne (VLPs) jako antygeny szczepionkowe	27
5.2.1.	Strategie produkcji VLPs	29
5.2.2.	System ekspresji <i>Leishmania tarentolae</i>	30
5.2.3.	Formulacja szczepionek opartych o VLPs	31
6.	Cel badań.....	33
7.	Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy	34
7.1.	(P1) <i>Leishmania tarentolae</i> as a platform for the production of vaccines against viral pathogens. Zimna, M., Krol, E. (2024). <i>NPJ Vaccines</i> . 9(1):212. https://doi.org/10.1038/s41541-024-01005-9	34
7.2.	(P2) Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on <i>Leishmania</i> -derived virus-like particles. Zimna,	

M., Brzuska, G., Salát, J., Svoboda, P., Barańska, K., Szewczyk, B., Růžek, D., Krol, E. (2023). <i>Antiviral research</i> , 209, 105511. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511	43
7.3. (P3) Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of Leishmania-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate. Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Růžek, D., Krol, E. (2024). <i>Antiviral research</i> , 228, 105941. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941	55
8. Podsumowanie badań	63
8.1. Produkcja i charakterystyka VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym <i>L. tarentolae</i>	63
8.2. Ocena immunogenności VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym <i>L. tarentolae</i>	65
8.3. Wpływ adiuwantu i drogi podania na immunogenność VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym <i>L. tarentolae</i>	66
9. Wnioski końcowe	69
10. Literatura	70
11. Inne osiągnięcia naukowe	77
11.1. Publikacje naukowe niebędące częścią rozprawy	77
11.2. Konferencje naukowe	77
11.3. Patenty	77
11.4. Zgłoszenia patentowe	77
11.5. Granty naukowe	78
11.6. Pozostałe nagrody	78
12. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy	79

1. Wykaz skrótów

APCs – komórki prezentujące antygen (*antigen presenting cells*)

DCs – komórki dendrytyczne (*dendritic cells*)

DENV – wirus dengi (*dengue virus*)

ELISA – test immunoenzymatyczny (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

ELISPOT – enzymatyczny test immunospot (*enzyme-linked immunospot assay*)

ER – retikulum endoplazmatyczne (*endoplasmic reticulum*)

HBV – wirus zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus*)

HPV – wirus brodawczaka ludzkiego (*human papilloma virus*)

IFN- γ – interferon γ

IL-2 – interleukina 2

IL-4 – interleukina 4

KZM – kleszczowe zapalenie mózgu

NS – białko niestrukturalne (*non-structural protein*)

NTA – analiza śledzenia nanocząstek (*nanoparticles tracking analysis*)

ORF – otwarta ramka odczytu (*open reading frame*)

OUN – ośrodkowy układ nerwowy

PRRs – receptory rozpoznające wzorce (*pattern recognition receptors*)

TBEV – wirus kleszczowego zapalenia mózgu (*tick-borne encephalitis virus*)

TBEV-Bkl – wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep bajkalski (*tick-borne encephalitis virus Baikalian strain*)

TBEV-Eur – wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep europejski (*tick-borne encephalitis virus European strain*)

TBEV-FE – wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep dalekowschodni (*tick-borne encephalitis virus Far-Eastern strain*)

TBEV-Him – wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep himalajski (*tick-borne encephalitis virus Himalayan strain*)

TBEV-Sib – wirus kleszczowego zapalenia mózgu szczep syberyjski (*tick-borne encephalitis virus Siberian strain*)

UTR – region nieulegający translacji (*untranslated region*)

VLPs – cząstki wirusopodobne (*virus-like particles*)

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (*World Health Organization*)

WNV – wirus Zachodniego Nilu (*West Nile virus*)

YFV – wirus żółtej gorączki (*yellow fever virus*)

ZIKV – wirus Zika (*Zika virus*)

2. Streszczenie

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

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

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

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

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

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

VLPs produkowane są w niekonwencjonalnym systemie ekspresyjnym opartym na pierwotniaku, dzięki czemu możliwa jest wydajna produkcja i oczyszczanie cząstek, a dzięki temu niska cena potencjalnej szczepionki. Sprawia to, że opracowana potencjalna szczepionka

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

3. Abstract (streszczenie w języku angielskim)

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) represents a significant public health concern across various regions of central, eastern, and northern Europe, as well as northern Asia, resulting in severe neurological infections, such as encephalitis or meningitis. The primary mode of transmission is through tick bites, although consumption of dairy products from infected animals such as goats, cattle, and sheep also presents a notable risk factor. Vaccines based on the inactivated virus are available against TBEV; however, no specific antiviral therapy has been developed so far. Despite the substantial increase in the number of TBEV infections, vaccination rates remain low in many affected countries due to the high costs of existing vaccines. Moreover, due to the high costs they are not widely used as veterinary vaccine, highlighting the urgent need for alternative preventive measures.

The approach presented in this dissertation based on TBEV virus-like particles (VLPs), that mimic the structure of native viral particles but lack genetic material, exhibited high potential as a vaccine antigen. Notably, a significant milestone was achieved by demonstrating the utility of using the protozoan *L. tarentolae* expression system for the efficient production of TBEV VLPs. Through functional characterization, it was confirmed that the recombinant structural proteins (prM/M and E) of TBEV formed VLPs that were highly recognized by neutralizing antibodies in *in vitro* analyses.

In order to assess the immunogenicity of the obtained particles, immunization studies were carried out in a mice animal model. The animals were vaccinated with three doses of VLPs in combination with the AddaVax™ adjuvant, and then the obtained post-immunization sera were analyzed. Analyses showed high levels of antibodies against TBEV proteins and the inactivated virus. The virus neutralization test showed a high ability to neutralize TBEV using post-immunization sera, which confirmed the effectiveness of VLPs as a vaccine antigen. The high potential of the obtained VLPs for use in a potential vaccine was also confirmed in a challenge experiment, where immunization with VLPs in combination with an adjuvant provided 100% protection against the development of symptoms of infection in mice administered with a lethal dose of the virus.

The next stage of the research was to determine the most effective route of administration and combination with an adjuvant for the potential vaccine. Building on previous findings that demonstrated the efficacy of VLP immunization in challenge experiments, the focus at this stage was to evaluate the resulting immune response profile. Using mice as an animal model, six different groups were immunized with VLPs via subcutaneous (s.c.) or intramuscular (i.m.)

administration, with or without adjuvants (AddaS03™ and Alhydrogel®+MPLA). T-cell responses were analyzed using an enzyme-linked immunospot assay (ELISPOT), showing interferon γ production primarily in groups adjuvated with Alhydrogel®+MPLA.

Moreover, antibody responses were assessed, demonstrating increasing levels of antibodies after each dose, with significantly higher concentrations observed in adjuvanted groups. Additionally, IgG subclass titers highlighted a more balanced immune response in adjuvanted groups, particularly with Alhydrogel®+MPLA in i.m. administration. Furthermore, antibody avidity analysis revealed higher avidity in adjuvanted groups, emphasizing the role of adjuvants in enhancing antibody quality. Neutralization assays demonstrated higher titers in adjuvanted groups, particularly in i.m. administration, indicating superior neutralizing potential against various TBEV strains. Overall, the findings suggest that VLPs combined with Alhydrogel® and MPLA in i.m. administration elicit a robust and balanced immune response, with enhanced neutralizing antibody production compared to previous studies. This optimized vaccination approach holds promise for effectively combating TBEV infections.

To sum up, the results obtained as part of this doctoral dissertation indicate that the obtained TBEV VLPs are a very good candidate for an alternative vaccine against this virus. Studies aimed at characterizing the produced recombinant proteins showed that they were functional and formed VLPs, which were used for further research. Their effectiveness in preventing infection has been demonstrated in several stages of animal testing. They confirmed full effectiveness in protection against infection and allowed to indicate the potentially most effective combination with an adjuvant and the route of vaccine administration.

VLPs are produced in an unconventional expression system based on a protozoan, thanks to which efficient production and purification of particles is possible, and thus a low price of the potential vaccine. This makes the developed potential vaccine competitive with currently available vaccines based on inactivated virus. The implementation of the developed recombinant vaccine with lower costs could significantly contribute to increasing the availability of the TBEV vaccine. Production costs could be reduced compared to currently available vaccines due to the use of an expression system based on cost-effective reagents, the use of simple purification methods and the recombinant antigen, which does not require such high levels of security during production as an inactivated virus-based vaccine. A cheap but effective and safe vaccine protecting against TBEV infection could be widely used. The low cost of the vaccine could also allow it to be used as a veterinary vaccine, which is not currently available. Consumption of dairy products from infected animals is one of the ways of transmitting the virus to humans. Therefore, introducing common vaccinations for farm

animals would both contribute to reducing the reservoir of the virus in the environment and would also limit the possibility of human infection.

4. Lista publikacji wchodzących w skład rozprawy

W skład niniejszej rozprawy wchodzi następujące publikacje:

- **(P1) Leishmania tarentolae as a platform for the production of vaccines against viral pathogens.** Zimna, M., Krol, E. (2024). *NPJ Vaccines*. 9(1):212.
<https://doi:10.1038/s41541-024-01005-9>
- **(P2) Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on Leishmania-derived virus-like particles.** Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Svoboda, P., Barańska, K., Szewczyk, B., Růžek, D., Krol, E. (2023). *Antiviral research*, 209, 105511.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511>
- **(P3) Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of Leishmania-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate.** Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Růžek, D., Krol, E. (2024). *Antiviral research*, 228, 105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

Publikacja P1 jest przeglądem literatury na temat dotychczasowych zastosowań systemu ekspresyjnego *L. tarentolae* w produkcji białek wirusowych, zwłaszcza do zastosowania jako potencjalne antygeny szczepionkowe i stanowi uzupełnienie wstępu przedstawionego w tej rozprawie. Publikacje P2 oraz P3 są przedstawieniem wyników badań przeprowadzonych w ramach przygotowania tej rozprawy i stanowią opis realizacji opisanych poniżej zadań badawczych.

5. Wstęp

5.1. Wirus kleszczowego zapalenia mózgu

Kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) jest jedną z najpoważniejszych chorób wirusowych przenoszonych przez kleszcze, stanowiącą poważne zagrożenie zdrowotne w wielu częściach Europy i Azji. Wywołuje ją wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV, ang. *tick-borne encephalitis virus*), który został po raz pierwszy wyizolowany i opisany w 1937 roku przez radzieckiego wirusologa Leonida Zilbera, który zidentyfikował go jako czynnik etiologiczny odpowiedzialny za przypadki zapalenia mózgu występujące w regionach leśnych Dalekiego Wschodu¹. Infekcja TBEV może prowadzić do poważnych zaburzeń neurologicznych, a nawet śmierci. Ze względu na brak specyficznego leczenia przeciwwirusowego, kluczową rolę w profilaktyce tej choroby odgrywają szczepienia. Szczepienia przeciwko TBEV, jako jedna z nielicznych skutecznych metod zapobiegania kleszczowemu zapaleniu mózgu, stały się istotnym narzędziem w walce z rosnącym zagrożeniem epidemiologicznym².

5.1.1. Klasyfikacja taksonomiczna

TBEV należy do rodzaju *Orthoflavivirus* (do niedawna *Flavivirus*), który składa się z ponad 70 rozpoznanych wirusów, z których wiele jest przenoszonych przez stawonogi, takie jak komary i kleszcze. Rodzaj ten należy do rodziny *Flaviviridae*. Zaliczają się do niego także inne patogeny odpowiedzialne za poważne choroby u ludzi, takie jak wirus żółtej gorączki (YFV, ang. *yellow fever virus*), wirus dengi (DENV, ang. *dengue virus*), wirus Zachodniego Nilu (WNV, ang. *West Nile virus*) oraz wirus Zika (ZIKV, ang. *Zika virus*). Zgodnie z klasyfikacją przedstawioną przez Międzynarodowy Komitet Taksonomii Wirusów (ICTV, ang. *International Committee on Taxonomy of Viruses*) nazwa gatunkowa TBEV została niedawno zmieniona na *Orthoflavivirus encephalitis*, jednak nadal powszechnie stosowana jest angielska nazwa, natomiast skrót TBEV nie został zmieniony³. TBEV jest jednym z najważniejszych przedstawicieli rodzaju *Orthoflavivirus*, szczególnie w kontekście chorób przenoszonych przez kleszcze.

W ramach gatunku TBEV klasycznie wyróżnia się trzy główne subtypy: europejski (TBEV-Eur), syberyjski (TBEV-Sib) oraz dalekowschodni (TBEV-FE). Każdy z nich charakteryzuje się specyficznymi cechami epidemiologicznymi, zasięgiem geograficznym oraz potencjalnym przebiegiem klinicznym choroby. TBEV-Eur występuje głównie w Europie

Środkowej i Wschodniej, subtyp syberyjski TBEV-Sib jest spotykany na obszarach Rosji i Syberii, natomiast TBEV-FE dominuje w regionach Dalekiego Wschodu, w tym w Rosji, Chinach i Japonii. Oprócz rozmieszczenia geograficznego podtypy te wykazują różnice w gatunkach wektorów i patogeniczności, chociaż mają wspólną ogólną organizację i strukturę genomu⁴.

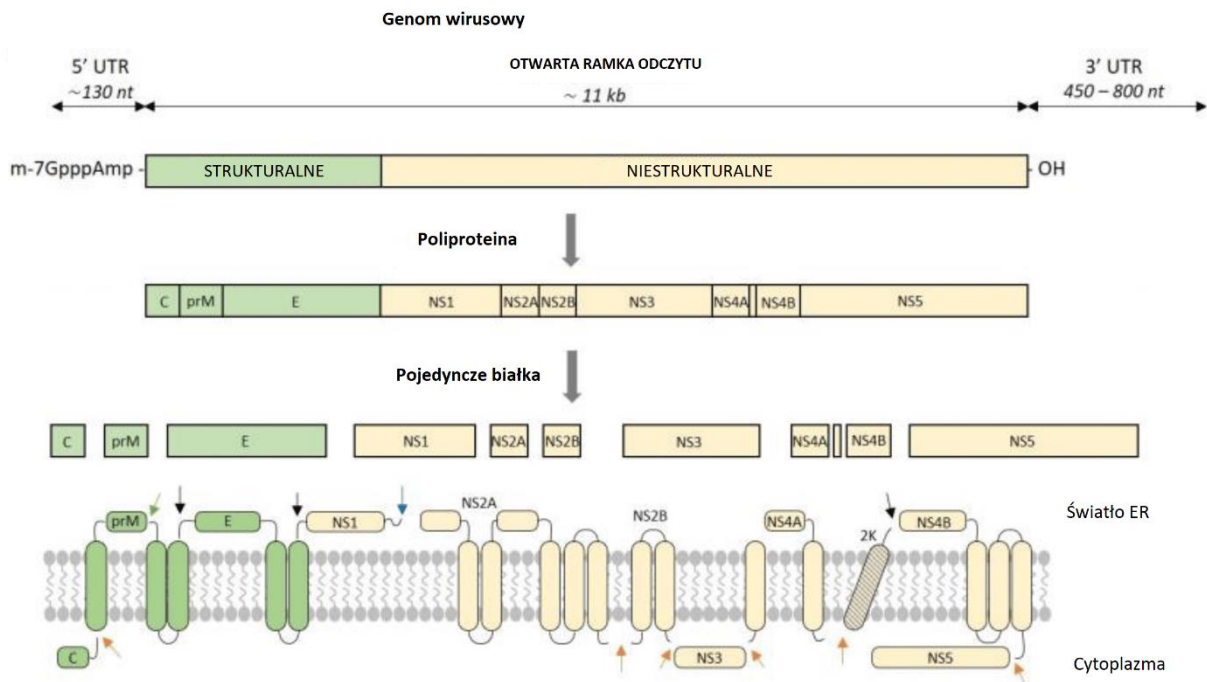
W ostatnich latach, dzięki postępowi w technikach molekularnych, zidentyfikowano nowe subtypy TBEV, które poszerzyły naszą wiedzę na temat jego różnorodności genetycznej. Odkrycie subtypów, takich jak np. subtyp bajkalski (TBEV-Bkl) czy himalajski (TBEV-Him), uwidocznilo jeszcze bardziej złożoność ewolucyjną wirusa i jego adaptację do różnych ekologicznych nisz oraz żywicieli. Nowe subtypy mogą mieć unikalne cechy epidemiologiczne i patogenne, co podkreśla konieczność ciągłego monitorowania wirusa w różnych regionach geograficznych^{5,6}.

5.1.2. Genom i białka wirusowe

TBEV to mały, osłonkowy wirus RNA o jednoniciowym genomie RNA o dodatniej polarności, którego długość wynosi około 11 kb (Ryc. 1). Genom TBEV posiada pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ORF, ang. *open reading frame*), która zajmuje prawie całą długość genomu i koduje pojedynczą poliproteinę. Poliproteina ta ulega następnie procesowi posttranslacyjnej proteolizy, katalizowanej zarówno przez proteazy wirusowe, jak i komórkowe, w wyniku czego powstają poszczególne białka wirusowe. Białka te dzielą się na strukturalne oraz niestukturalne⁷.

Na obu końcach genomu TBEV znajdują się niekodujące regiony (UTR, ang. *untranslated regions*). 5'UTR i 3'UTR pełnią kluczowe funkcje w regulacji cyklu życiowego wirusa. 5'UTR jest związany z inicjacją translacji, natomiast 3'UTR bierze udział w stabilizowaniu RNA oraz w jego replikacji. Regiony te mogą również zawierać elementy strukturalne, które są istotne dla oddziaływań z białkami wirusowymi i komórkowymi⁸.

Replikacja wirusa zachodzi w cytoplazmie zakażonej komórki, gdzie białka niestukturalne tworzą kompleks replikacyjny na zmodyfikowanych błonach retikulum endoplazmatycznego (ER, ang. *endoplasmic reticulum*). NS5, kluczowa polimeraza RNA, katalizuje syntezę nowej nici RNA na matrycy genomu wirusa⁸.



Rycina 1. Organizacja genomu, poliproteiny i pojedynczych białek TBEV. Miejsca cięcia dla wirusowej proteazy serynowej oznaczono czarnymi strzałkami, miejsca cięcia dla peptydazy sygnałowej gospodarza pomarańczowymi strzałkami, nieznane miejsca cięcia dla proteazy gospodarza niebieską strzałką, a miejsce cięcia dla furyny zieloną strzałką (na podstawie Pustijanac *et al.*, 2023).

Białka strukturalne TBEV obejmują:

- C – białko kapsydu, które formuje osłonę wirusowego RNA, tworząc nukleokapsyd;
- prM/M – prekursor białka błonowego, które podczas dojrzewania wirusa przekształca się w białko M, chroniąc białko E przed przedwczesną aktywacją;
- E – białko osłonkowe, kluczowe dla wiązania wirusa z receptorami na powierzchni komórek gospodarza oraz dla procesu fuzji błony wirusowej z błoną komórkową⁹.

Białka niestrukturalne (ang. *non-structural*, NS) pełnią różnorodne funkcje związane z replikacją RNA oraz modulacją odpowiedzi immunologicznej gospodarza. W skład tych białek wchodzi:

- NS1 – białko sekrecyjne, uczestniczące w replikacji wirusa oraz w interakcji z układem immunologicznym gospodarza;
- NS2A – białko błonowe, zaangażowane w organizację kompleksu replikacyjnego;
- NS2B – kofaktor proteazy wirusowej NS3;

- NS3 – proteaza wirusowa oraz helikaza, niezbędna dla replikacji wirusa;
- NS4A – białko błonowe, które modyfikuje błony komórkowe, tworząc platformę dla replikacji wirusowego RNA;
- NS4B – białko pełniące funkcję regulatora replikacji oraz modulującego odpowiedź interferonową;
- NS5 – największe białko niestrukturalne, będące polimerazą RNA zależną od RNA oraz metylotransferazą, odpowiedzialną za syntezę i kapowanie nowo powstałego RNA wirusa⁹.

5.1.3. Białka powierzchniowe prM/M i E

Białko prM (*pre-membrane*) jest syntetyzowane jako prekursor, który w procesie dojrzewania wirusa ulega proteolitycznemu cięciu, prowadzącemu do powstania dojrzałego białka M (*membrane*). prM pełni funkcję chaperonową dla białka E, chroniąc je przed przedwczesną aktywacją i nieprawidłowym fałdowaniem w trakcie procesu morfogenezy wirionu. Dopiero po osiągnięciu pełnej dojrzałości wirionu w kwaśnym środowisku pęcherzyków wydzielniczych komórki gospodarza, proteaza furynowa katalizuje odcięcie fragmentu pr od białka prM, pozostawiając w wirionie dojrzałe białko M¹⁰.

Białko prM składa się z dwóch domen: N-terminalnej domeny pr, która zostaje odcięta podczas dojrzewania wirionu, oraz domeny M, która posiada region transmembranowy kotwiczący białko w błonie wirusa. Po odcięciu fragmentu pr, dojrzałe białko M pozostaje w wirionie i pełni funkcję strukturalną, stabilizując osłonkę wirusa¹⁰.

Białko E (*envelope*) jest głównym białkiem powierzchniowym TBEV, odpowiedzialnym za wejście wirusa do komórki gospodarza poprzez wiązanie się z receptorami komórkowymi oraz fuzję osłonki wirusowej z błoną komórkową gospodarza. Białko E jest glikoproteiną złożoną z trzech głównych domen: domeny I (DI), domeny II (DII) oraz domeny III (DIII). Dodatkowo, w C-terminalnej części białka E znajduje się region *stem*, który łączy ektodomenę z dwoma regionami transmembranowymi kotwiczącymi białko w błonie wirusa^{11,12}.

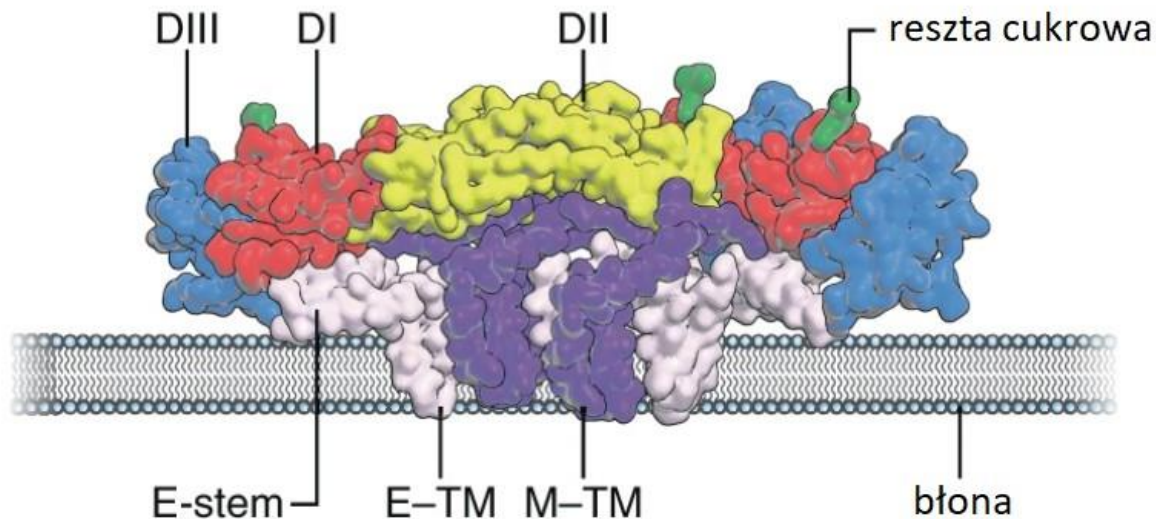
DI stanowi centralny rdzeń strukturalny białka E, do którego przyłączone są pozostałe domeny. DII zawiera region fuzji (*fusion loop*), który uczestniczy w fuzji błony wirusowej z błoną endosomalną komórki gospodarza, co jest kluczowym etapem w cyklu infekcyjnym wirusa. Immunoglobulinopodobna DIII odgrywa kluczową rolę w interakcji z receptorami na powierzchni komórki gospodarza^{12,13}. Jest ona również szczególnie istotna

z immunologicznego punktu widzenia, gdyż przeciwciała neutralizujące, które mogą blokować zakażenie wirusem, najczęściej celują właśnie w tę domenę¹⁴.

N-glikozylacja jest istotną modyfikacją posttranslacyjną białek prM/M i E, wpływającą na ich strukturę, stabilność oraz funkcje biologiczne. W przypadku białka prM, *N*-glikozylacja zachodzi w N-końcowej części domeny pr, co jest ważne dla prawidłowego fałdowania białka oraz jego funkcji chaperonowej wobec białka E. Brak *N*-glikozylacji białka prM może prowadzić do nieprawidłowej morfogenezy wirionów i obniżonej zakaźności wirusa¹⁵.

Białko E również podlega *N*-glikozylacji, co ma kluczowe znaczenie dla jego funkcji. Glikozylacja może wpływać na proces fuzji błon, stabilność białka, a także na zdolność wirusa do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dodatkowo może maskować epitopy białka E, utrudniając rozpoznanie wirusa przez przeciwciała¹⁵. Niemniej jednak, pewne epitopy, zwłaszcza w obrębie domeny III, pozostają dostępne dla przeciwciał neutralizujących, co czyni DIII atrakcyjnym celem dla opracowywania szczepionek oraz terapii przeciwciałami monoklonalnymi¹⁴. *N*-glikozylacja może też wpływać na zdolność białka E do tworzenia cząstek wirusowych¹⁶.

W dojrzałym wirionie TBEV białka M i E są rozmieszczone w zewnętrznej błonie lipidowej wirusa (Ryc. 2). Białko E występuje w postaci homodimerów, które układają się równolegle do powierzchni wirionu. Każdy homodimer białka E jest silnie zakotwiczony w błonie wirusowej za pośrednictwem dwóch domen transmembranowych, przechodzących przez dwuwarstwę lipidową. Białko M jest również zintegrowane z błoną wirusową, a jego pojedyncza domena transmembranowa zakotwicza je w dwuwarstwie lipidowej. Białko M, pozostaje w bliskim kontakcie z białkiem E, co wspiera stabilność osłonki wirusa i zapewnia prawidłowe ułożenie białek w błonie. Na powierzchni wirionu białka E układają się w struktury przypominające kratkę, tworząc ściśle przylegające do siebie dimery. Takie ułożenie zapewnia optymalną interakcję z receptorami na powierzchni komórek gospodarza podczas infekcji^{11,17,18}.



Rycina 2. Schemat białek powierzchniowych E i M zakotwiczonych w błonie lipidowej TBEV (na podstawie Pierson i Diamond, 2020).

Białka prM i E wykazują zdolność do samoorganizacji w struktury przypominające wirusy, nazywane cząstkami wirusopodobnymi (VLPs, ang. *virus-like particles*). VLPs to struktury sferyczne, które morfologicznie przypominają wiriony, ale nie zawierają materiału genetycznego, co czyni je niezdolnymi do replikacji i zakażenia komórek. Ta właściwość jest wynikiem interakcji między białkami prM i E, które naśladują procesy zachodzące podczas tworzenia pełnych wirionów. Proces ten nie wymaga obecności innych wirusowych komponentów, co wskazuje na kluczową rolę białek prM i E w samodzielnym formowaniu struktur wirusopodobnych^{19–21}.

Zdolność do tworzenia VLPs ma istotne znaczenie w kontekście badań nad szczepionkami przeciwko TBEV. VLPs mogą być wykorzystane jako bezpieczna alternatywa do szczepionek bazujących na żywych, atenuowanych lub inaktywowanych wirusach, ponieważ indukują odpowiedź immunologiczną podobną do odpowiedzi na zakażenie wirusem, ale nie niosą ryzyka wywołania choroby²². W szczególności, białko E eksponowane na powierzchni VLPs jest głównym celem dla neutralizujących przeciwciał, co czyni VLPs obiecującą platformą do opracowywania szczepionek przeciwko kleszczowemu zapaleniu mózgu²³.

5.1.4. Struktura wirionu

TBEV jest wirusem osłonkowym o ikosaedralnej strukturze, której średnica wynosi około 50 nm. Wirion składa się z osłonki lipidowej, w której zakotwiczone są białka

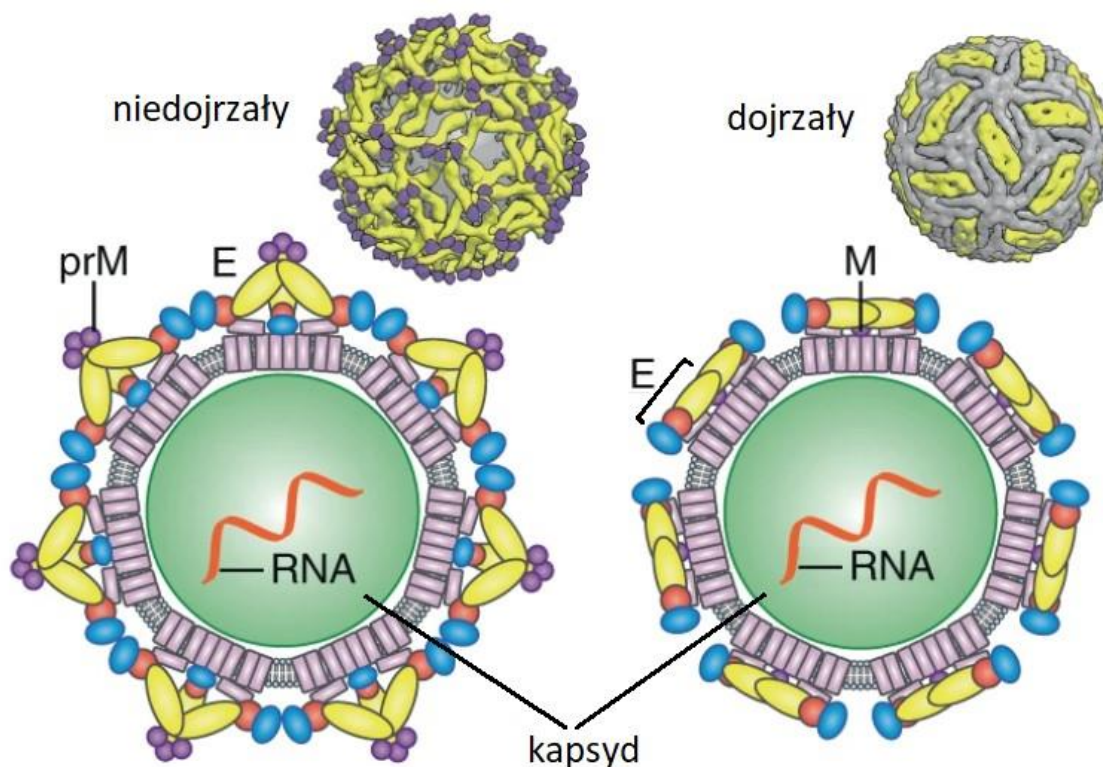
powierzchniowe, oraz nukleokapsydu, który zawiera jednoniciowy RNA o dodatniej polarności. Struktura ta zmienia się w miarę dojrzewania wirusa, co prowadzi do powstania dwóch odmiennych form wirionu: niedojrzałej i dojrzałej cząstki wirusowej¹⁴ (Ryc. 3).

Niedojrzała cząstka wirionu TBEV powstaje we wczesnych etapach cyklu replikacyjnego wirusa, w retikulum endoplazmatycznym komórki gospodarza. W tej formie na powierzchni wirionu obecne są białka prM i E, które tworzą struktury ściśle związane z błoną lipidową. W niedojrzałym wirionie heterodimery białek prM i E zorganizowane są w trimery, które tworzą wyraźnie widoczne wypukłości na powierzchni wirionu. Obecność fragmentu pr sprawia, że pętla fuzyjna białka E jest chroniona przed przedwczesną fuzją z błonami komórkowymi²⁴.

Dojrzała cząstka wirionu TBEV powstaje w późniejszych etapach cyklu replikacyjnego, po przetransportowaniu niedojrzałych wirionów do aparatu Golgiego i wystawieniu ich na działanie kwaśnego środowiska. Pod wpływem proteazy furynowej dochodzi do proteolitycznego odcięcia fragmentu pr od białka prM, co prowadzi do przekształcenia się białka E i powstania dojrzałej cząstki wirusowej. W dojrzałej cząstce wirionu białka E reorganizują się, tworząc homodimery, które układają się na powierzchni wirionu w uporządkowaną strukturę o symetrii ikozaedralnej. Powierzchnia dojrzałego wirionu jest gładka, z równomiernie rozmieszczonymi białkami E, które leżą płasko na osłonce lipidowej^{11,14,25}.

Zmiany te są niezbędne do przygotowania wirionu do interakcji z komórką gospodarza oraz infekcji. W ten sposób dojrzewanie wirusa, polegające na proteolitycznym odcięciu fragmentu pr oraz reorganizacji białek powierzchniowych, jest kluczowym etapem w cyklu replikacyjnym TBEV, determinującym jego zakaźność i patogenność²⁶.

Dojrzały wirion TBEV charakteryzuje się większą stabilnością i infekcyjnością w porównaniu z formą niedojrzałą. Homodimery białka E odgrywają kluczową rolę w procesie infekcji, pośrednicząc w interakcji wirusa z receptorami na powierzchni komórki gospodarza oraz fuzji błon, co umożliwia przeniknięcie wirusowego RNA do wnętrza komórki²⁶.



Rycina 3. Struktura niedojrzałego i dojrzałego wirionu TBEV (na podstawie Pierson i Diamond, 2020).

5.1.5. Transmisja i wywoływane choroby

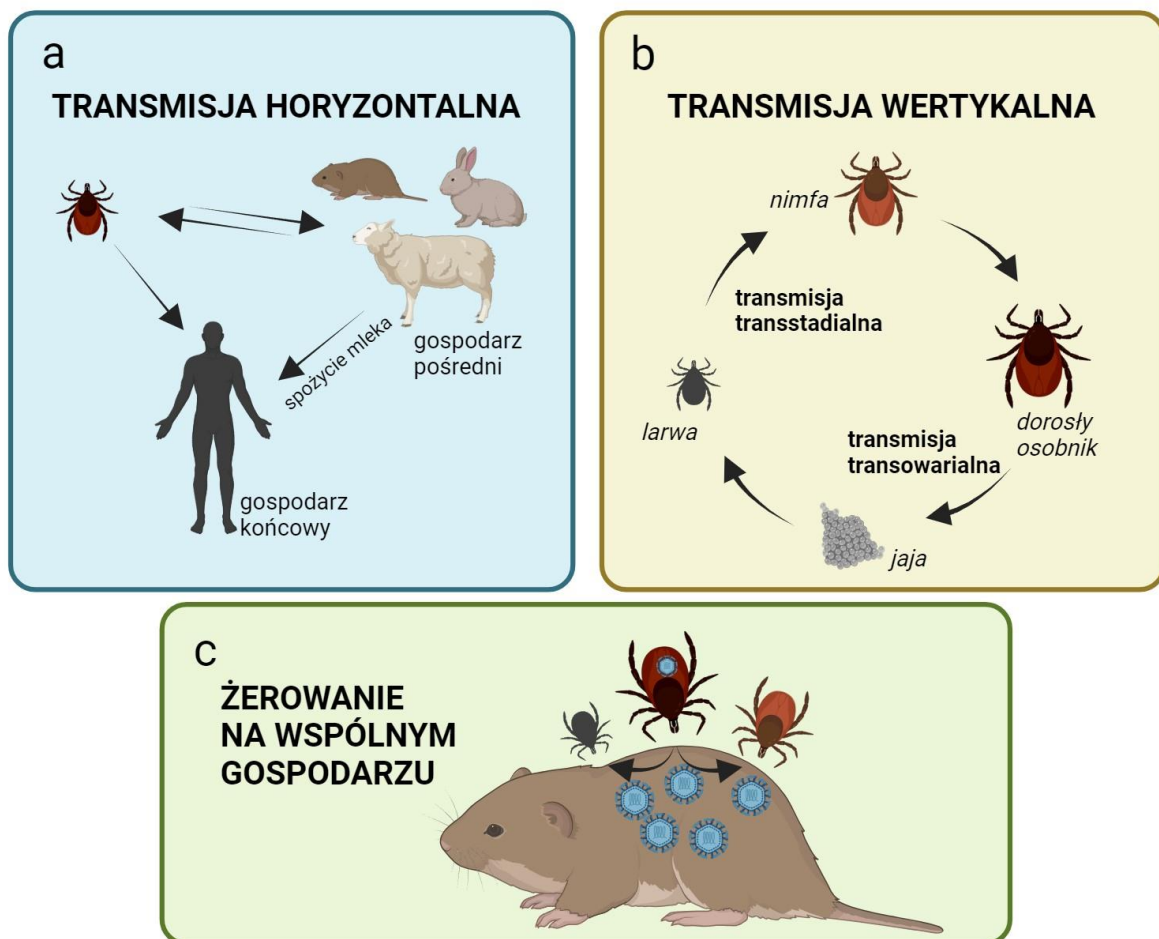
Zakażenie TBEV najczęściej następuje poprzez ukąszenie zakażonego kleszcza, który przenosi wirusa na człowieka (Ryc. 4a). Głównymi gatunkami kleszczy odpowiedzialnymi za transmisję TBEV są *Ixodes ricinus*, powszechnie występujący w Europie oraz *Ixodes persulcatus*, który dominuje na obszarach Azji, w tym w Rosji²⁷. Kleszcze te są kluczowymi wektorami wirusa, a zakażenie może nastąpić już w ciągu kilku minut po ugryzieniu²⁸.

Inną istotną drogą zakażenia jest spożycie niepasteryzowanego mleka lub produktów mlecznych pochodzących od zakażonych zwierząt, takich jak kozy, owce czy krowy (Ryc. 4a). Chociaż ta droga transmisji jest rzadsza, odnotowano przypadki zakażeń po spożyciu mleka, szczególnie w regionach endemicznych dla TBEV^{29,30}.

Gryzonie, takie jak myszy polne i normice, stanowią główny rezerwuar wirusa w środowisku. Kleszcze zarażają się wirusem, gdy ssą krew zakażonych gryzoni, co pozwala na dalsze przenoszenie wirusa na inne zwierzęta i ludzi³¹ (Ryc. 4c). Wirus może również przetrwać w populacjach kleszczy poprzez zjawisko transstadialne, gdzie przenoszony jest

przez wszystkie stadia rozwoju kleszcza (larwa, nimfa, dorosły), oraz transowarialne, gdzie przenoszony jest z matki na potomstwo³² (Ryc. 4b).

Oprócz ludzi i gryzoni, wirus TBEV może zakażać także inne zwierzęta, w tym dzikie ssaki, takie jak sarny, jelenie, dziki oraz różne gatunki ptaków, a także zwierzęta hodowlane, które mogą stać się nosicielami wirusa, wspomagając jego rozprzestrzenianie się w środowisku. Zwierzęta te nie wykazują zazwyczaj objawów choroby, ale mogą stanowić ważny element cyklu przenoszenia wirusa poprzez kleszcze, które się na nich żywią³³⁻³⁶. Zrozumienie różnych dróg przenoszenia TBEV jest niezbędne do wdrożenia skutecznych środków zapobiegania i kontroli w celu zmniejszenia częstości występowania zakażenia TBEV i chorób z nim związanych.



Rycina 4. Ścieżki transmisji TBEV (Created with BioRender.com).

Zakażenie wirusem kleszczowego zapalenia mózgu przebiega w dwóch fazach. Pierwsza faza pojawia się po okresie inkubacji trwającym od 7 do 14 dni. U większości osób zakażenie kończy się na tym etapie, często przebiegając bezobjawowo lub z bardzo łagodnymi

objawami, takimi jak gorączka, ból głowy, zmęczenie, bóle mięśni i stawów które mogą pozostać niezauważone³⁷. Szacuje się, że nawet do 70-98% wszystkich zakażeń TBEV może przebiegać bezobjawowo, co sugeruje, że rzeczywista liczba przypadków jest znacznie wyższa niż oficjalnie raportowana³⁰.

U części pacjentów (około 20-30%), po kilku dniach poprawy, może rozwinąć się druga faza choroby, obejmująca ośrodkowy układ nerwowy. W tej fazie wirus może prowadzić do zapalenia mózgu, rdzenia kręgowego lub opon mózgowo-rdzeniowych. Objawy mogą obejmować wysoką gorączkę, silny ból głowy, sztywność karku, wymioty, zaburzenia świadomości, a w ciężkich przypadkach paraliż^{30,38}. Śmiertelność związana z TBEV wynosi około 1-2% w przypadku subtypu zachodniego, ale może być wyższa w przypadku subtypów dalekowschodniego i syberyjskiego, gdzie śmiertelność może sięgać nawet 20-40% u osób z ciężkimi objawami neurologicznymi³⁹. Wpływ na ryzyko ciężkiego przebiegu choroby i śmierci mają zarówno subtyp wirusa, jak i czynniki osobnicze, takie jak wiek i stan zdrowia pacjenta⁴⁰.

5.1.6. Odpowiedź immunologiczna w infekcji TBEV

Infekcja TBEV stanowi istotne wyzwanie dla układu odpornościowego, angażując odpowiedź immunologiczną na poziomie zarówno humoralnym, jak i komórkowym. Zrozumienie mechanizmów tych odpowiedzi jest kluczowe dla opracowania skutecznych strategii prewencyjnych i terapeutycznych².

Po infekcji wirusem TBEV, układ odpornościowy organizmu mobilizuje różne mechanizmy obronne. Kluczową rolę odgrywa odpowiedź humoralna, w ramach której limfocyty B produkują specyficzne przeciwciała neutralizujące wirusa. Przeciwciała te pełnią fundamentalną rolę w ograniczaniu rozprzestrzeniania się wirusa oraz zapobieganiu jego wnikaniu do ośrodkowego układu nerwowego (OUN). Mechanizmy te obejmują blokowanie przyłączenia wirusa do komórek gospodarza, opsonizację, czyli przyłączanie przeciwciał do powierzchni wirionu, co ułatwia fagocytozę, oraz aktywację dopełniacza, prowadzącą do lizy zainfekowanych komórek^{41,42}.

Pomimo istotności odpowiedzi humoralnej, sama produkcja przeciwciał może nie być wystarczająca do zapewnienia pełnej ochrony przed infekcją OUN. W tym kontekście, rola odpowiedzi komórkowej, w szczególności limfocytów T, jest również kluczowa. Limfocyty T, w tym limfocyty T cytotoksyczne (CD8+) oraz limfocyty T pomocnicze (CD4+), angażują się w rozpoznawanie i eliminację zainfekowanych komórek oraz modulowanie odpowiedzi immunologicznej. Limfocyty T cytotoksyczne rozpoznają i niszczą komórki prezentujące

antygeny wirusa, podczas gdy limfocyty T pomocnicze wspierają odpowiedź humoralną i komórkową poprzez wydzielanie cytokin, takich jak interleukina-2 (IL-2), interleukina-4 (IL-4) i interferon-gamma (IFN- γ), które wzmacniają aktywność innych komórek układu odpornościowego⁴²⁻⁴⁴.

Równocześnie, równowaga między odpowiedzią Th1, a Th2 odgrywa kluczową rolę w kontekście TBEV. Odpowiedź Th1, promująca aktywację makrofagów i limfocytów T cytotoksycznych, jest istotna dla zwalczania wirusów wewnątrzkomórkowych. Z kolei odpowiedź Th2 wspiera odpowiedź humoralną. Należy jednak podkreślić, że nadmierna aktywacja odpowiedzi Th1 może prowadzić do nadmiernej reakcji zapalnej, która może sprzyjać przenikaniu wirusa do OUN i powodować dodatkowe uszkodzenia neurologiczne^{45,46}.

W związku z tym skuteczna szczepionka przeciwko TBEV powinna indukować zrównoważoną odpowiedź immunologiczną, angażując zarówno komponenty humoralne, jak i komórkowe. Kluczowe jest osiągnięcie odpowiedniej równowagi między odpowiedzią Th1, a Th2, aby zapewnić pełną ochronę przed wirusem, jednocześnie minimalizując ryzyko nadmiernej reakcji zapalnej. Takie podejście może znacząco zwiększyć efektywność szczepionek w prewencji zakażeń oraz ich powikłań, takich jak zapalenie mózgu.

5.1.7. Epidemiologia

Na przestrzeni ostatnich dwóch dekad odnotowano znaczący wzrost zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu w Europie, co plasuje tę chorobę jako drugą najpoważniejszą chorobę przenoszoną przez kleszcze. Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) rocznie notuje się 10 000–12 000 przypadków kleszczowego zapalenia mózgu, jednak ze względu na znaczną liczbę bezobjawowych lub łagodnych przypadków, prawdziwa skala problemu może być znacznie niedoszacowana⁴⁷⁻⁴⁹.

TBEV występuje przede wszystkim w regionach Europy i Azji o umiarkowanym klimacie (Ryc. 5). W Europie największa liczba przypadków notowana jest w krajach Europy Środkowej, Wschodniej i Północnej, takich jak Austria, Czechy, Słowacja, Niemcy, Polska, kraje bałtyckie oraz Skandynawia, gdzie wirus jest endemiczny⁵⁰⁻⁵². W Rosji, która stanowi jedno z głównych ognisk zakażeń, wirus rozprzestrzeni się od zachodnich regionów aż po Syberię. W Azji zasięg TBEV obejmuje m.in. Chiny i Japonię, gdzie dominują inne subtypy wirusa, takie jak syberyjski i dalekowschodni⁵³⁻⁵⁵. Historycznie, zasięg geograficzny TBEV był ograniczony do Azji Wschodniej i Europy Wschodniej, jednak obecnie szybko się rozszerza; wirus wykrywany jest w niemal całej Europie, a niedawno zgłoszono także przypadki w Afryce Północnej⁵⁶⁻⁵⁹.



Rycina 5. Przybliżony rozkład zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu na dzień 20 stycznia 2024 r. według WHO <https://www.cdc.gov/tick-borne-encephalitis/data-maps/index.html>.

Infekcje TBEV charakteryzują się sezonowym występowaniem, zależnym od aktywności głównego wektora, jakim są kleszcze. Obszary o najwyższym ryzyku zakażenia to te, gdzie populacje kleszczy, głównie *Ixodes ricinus* i *Ixodes persulcatus*, są najbardziej aktywne, szczególnie w lasach, na łąkach oraz na terenach wiejskich⁶⁰. W ostatnich latach zmiany klimatyczne, takie jak globalne ocieplenie, prowadzą do wzrostu populacji rezerwuarów i wektorów TBEV. Łagodne zimy oraz wcześniejsze nadejście wiosny mogą zwiększać populacje żywicieli i przyspieszać rozwój kleszczy. W związku z tym w wyniku zmian klimatycznych obserwuje się również wzrost częstości zachorowań na KZM oraz rozszerzanie się zasięgu występowania choroby na wyższe szerokości geograficzne oraz nowe obszary górskie, gdzie wcześniej przypadki TBEV były rzadkością lub w ogóle nie występowały^{9,61,62}.

5.1.8. Metody prewencji i leczenia

Zapobieganie zakażeniom TBEV opiera się głównie na szczepieniach oraz unikaniu ukąszeń kleszczy, które są głównymi wektorami wirusa. Szczepienia są najskuteczniejszym sposobem zapobiegania chorobie. W Europie dostępne są dwie szczepionki, FSME-Immun® firmy Pfizer oraz Encepur® firmy Novartis, obie oparte na wirusach subtypu europejskiego

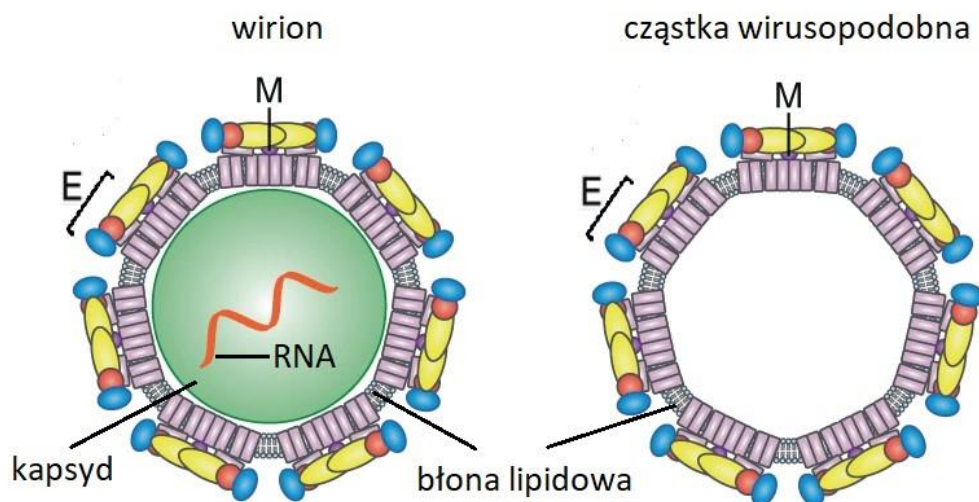
inaktywowanych formaldehydem. Szczepienia wymagają podania trzech dawek w celu osiągnięcia pełnej ochrony, a dla utrzymania odporności zalecane są dawki przypominające co 3–5 lat, zwłaszcza u osób starszych. Mimo wysokiej skuteczności, szczepienia mają swoje ograniczenia, w tym ryzyko niepełnej ochrony nawet po podaniu pełnej serii^{2,63}. W Polsce szczepienia przeciwko TBEV nie należą do szczepień obowiązkowych, są jedynie rekomendowane dla osób z grup o podwyższonym ryzyku, do których należą osoby pracujące na terenach zielonych oraz leśnych, osoby często przebywające w lasach w celach turystycznych oraz osoby podróżujące na tereny endemiczne TBEV⁶⁴.

Obok szczepień, kluczowe znaczenie mają środki zapobiegawcze, takie jak noszenie odpowiedniej odzieży, stosowanie repelentów oraz unikanie terenów, gdzie ryzyko kontaktu z kleszczami jest największe, zwłaszcza w okresie ich wzmożonej aktywności⁶⁵.

W leczeniu zakażeń TBEV brakuje obecnie skutecznych leków przeciwwirusowych. Terapia ogranicza się jedynie do leczenia objawowego, mającego na celu złagodzenie objawów, takich jak ból, gorączka i objawy neurologiczne⁸. Intensywne badania koncentrują się na poszukiwaniu nowych terapii oraz udoskonaleniu istniejących metod zapobiegania, w tym rozwijaniu rekombinowanych szczepionek, które mogłyby oferować bardziej długotrwałą ochronę oraz byłyby bezpieczniejsze i bardziej dostępne zarówno dla ludzi, jak i zwierząt².

5.2. Cząstki wirusopodobne (VLPs) jako antygeny szczepionkowe

VLPs stanowią jedno z najnowocześniejszych podejść w dziedzinie immunoprofilaktyki, oferując obiecujące możliwości w tworzeniu skutecznych i bezpiecznych szczepionek. VLPs to struktury zbudowane z białek wirusowych, które potrafią samoczynnie się składać w cząstki o strukturze przypominającej natywne wiriony. Kluczowym aspektem dotyczącym VLPs jest fakt, że nie zawierają one materiału genetycznego, co sprawia, że są bezpieczne i nie mogą replikować się w organizmie, jednocześnie zachowując zdolność do indukowania silnej odpowiedzi immunologicznej (Ryc. 6). W procesie produkcji szczepionek opartych na VLPs nie ma potrzeby pracy z żywym wirusem, co znacząco zmniejsza ryzyko dla środowiska oraz personelu zaangażowanego w produkcję. Dzięki temu VLPs stanowią bezpieczną platformę zarówno dla opracowywania szczepionek, jak i badań biomedycznych.



Rycina 6. Porównanie wirionu i cząstki wirusopodobnej na przykładzie TBEV (na podstawie Pierson i Diamond, 2020).

Wykorzystanie VLPs jako antygenów szczepionkowych bazuje na ich zdolności do naśladowania naturalnych wirusów, co umożliwia skuteczną prezentację epitopów wirusowych układowi immunologicznemu. Dzięki swojej trójwymiarowej strukturze, VLPs są wysoce immunogenne, mogą efektywnie aktywować zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową. Antygeny prezentowane w formie VLPs są lepiej rozpoznawane przez komórki dendrytyczne, co prowadzi do silniejszej aktywacji limfocytów T i B, a tym samym do produkcji przeciwciał i tworzenia pamięci immunologicznej⁶⁶. VLPs wykazują zdolność silnej aktywacji komórek dendrytycznych (DCs, ang. *dendritic cells*), które są najbardziej efektywnymi komórkami prezentującymi antygeny (APCs, ang. *antigen-presenting cells*). Aktywacja DCs jest kluczowa dla inicjacji odpowiedzi immunologicznej opartej na limfocytach B i T. Proces ten rozpoczyna się od wiązania VLPs z receptorami rozpoznającymi wzorce (PRRs, ang. *pattern recognition receptors*) na powierzchni DCs, a następnie ich internalizacji. Interakcje między białkami tworzącymi VLPs, a PRRs, w szczególności te związane z glikozylacją, stymulują dojrzewanie DCs i prowadzą do rozwoju silnej odpowiedzi adaptacyjnej⁶⁶. Ponadto, VLPs charakteryzują się rozmiarami wahającymi się od 20 do 200 nm, co jest optymalne do swobodnego drenażu do węzłów chłonnych oraz ułatwia ich wychwytywanie przez APCs⁶⁶.

VLPs mogą być wykorzystywane do produkcji szczepionek przeciwko różnym patogenom wirusowym, a także do opracowywania szczepionek przeciwnowotworowych. Przykładem sukcesu tej technologii są szczepionki oparte na VLPs przeciwko wirusowi

brodawczaka ludzkiego (HPV, ang. *human papilloma virus*) – Gardasil® i Cervarix®, oraz przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (HBV, ang. *hepatitis B virus*) – Engerix-B® i Recombivax HB®, które wykazują wysoką skuteczność oraz profil bezpieczeństwa. Wysoka elastyczność technologii VLPs pozwala również na tworzenie szczepionek multiwalentnych, zdolnych do ochrony przed kilkoma szczepami danego wirusa lub różnymi patogenami, a także szczepionek chimerycznych, mogących prezentować np. antygeny nowotworowe⁶⁶.

W kontekście rosnącego zapotrzebowania na nowe i bardziej skuteczne szczepionki, VLPs oferują unikalne korzyści, które mogą znacząco przyczynić się do poprawy globalnego zdrowia publicznego. Wykorzystanie VLPs jako antygenów szczepionkowych nie tylko zwiększa potencjał ochrony przed wirusami, ale również otwiera nowe perspektywy w walce z chorobami nowotworowymi i innymi patogenami, co czyni je kluczowym narzędziem w nowoczesnej immunoprofilaktyce.

5.2.1. Strategie produkcji VLPs

Produkcja VLPs jest kluczowym elementem w opracowywaniu nowoczesnych szczepionek, a różne systemy ekspresyjne oferują różne zalety i wyzwania. Wśród najczęściej stosowanych systemów znajdują się bakterie, drożdże, komórki owadzie i komórki ssące, z których każdy ma swoje unikalne właściwości i zastosowania.

Systemy oparte na *Escherichia coli* są cenione w produkcji VLPs za ich niskie koszty, szybki wzrost i łatwość manipulacji. Mimo tych zalet, bakterie mają ograniczenia, takie jak brak modyfikacji posttranslacyjnych i problem z rozpuszczalnością białek. Dodatkowo, mogą nie zapewniać prawidłowych wiązań disiarczkowych, a także wprowadzać endotoksyny, co może wpływać na jakość końcowego produktu⁶⁶.

Systemy ekspresyjne oparte na drożdżach, takie jak *Pichia pastoris* i *Saccharomyces cerevisiae*, są szeroko wykorzystywane do produkcji VLPs dzięki ich zdolności do wprowadzania modyfikacji posttranslacyjnych, takich jak glikozylacja. W porównaniu do bakterii, drożdże oferują lepszą jakość białek, choć proces produkcji jest bardziej złożony. Mimo to, wydajność produkcji VLPs w drożdżach może być niższa niż w systemach bakteryjnych⁶⁶. Drożdże mogą jednak produkować funkcjonalne VLPs, wśród których znajdują się np. zatwierdzone szczepionki oparte o VLPs Gardasil® i Cervarix®, które chronią przed HPV⁶⁶.

Systemy ekspresyjne oparte na komórkach owadzych i bakulowirusach są cenione za zdolność do efektywnej produkcji skomplikowanych białek i VLPs. Proces produkcji polega na hodowli komórek owadzych, które następnie są infekowane rekombinowanymi

bakulowirusami, co umożliwia wysoką wydajność ekspresji białek. System ten jest wszechstronny i efektywny, zdolny do wytwarzania dużych ilości białek o złożonych modyfikacjach posttranslacyjnych^{67,68}. Przykładem jest szczepionka Cervarix® przeciwko HPV, która wykorzystuje VLPs produkowane w komórkach owadzych⁶⁶. Jednakże, ograniczenia tego systemu obejmują możliwość zanieczyszczenia białek przez bakulowirusy, trudności w skalowaniu produkcji oraz prostsze modyfikacje *N*-glikozylacji w porównaniu do komórek ssaczy^{67,68}.

Komórki ssacze, takie jak linie komórkowe CHO, HEK293, czy BHK21, odgrywają kluczową rolę w produkcji białek terapeutycznych, w tym VLPs. Dzięki zdolności do prawidłowego fałdowania, składania i modyfikacji posttranslacyjnych białek, komórki ssacze są idealnym systemem do wytwarzania skomplikowanych białek wirusowych. Mimo ich zaawansowanych możliwości, systemy oparte na komórkach ssaczy są kosztowne, wymagają dużych instalacji produkcyjnych, charakteryzują się stosunkowo powolnym wzrostem i często niską wydajnością produkcji, co może ograniczać ich zastosowanie w dużej skali^{69,70}.

5.2.2. System ekspresji *Leishmania tarentolae*

W poszukiwaniach optymalnych systemów ekspresyjnych do produkcji rekombinowanych białek, w tym białek wirusowych i VLPs, coraz większe zainteresowanie budzi system oparty na pierwotniaku *Leishmania tarentolae*. Tradycyjne systemy ekspresyjne, takie jak *Escherichia coli*, drożdże, owady czy komórki ssaków, jak pokazano powyżej, posiadają zarówno swoje zalety, jak i ograniczenia. *L. tarentolae*, jednokomórkowy organizm eukariotyczny należący do rodziny kinetoplastydów, staje się obiecującą alternatywą, m.in. w produkcji białek wirusowych⁷¹.

L. tarentolae oferuje szereg korzyści, które zwiększają atrakcyjność tego systemu ekspresyjnego. Przede wszystkim, ten organizm charakteryzuje się zdolnością do przeprowadzania modyfikacji posttranslacyjnych, takich jak glikozylacja, która jest kluczowa dla funkcjonalności wielu białek wirusowych. Co więcej, *L. tarentolae* posiada prosty system genetyczny, co umożliwia łatwą manipulację genami i wprowadzenie odpowiednich konstrukcji ekspresyjnych. Ponadto, kultury *L. tarentolae* mogą być prowadzone na dużą skalę w warunkach tanich i prostych do utrzymania, co jest istotnym czynnikiem w produkcji białek na potrzeby badań i przemysłu⁷¹⁻⁷³.

W kontekście ekspresji białek wirusowych, system *L. tarentolae* pozwala na produkcję białek o wysokiej złożoności, w tym białek strukturalnych wirusów, które mogą być trudne

do wyprodukowania w innych systemach. Dzięki zdolności do zachowania natywnej struktury białek, *L. tarentolae* staje się narzędziem o rosnącym znaczeniu w badaniach nad wirusami oraz w produkcji VLPs, które są kluczowe dla rozwoju nowoczesnych szczepionek i terapii⁷⁴⁻⁷⁶.

Wykorzystanie *L. tarentolae* w ekspresji białek wirusowych oferuje nowe możliwości w produkcji biofarmaceutyków, które mogą przewyższać tradycyjne metody pod względem wydajności, kosztów oraz jakości produktów^{77,78}. Dalsze badania nad optymalizacją tego systemu mogą prowadzić do jego szerokiego zastosowania, zarówno w nauce podstawowej, jak i w przemysłowej produkcji białek rekombinowanych.

System ekspresyjny oraz jego zastosowania do produkcji białek wirusowych, w tym VLPs, zostały dokładniej opisane w publikacji przeglądowej, która stanowi część niniejszej rozprawy doktorskiej i została w całości przedstawiona w punkcie 7.1.

5.2.3. Formulacja szczepionek opartych o VLPs

Formulacja szczepionek opartych na VLPs stanowi kluczowy aspekt w opracowywaniu skutecznych i bezpiecznych szczepionek. VLPs, ze względu na swoją strukturę, mogą być doskonałymi antygenami, jednakże sama ich obecność nie zawsze zapewnia wystarczającą odpowiedź immunologiczną. Dlatego istotnym elementem formulacji szczepionek jest dodanie adiuwantów – substancji, które wspomagają i wzmacniają odpowiedź immunologiczną organizmu na antygen zawarty w szczepionce. Adiuwanty mogą działać poprzez różne mechanizmy, takie jak zwiększenie prezentacji antygenów, aktywacja komórek dendrytycznych czy stymulacja odpowiedzi komórkowej. Istnieje wiele typów adiuwantów, każdy ukierunkowany na wywołanie określonego rodzaju odpowiedzi immunologicznej, jak odpowiedź komórkowa (Th1) czy humoralna (Th2). Dobór odpowiedniego adiuwantu do konkretnego antygeny jest niezbędny, aby osiągnąć optymalną odpowiedź ochronną i skuteczność szczepionki⁷⁹.

W opisanych w niniejszej rozprawie badaniach pierwszym wykorzystanym adiuwantem był AddaVax™ (InvivoGen), będący nanoemulsją na bazie skwalenu i stanowiący analog licencjonowanego adiuwantu MF59® (Novartis). AddaVax™ i MF59® są emulsjami olejowymi w wodzie, które działają na kilka sposobów: zwiększają lokalne zapalenie w miejscu podania szczepionki, co poprawia migrację komórek dendrytycznych do węzłów chłonnych oraz zwiększają prezentację antygenów. Dzięki temu aktywacja limfocytów T i B jest bardziej efektywna, co z kolei prowadzi do silniejszej odpowiedzi immunologicznej. MF59® jest wykorzystywany w szczepionkach przeciwko grypie sezonowej, takich jak Flud®^{80,81}, co potwierdza jego skuteczność i bezpieczeństwo^{80,81}.

Dodatkowo, w kolejnych etapach badań opisanych w niniejszej rozprawie wykorzystane zostały dwa inne adiuwanty/kombinacje adiuwantów: AddaS03™ (InvivoGen), analog AS03® (GlaxoSmithKline), oraz połączenie MPLA (*Monophosphoryl Lipid A*) (InvivoGen) z Alhydrogel® (InvivoGen). AddaS03™ jest nanoemulsją skwalenu wzbogaconą o DL- α - tokoferol i polysorbat 80. DL- α - tokoferol, forma witaminy E, wspomaga zarówno odpowiedź komórkową, jak i humoralną, a polysorbat 80 zwiększa stabilność emulsji. AddaS03® działa poprzez stymulację odpowiedzi immunologicznych, zwiększając produkcję cytokin i chemokin oraz wspomagając migrację kluczowych komórek odpornościowych do węzłów chłonnych⁸²⁻⁸⁵. AS03® jest stosowany w szczepionkach przeciwko pandemicznemu szczepowi grypy H5N1 oraz w badaniach nad szczepionkami przeciwko malarii^{86,87}.

Alhydrogel® to żelowa zawiesina wodorotlenku glinu, która działa jako adiuwant poprzez zwiększenie prezentacji antygenów przez APCs, a tym samym silniejsze indukowanie odpowiedzi Th2, co sprzyja produkcji przeciwciał. MPLA, pozyskiwana z lipopolisacharydów bakterii *Salmonella minnesota*, aktywuje receptor Toll-4 (TLR4), co prowadzi do silnej odpowiedzi Th1. MPLA stymuluje szlak NF- κ B, prowadząc do produkcji prozapalnych cytokin, co wspomaga odpowiedź komórkową^{88,89}. Połączenie MPLA z Alhydrogel® jest analogiczne do licencjonowanego adiuwantu AS04® (GlaxoSmithKline) stosowanego w szczepionkach takich jak Fendrix® (przeciwko HBV) i Cervarix®^{90,91}. Promuje zarówno odpowiedź Th1, jak i Th2, co zwiększa ogólną skuteczność szczepionki^{92,93}.

Dodatkowo, dla skuteczności szczepionki kluczowe znaczenia ma jej droga podania. W zależności od rodzaju szczepionki, może to obejmować podanie domięśniowe, podskórne, doustne czy donosowe, co wpływa na sposób aktywacji układu odpornościowego i rozwój ochronnej odpowiedzi. Na przykład, szczepionki podawane drogą domięśniową mogą lepiej stymulować odpowiedź humoralną, podczas gdy szczepionki doustne mogą wywołać odpowiedź śluzówkową. Ostateczne rezultaty ochrony zależą od odpowiedniego połączenia VLPs, adiuwantów i drogi podania, co jest istotnym aspektem w projektowaniu skutecznych strategii szczepień⁹⁴.

6. Cel badań

Infekcje TBEV są jedną z głównych przyczyn zachorowań na zapalenie mózgu oraz zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych. Główna droga zakażenia u ludzi i zwierząt to ukąszenie przez zakażonego kleszcza. Ze względu na zmiany klimatyczne, które przyczyniają się do wydłużenia okresu wegetacji kleszczy, wzrasta prawdopodobieństwo zakażenia tą drogą. Inną metodą zakażenia u ludzi jest spożycie nabiału produkowanego z niepasteryzowanego mleka pochodzącego od zakażonych zwierząt. Coraz popularniejsze spożywanie lokalnych produktów, które mogą pochodzić od zakażonych zwierząt, często prowadzi do występowania ognisk infekcji obejmujących co najmniej kilka przypadków. Dostępne szczepionki przeciwko TBEV oparte są na inaktywowanym wirusie i wymagają podania kilku dawek. Ponadto, ze względu na wysoki koszt, szczepienia przeciwko TBEV nie są obowiązkowe, a jedynie rekomendowane dla osób z grup ryzyka. Z tego względu nie są też stosowane jako szczepionka weterynaryjna. Opracowanie alternatywnej szczepionki, która mogłaby być stosowana jako tańsza szczepionka dla ludzi lub szczepionka weterynaryjna, mogłoby zwiększyć powszechność szczepień przeciwko TBEV, a w konsekwencji w znacznym stopniu obniżyć zachorowalność na kleszczowe zapalenie mózgu.

W związku z tym celem niniejszej rozprawy było opracowanie potencjalnej szczepionki przeciwko TBEV, opartej na rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych, przy wykorzystaniu innowacyjnego systemu ekspresyjnego opartego na pierwotniaku *L. tarentolae*.

Powyższy cel został podzielony na następujące zadania badawcze:

- Zaprojektowanie konstruktów niosących geny wirusa TBEV pozwalającego na wydajną produkcję VLPs.
- Wyprodukowanie VLPs w systemie ekspresyjnym *L. tarentolae* oraz oczyszczenie uzyskanych cząstek.
- Charakterystyka funkcjonalna uzyskanych VLPs i ocena ich antygenowości.
- Charakterystyka odpowiedzi immunologicznej po podaniu VLPs oraz skuteczności w zapewnianiu ochrony przed infekcją, w celu oceny potencjału w zastosowaniu jako szczepionka profilaktyczna w mysim modelu zwierzęcym.
- Wybór adiuwantu oraz drogi podania preparatu szczepionkowego, które pozwolą na zapewnienie jak najwyższego poziomu ochrony.

7. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy

7.1. (P1) *Leishmania tarentolae* as a platform for the production of vaccines against viral pathogens. Zimna, M., Krol, E. (2024). *NPJ Vaccines*. 9(1):212.

<https://doi:10.1038/s41541-024-01005-9>

<https://doi.org/10.1038/s41541-024-01005-9>

Leishmania tarentolae as a platform for the production of vaccines against viral pathogens

Check for updates

Marta Zimna & Ewelina Krol

Infectious diseases remain a persistent public health problem and a leading cause of morbidity and mortality in both humans and animals. The most effective method of combating viral infections is the widespread use of prophylactic vaccinations, which are administered to both people at risk of disease and animals that may serve as significant sources of infection. Therefore, it is crucial to develop technologies for the production of vaccines that are highly effective, easy to transport and store, and cost-effective. The protein expression system based on the protozoan *Leishmania tarentolae* offers several advantages, validated by numerous studies, making it a good platform for producing vaccine antigens. This review provides a comprehensive overview into the potential applications of *L. tarentolae* for the safe production of effective viral antigens.

Infectious diseases are a serious and growing threat to public health. Re-emerging and new pathogens often appear due to the transmission of animal viruses to humans and can potentially pose significant public health risks. Over the last 40 years, at least 30 new pathogens that threaten human health have been identified, most of which were zoonotic^{1,2}.

The emergence of new pathogens frequently occurs in countries with low socioeconomic status, but it is also crucial to consider how easily these pathogens can spread globally¹. The recent COVID-19 pandemic demonstrated this widespread transmission, with health, social and economic effects that will be felt for a long time. The pandemic also underscored the importance of responding to emerging threats and ensuring universal access to vaccines^{3–5}. Outbreaks of other infectious diseases, such as the Zika and Ebola virus epidemics, have similarly highlighted the need to respond swiftly to new emerging pathogens.

In recent years, climate change has contributed to an increase in epidemiological risk. The extended activity period of insect vectors (e.g., mosquitos and ticks) and the expansion of their habitats may lead to a rise in diseases caused by arboviruses, such as chikungunya virus, dengue virus, tick-borne encephalitis virus (TBEV) and West Nile virus^{6,7}. The benefits of widespread preventive vaccination are undeniable. Vaccination has led to the eradication of smallpox in humans and rinderpest in cattle. Additionally, thanks to vaccination, poliovirus is close to being eradicated, and many other infectious diseases have been brought under control. The widespread use of vaccines offers enormous health and socioeconomic benefits^{1,8,9}.

Historically, antiviral vaccines were often based on inactivated or attenuated viruses, but these approaches carried risks such as potential reversion to virulence or incomplete inactivation. While

these drawbacks are no longer major concerns, they were among the factors driving the development of new vaccine strategies. Consequently, contemporary research has focused on developing recombinant vaccines based on safer and more precisely engineered viral components, thereby minimizing the risk of adverse outcomes and increasing vaccine efficacy. Vaccine development remains time-consuming and costly; therefore, alternative expression systems that can offer cost-effective and faster production processes, thereby increasing accessibility and frequency of use, deserve special attention. One such achievement is an expression system based on *Leishmania tarentolae*, which has been gaining popularity in recent years^{10,11}.

L. tarentolae as an unconventional expression system

The main expression systems used to produce recombinant vaccine antigens are based on mammalian and insect cells, yeast, or bacteria. A comparison of these systems regarding production costs, growth kinetics and yields are present in Table 1. Since no single expression system is universally applicable, the development of new systems facilitates the efficient production of antigens.

L. tarentolae is a single-cell, flagellated protozoan isolated from the lizards *Tarentolae annularis* and *Tarentolae mauritanica* in 1921 in Sudan and in 1934 in Algeria, respectively^{12,13}. This protozoan was first used as an expression system by Breitling et al. in 2002 to obtain EGFP and human erythropoietin (hEPO), resulting in the efficient production of both proteins, including posttranslational modifications. To ensure that hEPO was secreted from cells and properly glycosylated, its signal peptide was replaced

Table 1 | Comparison of the main characteristics of different expression systems

Expression system	Growth rate	Costs	Protein yield	Scale-up capacity	Contamination risk
Bacteria	High (division time 20–30 min)	Low	High	High	Endotoxins
Yeast	Moderate (division time 2–4 h)	Low	Moderate to high	High	Low
Insect cells/baculovirus	Low (division time 18–24 h)	High	Moderate to high	Moderate	Baculovirus
Mammalian cells	Low (division time 20–24 h)	High	Moderate to high	Moderate	Viruses
<i>L. tarentolae</i>	Moderate (division time 6–8 h)	Low to moderate	Moderate	High	Low

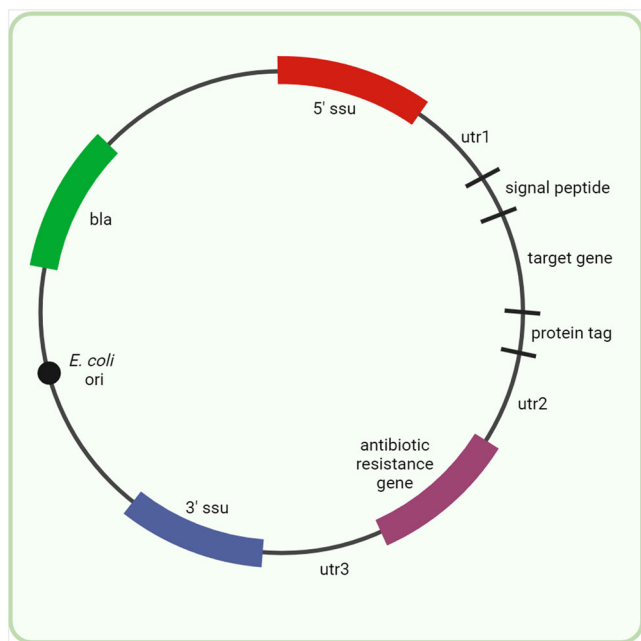


Fig. 1 | Map of a standard expression vector used for protein production in *L. tarentolae*. Standard vector comprises of untranslated regions (utr1, utr2, utr3), 5' and 3' small subunit of *L. tarentolae* rRNA gene (3' ssu, 5' ssu) and antibiotic resistance gene. The gene of interest may be preceded by a sequence for the signal peptide (mainly a signal peptide from the secreted acid phosphatase SAP1 of *Leishmania mexicana*) for secreted proteins, followed by the protein tag sequence if needed. Origin of replication from *E. coli* (*E. coli* ori) and β -lactamase (*bla*) are required for plasmid propagation in bacteria. Created with BioRender.com.

with a signal peptide from secreted acid phosphatase (SAP1) of *Leishmania mexicana*¹⁴. SAP1 has been well characterized, and its signal peptide is often used for the production of heterologous proteins in *L. tarentolae* (Fig. 1)^{15,16}.

L. tarentolae is a biosafety level 1 organism; therefore, it does not require special containment, contributing to its low production costs. This protozoan is relatively easy to cultivate in liquid, aerated culture in a simple incubator at 26 °C. Unlike mammalian cells, it does not require incubators with specific CO₂ levels. It is also suitable for scale-up and cultivation in bioreactors (Fig. 2), with a high growth rate of 6–8 h for generation and the ability to reach high cell densities (>10⁸ cells/mL). Additionally, as a lizard parasite that is nonpathogenic to mammals, there is no risk of preexisting immunity, which is often a problem with some systems. These factors make *L. tarentolae* a good candidate for producing human vaccines or veterinary vaccines for domestic and farm animals¹⁷.

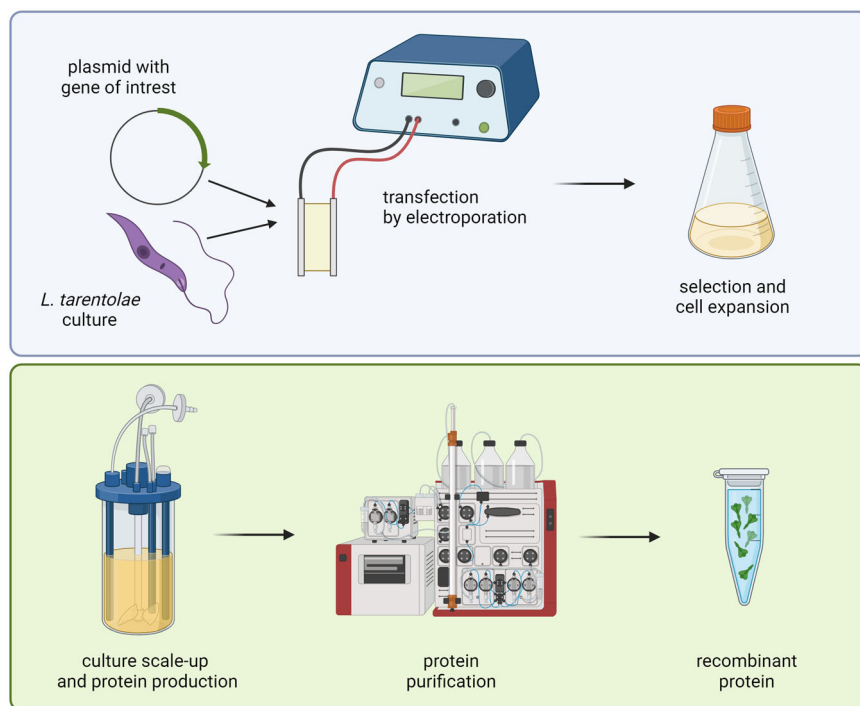
Currently, a commercially available LEXSY system can be used for producing recombinant proteins by *L. tarentolae*. This system, developed by the German company Jena Bioscience (“LEXSY - Eukaryotic protein expression in *Leishmania tarentolae*.” <https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression>) (Fig. 2), allows for the production of proteins, both intracellularly and secreted into the medium, which facilitates easier purification. *L. tarentolae* secretes only a small amount of endogenous proteins, and the cultivation medium does not contain many proteins; therefore, the

recombinant protein constitutes the majority of the proteins in the medium^{18,19}. In recent years, the protein expression system in *L. tarentolae* has been continuously improved, increasing its utility in this field^{20,21}. For viral antigens produced in *L. tarentolae*, the production efficiency varied from 0.5 to 20 mg/L of culture depending on the antigen (Table 2). The low costs associated with the *L. tarentolae* system are mainly due to minimal cultivation requirements and inexpensive culture media. *L. tarentolae* can be cultivated in brain-heart infusion-based (BHI) or yeast-soybean-based media supplemented with hemin. Although *L. tarentolae* typically requires animal components, these can be replaced by recombinant nutrients^{10,18,22,23}. For the production of viral antigens discussed in this publication, BHI supplemented with porcine hemin was the most commonly used medium (Table 2). Since both components are of animal origin, their use in vaccine production may incur additional costs due to the need for stringent testing. Other media used for producing viral antigens were SDM-79 and M199. These media based on a mixture of inorganic salts, amino acids, vitamins and other additives, reduce the need for animal components, but were sometimes supplemented with hemin or inactivated bovine serum (FBS). Notably, one study comparing BHI and M199 media reported a higher yield of antigen production with the synthetic M199 medium²⁴. This suggests that the production of other antigens could also be optimized to minimize or eliminate the use of animal components. Additionally, yeast extract medium has been found suitable for *Leishmania* culture, and resulted in higher cell densities than for BHI medium²². Since avoiding animal components is required whenever possible in vaccine production, especially for human vaccines, this aspect of vaccine antigens production in *L. tarentolae* still requires improvement. The challenge of eliminating animal-derived elements from the medium remains a significant hurdle that must be overcome to ensure the safety and efficacy of the produced vaccines before the *L. tarentolae* system can be applied to clinical-grade material production.

Stable cells lines of *L. tarentolae* can be efficiently obtained with electroporation-mediated transfection with various expression vectors. A schematic representation of a standard vector used for protein expression in *L. tarentolae* is shown in Fig. 1. Depending on the system, heterologous protein production can be constitutive or inducible^{18,25}. Due to these conditions and rapid growth, protein production costs in *Leishmania tarentolae* are generally lower than in mammalian cells, though not necessarily cheaper than in yeast or bacteria (Table 1).

L. tarentolae can be used for producing proteins that require post-translational modifications. This organism can produce glycoproteins with glycosylation patterns highly similar to those in mammalian cells, likely due to its parasitic lifestyle (Fig. 3). This is a notable advantage of the *L. tarentolae* system, distinguishing it from other systems such as yeast or bacteria. The N-glycosylation profile of *L. tarentolae* was first investigated in recombinant hEPO, which contained biantennary N-glycans similar to those found in higher eukaryotes but lacking sialylation^{14,19}. Since glycosylation can influence protein immunogenicity, it is a significant feature of *L. tarentolae* that makes it a promising potential expression system for the production of vaccines against viral targets^{26,27}. O-glycosylation, present in viral proteins, has also been reported in *Leishmania*^{28,29}. Disulfide bridges, important for protein functionality, have been shown to form in *L. tarentolae*. Functional proteins requiring this modification, such as human laminin-332 or the hepatitis C virus (HCV) E1E2 glycoprotein complex,

Fig. 2 | The production of recombinant proteins in *L. tarentolae*. Stages required to produce recombinant proteins in *L. tarentolae* expression system has been shown in the figure above. Created with BioRender.com.



have been successfully obtained using this system^{30,31}. For proteins lacking a signal peptide, cleavage of N-terminal methionine might also be important. The presence of methionine aminopeptidase in *Leishmania* cells allows for similar N-terminal methionine cleavage as in mammalian cells³². The *Leishmania tarentolae* expression system is distinguished by its ease of cultivation, rapid growth rate, extensive genetic manipulation tools, and ability to express proteins from higher eukaryotes, making it highly advantageous for a wide range of biotechnological research and applications. The numerous benefits of *L. tarentolae* in vaccine production have been explored in several studies, which will be discussed in this publication (Table 2). Several different strategies based on this protozoan system have been utilized (Fig. 4).

Subunit vaccine candidates against viral pathogens produced in *L. tarentolae*

There are various strategies used in vaccine development. To increase global vaccination coverage, factors such as vaccine cost and storage conditions must be considered. For instance, vaccines based on recombinant proteins or virus-like particles (VLPs) may be more accessible compared to mRNA-based vaccines, which require transport and storage at -80°C . Generally, vaccines based on recombinant proteins or VLPs are stable in 4°C for months or even years, and can tolerate higher temperatures for shorter periods^{33,34}. Another crucial aspect of vaccine development is the production of veterinary vaccines. These vaccines are essential for protecting both animal and human health by preventing the spread of zoonotic diseases that can be transmitted between animals and humans. Recombinant subunit protein vaccines are particularly promising in veterinary medicine due to their ability to provide targeted protection against specific pathogens, reduce the risk of zoonotic disease transmission, and enhance overall animal and public health.

The first viral protein produced in *L. tarentolae* was influenza hemagglutinin (HA), the major antigenic determinant of the influenza virus. HA is a membrane protein containing disulfide bridges and N-glycosylation sites³⁵. Despite available seasonal vaccines, influenza pandemics continue to emerge. Each year, annual epidemics result in approximately 3 to 5 million cases of severe illness and cause around 290,000 to 650,000 deaths related to respiratory issues (“World Health Organization. Influenza

(Seasonal).” [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))). Complications from influenza, such as bronchitis, pneumonia, cardiovascular issues, acute respiratory failure, and secondary bacterial infections, can be severe and even fatal, especially in immunocompromised individuals, the elderly, and children³⁶. Studies have shown that vaccination is the most effective way to prevent influenza outbreaks³⁷. However, widespread vaccine distribution in a short time is essential. Challenges with influenza vaccination include the virus’s variability, which necessitates the production of vaccines for different subtypes each year. Current reliance on egg-based production could be supplemented by recombinant antigens, potentially increasing the availability of influenza vaccines^{38,39}.

Pion et al. successfully produced properly glycosylated HA using the *L. tarentolae* system. The glycosylation of HA is crucial for proper folding and affects immunogenicity. However, it is important that the protein is not hyperglycosylated, which is a common issue in the yeast system, as oligosaccharides in inappropriate positions can mask antigenic sites. The HA protein produced in *L. tarentolae* also induced an immune response in mice, although the use of an adjuvant was necessary³⁵.

Hepatitis C virus (HCV) is another pathogen for which the protozoal expression system was used to produce a vaccine antigen. HCV infections cause around 64,000 deaths annually, with around 58 million people chronically infected worldwide. Transmission mainly occurs through infected blood, often via shared needles or unsafe medical procedures. Untreated HCV can lead to chronic liver disease, cirrhosis, and increased risk of liver cancer. Despite extensive research, no vaccine has been approved against this virus⁴⁰. The LEXSY system was first used to produce HCV vaccine antigens in a study published by Grzyb et al.³¹. The HCV envelope glycoproteins E1 and E2 were successfully produced and found to be highly immunogenic in mice. These glycoproteins are key components of the viral envelope, facilitating viral entry into host cells and playing a crucial role in the virus’s ability to infect hepatocytes.

Another study demonstrated that this system could also be employed to produce HCV VLPs, composed of the E1 and E2 glycoproteins along with core nucleocapsid proteins. The VLPs were used for immunization studies and compared to DNA-based vaccines. The findings revealed that immunization with VLPs induced both humoral and cellular responses in a mouse model and was more effective than DNA-based immunization⁴¹.

Table 2 | The use of *L. tarentolae* for the production of viral antigens

Virus	Antigen type	Viral protein	Antigen purpose	Growth medium	Production efficiency	Reference
HIV-1	Live-vector	Gag protein	Prophylactic vaccine	SDM-79 medium, FBS, hemin	n.a.	57
Influenza	Recombinant protein	Haemagglutinin (HA)	Prophylactic vaccine	BHI medium, hemin	1.5-5 mg/L	35
HeV	Recombinant protein	Attachment protein G	Diagnostic antigen	BHI medium, hemin	0.5 mg/L	69
HEV	Recombinant protein	Capsid protein ΔORF2	Diagnostic antigen	BHI medium, hemin	1.4 mg/L	68
HPV	VLPs	Major capsid protein L1	Prophylactic vaccine	BHI/M199 medium	4-6 mg/L	24
	Live-vector	Major capsid protein L1	Prophylactic vaccine	BHI medium	n.a.	63
	Live-vector	E7 protein	Prophylactic vaccine	M199 medium, hemin, FBS	n.a.	61,62
HCV	Recombinant protein	E1-E1 glycoprotein complex	Prophylactic vaccine	BHI medium, hemin	1 mg/L	31
	VLPs	Core, core-E1-E2	Prophylactic vaccine	M199 medium	4-6 mg/L	41
	Live-vector	HCV epitopes fused with heat shock protein gp96	Prophylactic vaccine	M199 medium, hemin, FBS	n.a.	64
HBV/HCV	VLPs	HBV sHBsAg with HCV E2 glycoprotein epitopes	Prophylactic vaccine	BHI medium, hemin	15-20 mg/L	42,43
TBEV	VLPs	prME proteins	Prophylactic vaccine	BHI medium, hemin	7-10 mg/L	47
NoV	VLPs	Capsid VP1 protein	Prophylactic vaccine	BHI medium	n.a.	55
	VLPs	Capsid VP1 protein with tumor-associated MUC1 epitope	Cancer immunotherapy	BHI medium	n.a.	56
SARS-CoV-2	Inactivated-carrier	Spike protein, spike protein receptor-binding domain (RBD)	Prophylactic vaccine	BHI medium, hemin	n.a.	65
	Recombinant protein	Spike protein receptor-binding domain (RBD)	Diagnostic antigen	BHI medium, hemin	2.3 mg/L	67

n.a. not available.

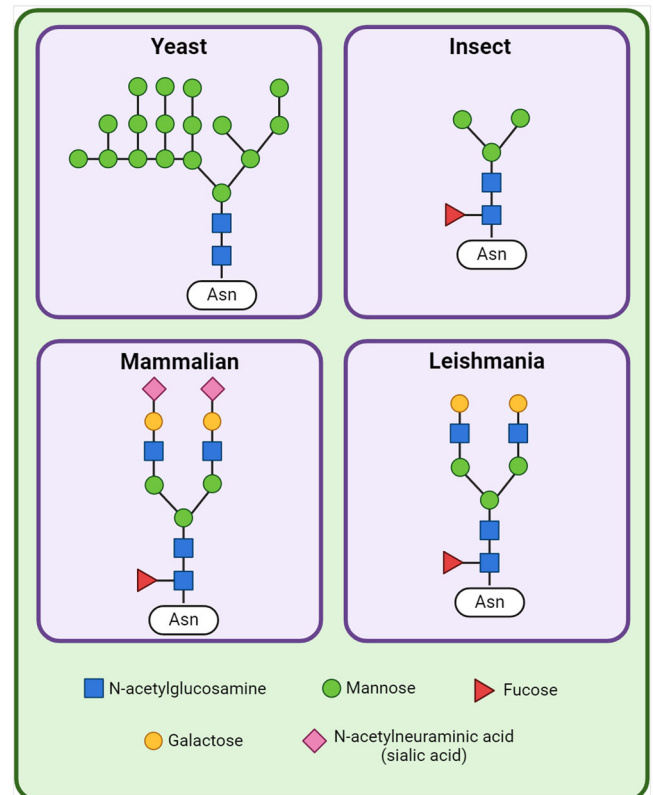


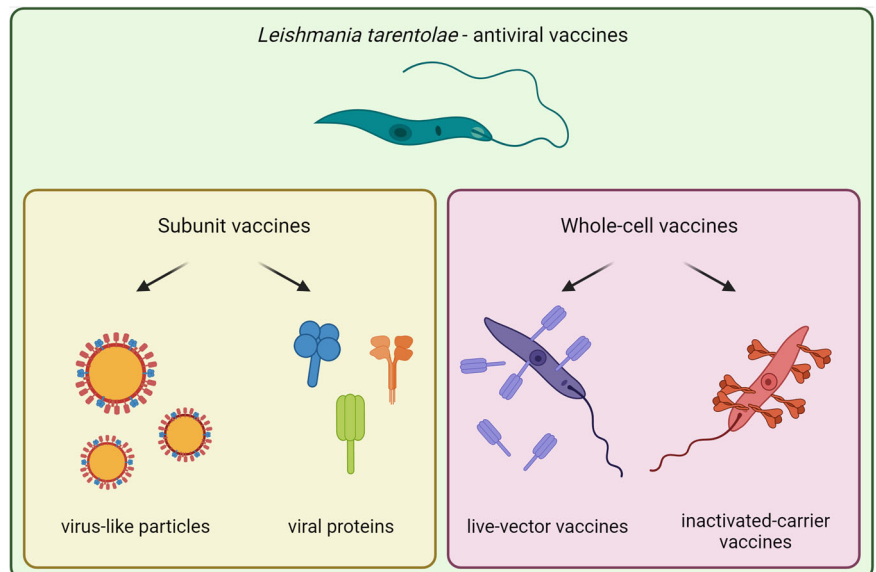
Fig. 3 | N-glycosylation patterns in different expression systems. Schematic representation of typical glycan residues in different expression systems has been shown above. Created with BioRender.com.

Additionally, different studies have proposed the development of a bivalent vaccine against hepatitis B virus (HBV) and HCV. Subviral particles built from small surface antigens (sHBsAgs) of HBV, produced in *L. tarentolae*, were used as a platform to present several epitopes of the HCV E2 glycoprotein. HBV particles composed of sHBsAg have been previously proven to be highly immunogenic and are currently used as anti-HBV vaccines, making them promising candidates for a chimeric, bivalent HBV-HCV vaccine. The studies confirmed that chimeric HBV-HCV antigens are highly immunogenic, providing both cellular and humoral responses against HBV, as well as cross-reactive humoral responses against HCV^{42,43}.

An important aspect of the emergence of infectious diseases is the potential for viral pathogens to transfer from animals to humans. This applies not only to viruses that may pose a threat in the future but also to known pathogens such as tick-borne encephalitis virus. TBEV is transmitted to humans through tick bites in wooded areas of Europe and Asia and through unpasteurized dairy products from infected animals. TBEV causes tick-borne encephalitis, which leads to symptoms like fever, headache, and fatigue. In severe cases, it can cause encephalitis or meningitis, leading to potential long-term neurological complications. Currently, five vaccines against TBEV are based on inactivated virus. In the EU, two vaccines are available: Pfizer’s FSME-Immun® and Bavarian Nordic’s Encepur®, both of which use formaldehyde-inactivated whole virus particles. Widespread vaccination of farm animals could reduce the number of human infections and lower the reservoir of TBEV in the environment. However, the high cost of these inactivated TBEV vaccines limits their use in livestock, making cheaper alternatives needed¹⁴⁴⁻⁴⁶.

A recent study described a vaccine candidate based on TBEV VLPs produced in *L. tarentolae*. Two TBEV structural proteins, prM and E, were efficiently produced in glycosylated form and assembled into VLPs, which were recognized by virus-neutralizing antibodies. Notably, these VLPs were enveloped but have been secreted and purified from the culture medium,

Fig. 4 | Scheme of different approaches to the production of antiviral vaccines with the use of *L. tarentolae*. *L. tarentolae* can be used as an expression system (subunit vaccines) or serve as a whole-cell vaccines. Created with BioRender.com.



indicating that VLP budding was possible, although the mechanism remains unknown. The VLPs were purified and used in animal models, where they were proven to be highly effective in protecting mice from TBEV infection in a challenge experiment. Therefore, TBEV VLPs produced in *L. tarentolae* could be a promising candidate for a low-cost human vaccine, as well as a veterinary vaccine⁴⁷.

Increasing vaccine availability is crucial for diseases like cervical cancer, which is primarily caused by human papilloma virus (HPV). HPV is mainly transmitted through sexual contact and direct skin-to-skin contact, with over 80% of sexually active individuals expected to contract the virus at some point. The high cost of HPV vaccines limits their accessibility in developing countries, where 85% of cervical cancer cases occur⁴⁸. Increased vaccination rates could significantly reduce the number of cervical cancer cases^{49,50}. Currently, HPV vaccines based on VLPs are produced in yeast (Gardasil®) and insect cells (Cervarix®)⁵¹.

Bolhassani et al. proposed an alternative HPV vaccine, also based on HPV VLPs, but produced using the *L. tarentolae* system. The particles were successfully obtained, and their efficacy as vaccine antigens was confirmed in studies with mice. The results showed that the antibody levels were comparable to those in animals immunized with VLPs produced in insect cells, indicating a high degree of similarity between the produced particles. These VLPs were also the first produced using the *L. tarentolae* system²⁴.

The production of VLPs using the *L. tarentolae* system has also been explored in the development of a vaccine for norovirus (NoV). NoVs are highly infectious and are the leading cause of gastroenteritis worldwide. While infections are usually self-limiting, they can persist in vulnerable populations, potentially leading to fatal outcomes. Human transmission occurs mainly via oral-fecal and vomit-oral routes, with no other known reservoirs^{52,53}. NoVs cause approximately 685 million cases of acute gastroenteritis and over 200,000 deaths annually, primarily in developing nations. The global economic burden of NoV infections exceeds \$60 billion due to healthcare costs and lost productivity. Despite these impacts, there is currently no available vaccine for NoV, making vaccine development a priority⁵⁴.

A VLP-based vaccine consisting of the NoV capsid VP1 protein produced in the LEXSY system, as proposed by Panasiuk et al., could be a good candidate. The study demonstrated that the VLPs were properly folded and stimulated the production of neutralizing antibodies⁵⁵. Additionally, these VLPs were also used as a platform to present the tumor-associated mucin 1 (MUC1) epitope. Immunization with chimeric NoV VP1-MUC1 VLPs led to the production of significant levels of MUC1-specific IgG antibodies, indicating that these chimeric VLPs hold promise for cancer immunotherapy⁵⁶.

***L. tarentolae* as a live vector vaccine**

Another approach to developing vaccines against viral pathogens by *L. tarentolae* is the use of live vector vaccines that specifically target dendritic cells (DCs) and lymphoid organs (Fig. 4). Such vaccine antigens stimulate the production of interferon gamma (IFN- γ) and elicit a strong T-cell response. Unlike viral vectors, *L. tarentolae* cannot multiply in DCs and is completely cleared from murine hosts within a few days, eliminating the need for additional modifications in the genome to prevent replication^{57,58}. Additionally, *L. tarentolae* offers the advantage of inserting long fragments of exogenous DNA, making it a promising vaccine vector¹⁹.

The first antiviral vaccine candidate developed using *L. tarentolae* was a live vaccine expressing the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) structural protein. HIV is a retrovirus that targets CD4 cells, compromising the immune system. Transmission occurs mainly through unprotected sex, sharing needles, and from mother to child during childbirth or breastfeeding. By the end of 2022, around 39 million people were infected globally, with sub-Saharan Africa being the most affected region. Although no vaccine is available, antiretroviral therapy helps to manage the disease^{59,60}. In this vaccine, the HIV-1 Gag protein was successfully expressed in *L. tarentolae* and underwent proper proteolytic processing. The antigen's ability to stimulate an antiviral response was tested in mice and human lymphoid tissue cultures, where it triggered a protective immune response⁵⁷.

This strategy was similarly applied to vaccines for HPV and HCV. For HPV, *L. tarentolae* carrying the gene for the nonstructural E7 protein induced high levels of both humoral and cellular responses. It also acted as an immunostimulatory adjuvant, showing comparable efficacy to DNA vaccines and inhibiting tumor growth in animal models^{61,62}. A strong antibody response was also observed when the E7 gene was replaced with the gene encoding HPV L1 structural protein⁶³. In the case of HCV, mice immunized with *L. tarentolae* carrying HCV epitopes fused with the N-terminal domain of the heat shock protein gp96 demonstrated a strong cellular and antibody response. The live recombinant *L. tarentolae* vaccine was effective both with and without an adjuvant, and the immune response was long-lasting⁶⁴.

***L. tarentolae* as an inactivated delivery platform**

Another approach used *L. tarentolae* as a carrier of SARS-CoV-2 antigens in mucosal vaccination (Fig. 4). This strategy can elicit a different immune response profile to the more common intramuscular or subcutaneous administration. A vaccine administered via mucosal routes could complement current vaccines and potentially provide a longer-lasting immune response. In this study, parasites expressing the SARS-CoV-2 spike protein

or a fragment of the spike RBD domain were inactivated with formalin and administered rectally. The immune responses were compared to those administered the purified antigen without a carrier. Notably, rectal administration of the antigen alone did not elicit any detectable immune response, but when the antigen was delivered using the *L. tarentolae* carrier, it triggered a strong immune response, even without the need for an adjuvant. This demonstrated that *L. tarentolae* can function as an efficient and safe delivery platform, and possibly an adjuvant for viral antigens⁶⁵.

***L. tarentolae* – a tool for the production of viral diagnostic antigens**

Viral proteins produced in the LEXSY system can also be used as diagnostic antigens. The COVID-19 pandemic underscored the importance of the rapidly developing diagnostic tools for emerging pathogens, as quick infection detection is critical for containing infectious diseases⁶⁶. While SARS-CoV-2 diagnostic tests typically use antigens produced in mammalian cells due to the need for glycosylation and proper folding, antigens produced in *L. tarentolae* have also proven effective in diagnostic assays, yielding comparable results. For instance, the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain was efficiently produced in *L. tarentolae* and used to measure antibody levels in human serum samples⁶⁷. Additionally, the hepatitis E virus (HEV) capsid protein was successfully produced in this system with high purity, and the developed ELISA test showed 92.4% agreement with a commercial HEV test, demonstrating the strong potential of *Leishmania*-derived antigens⁶⁸. Furthermore, *L. tarentolae* was used to produce the Hendra virus (HeV) attachment glycoprotein, which could aid in developing diagnostic assays for HeV⁶⁹.

While mammalian cells are recommended for producing diagnostic antigens for viral infections in humans and other mammals, this approach has limitations, such as high production costs due to slow cell growth, and expensive media and culture requirements. The LEXSY system offers a cost-effective alternative, as demonstrated by its ability to produce antigens that can be as effective as those from mammalian cells. Thus, *L. tarentolae* has the potential to be utilized in the future development of serological tests^{70,71}.

Discussion

Vaccines are the best line of defense against infectious diseases. Due to the growing risk of emerging infectious diseases, it is important to develop technologies that enable the rapid development of new vaccine antigens. It is also essential to ensure the widest possible availability of vaccines globally, not only in high-income countries. Vaccine platforms are not universally applicable to all pathogens; therefore, having a variety of expression systems and other vaccine solutions increases the likelihood of developing effective vaccines.

In recent years, interest in *L. tarentolae* as an expression system for the production of vaccine antigens, both for human and veterinary purposes, has grown. The low cost of vaccine production using *L. tarentolae* makes it particularly attractive in this regard. The use of vaccines based on selected virus antigens, rather than the whole virus (attenuated or inactivated), is also important in the context of applying the DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy.

A major advantage of this system is its combination of rapid proliferation with good production efficiency and appropriate post-translational modifications, while avoiding drawbacks such as hyperglycosylation (as seen in yeast) or endotoxin contamination (as seen in bacteria). However, there are currently no approved vaccines produced using this system, and further studies are needed before they can reach the market. Nonetheless, the studies cited here demonstrate the high potential of the *L. tarentolae* system in this area. Considering all the above factors, it is increasingly likely that this protozoan-based expression system will become an important component of future recombinant vaccines.

Received: 21 February 2024; Accepted: 23 October 2024;
Published online: 06 November 2024

References

1. Nii-Trebi, N. I. Emerging and Neglected Infectious Diseases: Insights, Advances, and Challenges. *Biomed. Res. Int.* **2017**, 5245021 (2017).
2. Jones, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**, 990–993 (2008).
3. Angevaere, M. J., Joling, K. J. & Smalbrugge, M. The Effects of the 2020 COVID-19 Lockdown on Mood, Behavior, and Social and Cognitive Functioning in Older Long-Term Care Residents. *J. Am. Med. Dir. Assoc.* **23**(9), 1608.e9–1608.e18 (2022).
4. Barbouzas, A. E., Malli, F., Daniil, Z. & Gourgoulis, K. Long-Term Impact of COVID-19 Pandemic in Sleep Quality and Lifestyle in Young Adults. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **19**, 12333 (2022).
5. Mukherjee, S. et al. Identifying long-term effects of SARS-CoV-2 and their association with social determinants of health in a cohort of over one million COVID-19 survivors. *BMC Public Health* **22**, 1–10 (2022).
6. Robert, M. A., Stewart-ibarra, A. M. & Estallo, E. L. Climate change and viral emergence: evidence from Aedes-borne arboviruses. *Curr. Opin. Virol.* **40**, 41–47 (2020).
7. Whitehorn, J. & Yacoub, S. Global warming and arboviral infections. *Clin. Med. J. R. Coll. Physicians Lond.* **19**, 149–152 (2019).
8. Graham, B. S. Advances in antiviral vaccine development. *Immunol. Rev.* **255**, 230–242 (2013).
9. MacLennan, C. A. Vaccines for low-income countries. *Semin. Immunol.* **25**, 114–123 (2013).
10. Legastelois, I. et al. Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Hum. Vaccines Immunother.* **13**, 947–961 (2017).
11. Ozawa, S., Mirelman, A., Stack, M. L., Walker, D. G. & Levine, O. S. Cost-effectiveness and economic benefits of vaccines in low- and middle-income countries: A systematic review. *Vaccine* **31**, 96–108 (2012).
12. Wallbanks, K. R., Maazoun, R., Canning, E. U. & Rioux, J. A. The identity of *Leishmania tarentolae* Wenyon 1921. *Parasitology* **90**, 67–78 (1985).
13. Wenyon, C. M. Observations on the intestinal protozoa of three Egyptian Lizards, with a note on a Cell-invading fungus. *Parasitology* **12**, 350–365 (1920).
14. Breitling, R. et al. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr. Purif.* **25**, 209–218 (2002).
15. Klatt, S. & Konthur, Z. Secretory signal peptide modification for optimized antibody-fragment expression-secretion in *Leishmania tarentolae*. *Microb. Cell Fact.* **11**, 1 (2012).
16. Wiese, M., Ilg, T., Lottspeich, F. & Overath, P. Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *EMBO J.* **14**, 1067–1074 (1995).
17. Raymond, F. et al. Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* **40**, 1131–1147 (2012).
18. LEXSY – Eukaryotic Protein Expression. Jena Bioscience brochure: https://www.jenabioscience.com/images/b3e879b381/Lexsy_brochure_web.pdf.
19. Basile, G. & Peticca, M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biotechnol.* **43**, 273–278 (2009).
20. Dortay, H. & Mueller-Roeber, B. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. *Microb. Cell Fact.* **9**, 1–10 (2010).
21. Bolhassani, A. et al. Fluorescent *Leishmania* species: Development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. *Exp. Parasitol.* **127**, 637–645 (2011).
22. Fritsche, C., Sitz, M., Weiland, N., Breitling, R. & Pohl, H. D. Characterization of the growth behavior of *Leishmania tarentolae* - A

- new expression system for recombinant proteins. *J. Basic Microbiol.* **47**, 384–393 (2007).
23. Fritsche, C., Sitz, M., Wolf, M. & Pohl, H. D. Development of a defined medium for heterologous expression in *Leishmania tarentolae*. *J. Basic Microbiol.* **48**, 488–495 (2008).
 24. Bolhassani, A., Shirbaghaee, Z., Agi, E. & Davoudi, N. VLP production in *Leishmania tarentolae*: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. *Protein Expr. Purif.* **116**, 7–11 (2015).
 25. Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R. & Alexandrov, K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr. Purif.* **42**, 37–46 (2005).
 26. Niimi, T. Recombinant protein production in the eukaryotic protozoan parasite *Leishmania tarentolae*: A review. *Methods Mol. Biol.* **824**, 307–315 (2012).
 27. Aparecida, T. et al. Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform: A review. *Process Biochem* **87**, 164–173 (2019).
 28. Mule, S. N. et al. Protein glycosylation in: *Leishmania* spp. *Mol. Omi.* **16**, 407–424 (2020).
 29. Li, Y. et al. The Importance of Glycans of Viral and Host Proteins in Enveloped Virus Infection. *Front. Immunol.* **12**, 1–12 (2021).
 30. Phan, H. P., Sugino, M. & Niimi, T. The production of recombinant human laminin-332 in a *Leishmania tarentolae* expression system. *Protein Expr. Purif.* **68**, 79–84 (2009).
 31. Grzyb, K. et al. Immunogenicity and functional characterization of *Leishmania*-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
 32. Rodriguez, F. et al. In vitro and in vivo characterization of potent antileishmanial methionine aminopeptidase 1 inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* **64**, e01422–19 (2020).
 33. Dumpa, N. et al. Stability of Vaccines. *AAPS PharmSciTech* **20**, 1–11 (2019).
 34. Chen, D. & Kristensen, D. Opportunities and challenges of developing the most stable vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 547–557 (2009).
 35. Pion, C. et al. Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in *Leishmania tarentolae*. *Vaccine* **32**, 5570–5576 (2014).
 36. Uyeki, T. M. High-risk Groups for Influenza Complications. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* **324**, 2334 (2020).
 37. Flahault, A., Vergu, E., Coudeville, L. & Grais, R. F. Strategies for containing a global influenza pandemic. *Vaccine* **24**, 6751–6755 (2006).
 38. Partridge, J. & Kieny, M. P. Global production capacity of seasonal influenza vaccine in 2011. *Vaccine* **31**, 728–731 (2013).
 39. Soema, P. C., Kompier, R., Amorij, J. P. & Kersten, G. F. A. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **94**, 251–263 (2015).
 40. World Health Organization. *Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections*, 53 (WHO, 2021).
 41. Bolhassani, A., Davoudi, N., Motevalli, F. & Agi, E. Comparison of HCV Core and CoreE1E2 Virus-Like Particles Generated by Stably Transfected *Leishmania tarentolae* for the Stimulation of Th1 Immune Responses in Mice. *Curr. Drug Deliv.* **14**, 1040–1049 (2017).
 42. 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**, 1–12 (2016).
 43. 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**, 1–19 (2020).
 44. Salát, J. et al. Development and testing of a new tick-borne encephalitis virus vaccine candidate for veterinary use. *Vaccine* **36**, 7257–7261 (2018).
 45. Salát, J. & Růžek, D. Tick-borne encephalitis in domestic animals. *Acta Virol.* **64**, 226–232 (2020).
 46. Lehrer, A. & Holbrook, M. Tick-borne Encephalitis Vaccines. *J. Bioterror. Biodef. Suppl* **1**, 1–13 (2011).
 47. Zimna, M. et al. Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles. *Antivir. Res* **209**, 105511 (2023).
 48. Beddoe, A. M. Elimination of cervical cancer: Challenges for developing countries. *Ecancermedicalscience* **13**, 1–6 (2019).
 49. Shapiro, G. K. HPV Vaccination: An Underused Strategy for the Prevention of Cancer. *Curr. Oncol.* **29**, 3780–3792 (2022).
 50. Simms, K. T. et al. Impact of scaled up human papillomavirus vaccination and cervical screening and the potential for global elimination of cervical cancer in 181 countries, 2020–99: a modelling study. *Lancet Oncol.* **20**, 394–407 (2019).
 51. Einstein, M. H. et al. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix™ and Gardasil® human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years. *Hum. Vaccin.* **5**, 705–719 (2009).
 52. Hofmann, F. M., Olawumi, E., Michaelis, M., Stöbel, U. & Hofmann, F. Significance of norovirus in occupational health: a review of published norovirus outbreaks in Central and Northern Europe. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **93**, 911–923 (2020).
 53. Liao, Y. et al. Global prevalence of norovirus in cases of acute gastroenteritis from 1997 to 2021: An updated systematic review and meta-analysis. *Microb. Pathog.* **161**, 105259 (2021).
 54. Baric, R., Carolina, N., Kang, C., Colledge, C. M. & Lee, B. *Global Burden of Norovirus and Prospects for Vaccine Development Table of Contents* (CDC, 2015).
 55. Panasiuk, M. et al. Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. *Microb. Cell Fact.* **20**, 1–11 (2021).
 56. Panasiuk, M. et al. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy. *J. Nanobiotechnol.* **20**, 1–13 (2022).
 57. Breton, M., Zhao, C., Ouellette, M., Tremblay, M. J. & Papadopoulou, B. A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J. Gen. Virol.* **88**, 217–225 (2007).
 58. Breton, M., Tremblay, M. J., Ouellette, M. & Papadopoulou, B. Live nonpathogenic parasitic vector as a candidate vaccine against visceral leishmaniasis. *Infect. Immun.* **73**, 6372–6382 (2005).
 59. World Health Organization. *Epidemiological fact sheet HIV statistics, globally and by WHO region, 2023* (WHO, 2023).
 60. Jones, J., Sullivan, P. S. & Curran, J. W. Progress in the HIV epidemic: Identifying goals and measuring success. *PLoS Med* **16**, 1–8 (2019).
 61. Salehi, M. et al. Recombinant *Leishmania tarentolae* encoding the HPV type 16 E7 gene in tumor mice model. *Immunotherapy* **4**, 1107–1120 (2012).
 62. Hosseinzadeh, S. et al. A non-pathogenic live vector as an efficient delivery system in vaccine design for the prevention of HPV16 E7-overexpressing cancers. *Drug Deliv.* **20**, 190–198 (2013).
 63. Shirbaghaee, Z., Bolhassani, A., Mirshafiey, A., Motevalli, F. & Zohrei, N. A live vector expressing HPV16 L1 generates an adjuvant-induced antibody response in-vivo. *Int. J. Cancer Manag.* **8**, 1–6 (2015).
 64. Ansari, N. et al. A non-pathogenic *Leishmania tarentolae* vector based- HCV polytope DNA vaccine elicits potent and long lasting Th1 and CTL responses in BALB/c mice model. *Mol. Immunol.* **111**, 152–161 (2019).
 65. Epis, S. et al. Efficacy of mucosal vaccination using a protozoan parasite as a vehicle for antigen delivery: IgG and neutralizing response after rectal administration of LeCoVax-2, a candidate vaccine against COVID-19. *Pharmacol. Res.* **186**, 106546 (2022).

66. Castillo-León, J., Trebbien, R., Castillo, J. J. & Svendsen, W. E. Commercially available rapid diagnostic tests for the detection of high priority pathogens: Status and challenges. *Analyst* **146**, 3750–3776 (2021).
67. Varotto-Boccazzi, I. et al. Epidemic Preparedness—Leishmania tarentolae as an Easy-to-Handle Tool to Produce Antigens for Viral Diagnosis: Application to COVID-19. *Front. Microbiol.* **12**, 736530 (2021).
68. Baechlein, C., Meemken, D., Pezzoni, G., Engemann, C. & Grummer, B. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay. *J. Virol. Methods* **193**, 238–243 (2013).
69. Fischer, K. et al. Expression, characterisation and antigenicity of a truncated Hendra virus attachment protein expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *J. Virol. Methods* **228**, 48–54 (2016).
70. Sanchez-Garcia, L. et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb. Cell Fact.* **15**, 1–7 (2016).
71. Tripathi, N. K. & Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **7**, 420 (2019).

Author contributions

M.Z. and E.K. contributed equally to manuscript preparation. All authors have read the manuscript drafts and approved the submitted version.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Correspondence and requests for materials should be addressed to Ewelina Krol.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

© The Author(s) 2024

7.2. (P2) Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on Leishmania-derived virus-like particles. Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Svoboda, P., Barańska, K., Szewczyk, B., Růžek, D., Krol, E. (2023). *Antiviral research*, 209, 105511. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511>



Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles

Marta Zimna^a, Gabriela Brzuska^a, Jiří Salát^{b,c}, Pavel Svoboda^{b,c,d,e}, Klaudia Baranska^a, Boguslaw Szewczyk^a, Daniel Růžek^{b,c,d}, Ewelina Krol^{a,*}

^a Department of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Abrahama 58, 80-307, Gdansk, Poland

^b Laboratory of Emerging Viral Infections, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ, 62100, Brno, Czech Republic

^c Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, CZ, 37005, Ceske Budejovice, Czech Republic

^d Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 735/5, CZ, 62500, Brno, Czech Republic

^e Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary Sciences Brno, Palackeho Tr. 1946/1, 61242, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Tick-borne encephalitis virus
Virus-like particles
Vaccine
Leishmania tarentolae

ABSTRACT

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a major cause of neurological infections in many regions of central, eastern and northern Europe and northern Asia. In approximately 15% of cases, TBEV infections lead to the development of severe encephalitis or meningitis. The main route of TBEV transmission is tick bites; however, ingestion of dairy products from infected animals (goats, cattle and sheep) is also a frequent cause of the disease. Therefore, vaccination of livestock in virus endemic regions could also contribute to the decrease in TBEV infection among humans. Although few vaccines against TBEV based on inactivated viruses are available for humans, due to high costs, vaccination is not mandatory in most of the affected countries. Moreover, there is still no vaccine for veterinary use. Here, we present a characterization and immunogenicity study of a new potential TBEV vaccine based on virus-like particles (VLPs) produced in *Leishmania tarentolae* cells. VLPs, which mimic native viral particles but do not contain genetic material, show good immunogenic potential. For the first time, we showed that the protozoan *L. tarentolae* expression system can be successfully used for the production of TBEV virus-like particles with highly efficient production. We confirmed that TBEV recombinant structural proteins (prM/M and E) from VLPs are highly recognized by neutralizing antibodies in *in vitro* analyses. Therefore, VLPs in combination with AddaVax adjuvant were used in immunization studies in a mouse model. VLPs proved to be highly immunogenic and induced the production of high levels of neutralizing antibodies. In a challenge experiment, immunization with VLPs provided full protection from lethal TBE in mice. Thus, we suggest that *Leishmania*-derived VLPs may be a good candidate for a safe alternative human vaccine with high efficiency of production. Moreover, this potential vaccine candidate may constitute a low-cost candidate for veterinary use.

1. Introduction

Infectious diseases remain the leading cause of morbidity and mortality in humans and animals worldwide. Respiratory viral infections and arboviral infections represent the major categories of emerging viral infections globally. Flaviviruses are vector-borne positive sense RNA viruses that can emerge unexpectedly in human populations and cause

serious diseases that are medically important. Tick-borne encephalitis virus (TBEV), an important representative of this group, can cause a disorder of the central nervous system that may lead to serious medical complications, including meningitis and meningoencephalitis (Dumpis et al., 1999). The main route of TBEV transmission is tick bites; however, other routes, such as the consumption of unpasteurized milk and milk products from infected animals such as goats, cows and sheep, remain

* Corresponding author. Abrahama 58, 80-307, Gdansk, Poland.

E-mail addresses: marta.zimna@phdstud.ug.edu.pl (M. Zimna), gabriela.brzuska@phdstud.ug.edu.pl (G. Brzuska), salat@vri.cz (J. Salát), svoboda@vri.cz (P. Svoboda), klaudia.baranska@phdstud.ug.edu.pl (K. Baranska), boguslaw.szewczyk@biotech.ug.edu.pl (B. Szewczyk), ruzekd@paru.cas.cz (D. Růžek), ewelina.krol@biotech.ug.edu.pl (E. Krol).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511>

Received 27 October 2022; Received in revised form 9 December 2022; Accepted 22 December 2022

Available online 27 December 2022

0166-3542/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

important (Růžek et al., 2010).

The geographical range of TBEV, in the past confined to East Asia and Eastern Europe, is quickly increasing; at present, it is detected in almost all of Europe (Yoshii, 2019; Mansbridge et al., 2022). Recently, TBEV has also been reported in North Africa (Khamassi Khbou et al., 2020; Fares et al., 2021). The incidence of TBE has increased over 400% during the past 20 years in Europe, which makes tick-borne encephalitis (TBE) the second most serious disease transmitted by ticks (Donoso Mantke et al., 2011). According to World Health Organization data, 10,000–12,000 tick-borne encephalitis cases are reported each year (World Health Organization, 2017).

TBEV is a small enveloped, single-stranded RNA virus with a positive-polarity RNA genome of approximately 11 kb (Růžek et al., 2019). The viral RNA contains a single open reading frame (ORF), which is translated to a large polyprotein cleaved co- and post-translationally by cellular and viral proteases to yield three structural (E, C and M) and seven nonstructural proteins involved in the replication cycle of the virus within a cell (Barrows et al., 2018). Two viral proteins (glycoprotein E and the small membrane protein M) play a major role in viral entry into target cells. Envelope E glycoprotein, as the most exposed structural element of virions, participates in the assembly of infectious particles and plays a role in viral entry, since it allows interactions with specific cell surface receptors and induces fusion between the viral envelope and the host cell membrane. It is composed of three structural domains and a transmembrane domain that is required for anchoring the protein in a lipid membrane. Domain I contains an *N*-glycosylation site and fusion-loop peptide is located in the domain II (Lattová et al., 2020). Domain I and II together are responsible for E protein dimerization. Immunoglobulin-like domain III is the most likely candidate for interactions with cellular receptors. It has also been shown that during infection, most neutralizing antibodies are directed against domain III of glycoprotein E (Zhang et al., 2017). The prM/M glycoprotein is a small membrane protein that is cleaved to the pr peptide and M protein present in mature virions during maturation of viral particles. One *N*-glyco-site is present in the pr fragment. The exact role of the prM protein in flaviviruses has not been fully determined, but it is believed to be a chaperone-like protein assisting in proper folding of E glycoprotein. This protein is also required for pH-dependent rearrangements during virion maturation and protection from premature fusion with cellular membranes (Roby et al., 2015).

Despite numerous strategies of research, there is currently no licensed therapeutic agent available for the treatment of TBEV infections. Patients diagnosed with TBE infection are usually treated to alleviate the symptoms. As there are no treatment procedures available, it is important to search for innovative prevention methods and potential therapies. Vaccination is the most effective means of disease prevention. Five vaccines against TBE based on inactivated virus are currently on the market; in the EU, two vaccines are marketed: FSME-Immun® by Pfizer and German Encepur® by Novartis. Both vaccines are based on formaldehyde-inactivated European subtype whole virus particles. Although vaccines are safe and highly effective, some drawbacks exist, and the vaccination schedule requires three doses to stimulate the development of a protective antibody response. Additionally, booster vaccinations are required every 3–5 years to maintain protective immunity, especially in the elderly population; vaccine failures even after a complete series of vaccine doses have been reported. Moreover, the production of inactivated vaccines carries the inherent risk of utilizing large quantities of potentially highly pathogenic viruses (Lehrer and Holbrook, 2011). Due to the high costs and required multiple doses, vaccination coverage in humans remains low in several endemic countries.

Currently produced human TBEV vaccines are not approved for veterinary use, and production cost limits their potential use for immunization of animals. A candidate vaccine for veterinary use has been developed, but it is also based on inactivated TBEV and has not yet been approved for clinical use (Salát et al., 2018). Given all the drawbacks of

existing vaccines, there is an urgent need for the improvement of existing TBEV vaccines and the introduction of new cheap vaccines that would be widely available for humans and could also be used for vaccination of animals to prevent the routes of transmission and reduce the number of reservoirs of virus in the environment. The intensive efforts of many laboratories mainly concentrate on recombinant vaccines such as DNA vaccines or virus-like particles (VLPs) (Růžek et al., 2019; Barrett et al., 2003).

Virus-like particles based on recombinant proteins structurally very similar to the natural virions may provide alternative, specific antigens used for vaccination purposes. Biological carriers in the form of virus-like particles are an innovative approach to the construction of vaccines due to morphological, biophysical and antigenic properties almost identical to those of natural virions as well as the lack of genetic material (Lua et al., 2014). VLPs are spontaneously produced during flavivirus infection or may be produced in various expression systems as an alternative to authentic antigens, eliminating biosafety problems (Russell et al., 1980). As there is no need to work with the virus, VLPs are also much safer to produce than inactivated vaccines. Some VLP-based vaccines against hepatitis B virus and human papilloma virus have been approved by the FDA for use in humans (Lua et al., 2014; Fuenmayor et al., 2017). VLPs based on the prM and E proteins of TBEV are immunogenic and can potentially be used as vaccine antigens (Heinz et al., 1995).

The main eukaryotic platforms for the production of recombinant proteins are mammalian, insect and yeast expression systems. Here, we propose a new TBE vaccine candidate based on virus-like particles produced in unconventional *Leishmania tarentolae* expression system. This system has been previously successfully used for the production of different proteins, especially those that require post-translational modifications, such as glycosylation (Aparecida et al., 2019). For the first time, we showed that an *L. tarentolae* expression system can be successfully used to produce TBEV VLPs with high production efficiency. The system leads to the production of recombinant TBEV VLPs with mammalian-type *N*-glycosylation patterns.

The vaccine was tested in mice, and we demonstrated its safety and effectivity. The produced VLPs elicited good titers of neutralizing antibodies, making them good candidates for a safe alternative human vaccine with low cost and high efficiency of production. Moreover, this potential vaccine candidate may represent a low-cost candidate for veterinary use to protect susceptible animals from symptomatic TBE or to vaccinate small ruminants to prevent milk-borne TBEV infections in humans.

2. Materials and methods

2.1. Plasmids

The construction of the genes used for the production of recombinant proteins is summarized in Fig. 1. Sequences of TBEV structural prM and E proteins (Neudoerfl strain) were separated by the sequence of P2A self-cleavage peptide to provide efficient separation of prM and E proteins. Additionally, a linker of 3 amino acids was added following the P2A sequence to reduce spherical hindrance in the structure of proteins. The construct was obtained by gene synthesis using *L. tarentolae*-adapted codons (GeneArt Thermo Fisher Scientific). Synthesized genes were ligated into SalI and NotI restriction sites in the pLEXY_I-blecherry3 vector (Jena Bioscience).

For the production of antigens used for assessing antibody titers in postimmunization sera in HEK293T cells, plasmids coding for full-length prM-E proteins and E protein without a transmembrane domain were used. The prM-E construct was used to obtain mammalian-derived TBEV VLPs, as these proteins are expressed together in mammalian cells from such particles.



Fig. 1. Schematic illustration of the amino acid sequence of the prMP2AE construct used for the construction of the *L. tarentolae* stable cell line. ssL –

signal sequence LMSPA1 phosphatase from *L. mexicana*, region 1–23 in the amino acid sequence of this protein, (GenBank accession number: CAA87090.1); prM – pre-membrane protein of TBEV, region 114–281 in the amino acid sequence of Neudoerfl strain polyprotein (GenBank accession number: AAA86870.1); GSG – linker sequence; P2A – self-cleavage peptide from swine *Teschovirus-1*, region 979–997 in the amino acid sequence of polyprotein of this virus (GenBank accession number: NP_653143.1); ss – signal sequence for E protein of TBEV from transmembrane domains of the prM protein, region 212–281 in the amino acid sequence of the Neudoerfl strain polyprotein; E – envelope protein of TBEV, region 282–776 in the amino acid sequence of the Neudoerfl strain polyprotein.

2.2. *L. tarentolae* cultivation and protein expression

Recombinant prMP2AE proteins were expressed using *L. tarentolae* cells in the inducible expression system LEXSY according to the guidelines of the manufacturer (Jena Bioscience). Briefly, a plasmid was introduced into cells by electroporation to obtain a stable cell line. Transfected cells were subjected to polyclonal selection by bleomycin (100 µg/mL). Recombinant cell lines were cultured in selective medium with hemin at 26 °C under aerated conditions and protected from light. For recombinant protein expression, cells were induced by adding tetracycline (15 µg/mL) and grown in agitated culture for 72 h.

2.3. SDS-PAGE and western blotting

Analysis of protein expression and purification was conducted using SDS-PAGE. Samples were run in reducing or nonreducing conditions on 10–20% gradient Tris-glycine gels in Tris-glycine SDS running buffer. After electrophoresis, the gel was used for either Coomassie staining or western blotting. Coomassie staining was performed using Imperial™ Protein Stain (Thermo Fisher Scientific). For western blotting, the proteins were transferred onto PVDF membranes using wet overnight transfer in buffer containing 25 mM Tris-Base and 150 mM glycine. After the membrane was blocked with 5% nonfat milk in TBS-T (TBS buffer with 0.1% Tween-20 (v/v)), proteins were detected with a specific monoclonal anti-Flavivirus group antigen antibody (4G2) (Absolute Antibody) (1:2000 dilution), monoclonal anti-TBEV E protein antibody 19/786 kindly provided by Professor Matthias Niedrig (1:1000 dilution) or in-house produced polyclonal rabbit serum anti-prM protein (1:1000 dilution) followed by anti-mouse or anti-rabbit peroxidase HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) (diluted 1:3000). Blots were developed using a Super Signal™ West Pico Plus Substrate system (Thermo Fisher Scientific) using the Chemidoc system Alliance™ Q9-Series (UVITEC).

2.4. Ultracentrifugation in sucrose density gradient

The medium from induced cells was collected and ultracentrifuged through a 20% (w/w) sucrose cushion in TNE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 7.4) for 3 h at 130,000×g. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended overnight in PBS with protease inhibitors. Subsequently, a sample was treated with or without 1% Triton X-100 on ice for 1 h, overlaid on a 20–60% (w/w) sucrose gradient in TNE buffer and ultracentrifuged for 16 h at 135,000×g. A total of 7 fractions were collected and analyzed by western blotting and Coomassie staining as described above.

2.5. Analysis of N-glycosylation

N-glycosylation was analyzed with PNGase F (Thermo Fisher Scientific). The sample of purified VLPs was divided into two equal portions. Samples were incubated in denaturing conditions, and one sample was treated with PNGase F for 16 h at 37 °C, while a second one was an undigested control also incubated for 16 h at 37 °C. After digestion, the samples were analyzed by mobility shift assays with western blotting as described above.

2.6. ELISAs for VLP characterization

ELISA plates were coated overnight at 4 °C with purified VLPs at 5 µg/ml in PBS buffer at pH 7.4. Then, the plate was blocked with 3% BSA (w/v) in PBS-T (PBS buffer with 0.05% Tween-20 (v/v)) for 2 h at RT. Three different primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-Flavivirus group antigen antibody (4G2) (Absolute Antibody), mouse monoclonal neutralizing antibody 19/1786 and polyclonal rabbit serum anti-prM protein in dilutions from 1:100 to 1:500,000. The antibodies were diluted in 0.3% BSA w PBS-T, and the plate was incubated for 1 h at RT. Primary antibodies were detected with anti-mouse or anti-rabbit peroxidase HRP-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:1500 in 0.3% BSA in PBS-T. The reaction was visualized with TMB Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific). After the reaction was stopped with 0.5 M H₂SO₄, the signal intensity was measured at 450 nm with a plate reader (Tecan).

2.7. Electron microscopy and immunogold labeling

For visualization of particles, fractions from density gradient ultracentrifugation were diluted 1:10 in PBS and deposited on carbon-coated 200 mesh nickel grids. Negative staining was performed with 2% uranyl acetate. For immunogold labeling, grid-deposited particles were blocked with Blocking Solution for Goat Gold Conjugates (Aurion). Grids were washed three times with incubation buffer (PBS buffer with 0.1% BSA-c (Aurion)) and incubated with primary 4G2 or 19/1786 antibodies diluted 1:40 in incubation buffer for 1 h at RT. Following six washes with incubation buffer, labeling was performed with goat anti-mouse IgG conjugated with 6 nm gold particles (Aurion) diluted 1:40 in incubation buffer for 1 h at RT, washed again and fixed with 4% paraformaldehyde. After washing, the grids were stained with 2% uranyl acetate. Samples were analyzed using a transmission electron microscope Tecnai G2 Spirit BioTWIN (FEI) (Faculty of Biology, University of Gdansk, Gdansk, Poland).

2.8. Nanoparticle tracking analysis

Size distribution and concentration analyses were carried out using an NS300 NanoSight NTA (Malvern Panalytical). Samples were prepared by dilution with sterile PBS buffer to reach a concentration of 0.1 mg/ml and were measured with five 60 s tracking repetitions. Data were analyzed using NTA 3.4 Software (Malvern Panalytical).

2.9. Immunization protocol

Groups of 6 female BALB/c mice, 6–8 weeks of age, were immunized subcutaneously with a mixture of antigen and adjuvant. Mice were immunized with 10 µg of antigen in sterile PBS buffer on Days 0, 14 and 28. The total protein content in the VLP antigen for immunization was quantified using a Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad). AddaVax (InvivoGen) was used as an adjuvant. Antigen was mixed with AddaVax in a 1:1 (v/v) ratio directly before the injection. For the first dose, animals were immunized with 200 µl of antigen-adjuvant mixture administered in two places of injection, 100 µl for each place of injection (10 µg of protein in 100 µl of PBS + 100 µl of AddaVax divided into two portions of 100 µl). For the second and third doses, the volume of antigen-adjuvant mixture was 100 µl administered in one place of

injection (10 µg of protein in 50 µl of PBS + 50 µl of AddaVax). The mice used as a negative control were immunized with adjuvant and PBS buffer only. On Day 42, the mice were sacrificed, and the sera were collected for immunological response analysis. All experiments on animals were conducted by an accredited company (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland) in accordance with the current guidelines for animal experimentation. The protocols were approved by the Local Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Science and Technology in Bydgoszcz (Permit Number: 17/2020). All surgeries were performed under isoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

2.10. Preparation of antigens for mouse sera titration

HEK293T cells were transfected with plasmids coding for full-length prM-E proteins or E protein and cultivated for 72 h. Next, the cells and medium were collected for analysis and protein or VLP purification. E protein was purified from the cell lysate on Ni-NTA resin. Cells were lysed in buffer containing 300 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 5% glycerol, and 10 mM imidazole, pH 8, and sonicated. The lysate was purified on HisPur Ni-NTA Spin Columns (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Culturing medium from cells transfected with prM-E protein was used for VLP purification. They were purified by ultracentrifugation as described above.

2.11. Analysis of mouse serum antibody titers by ELISAs

Collected mouse sera were divided into two groups. The antibody response against TBEV was measured using 10 µg/ml mammalian cell-derived TBEV VLPs and 15 µg/ml mammalian cell-derived TBEV E protein. The antibody response for both antigens was measured with ELISAs. After overnight coating, the plates were blocked for 2 h with 3% BSA (w/v) in PBS-T. Serially diluted mouse sera were added to the plate and incubated for 2 h. The binding of antibodies from sera to recombinant proteins was detected with secondary goat anti-mouse HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) (dilution 1:1500) and TMB Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific). After the reaction was stopped with 0.5 M H₂SO₄, the signal intensity was measured at 450 nm with a plate reader (Tecan).

The titers of anti-TBEV antibodies were also analyzed by a commercial IMMUNOZYM FSME IgG All-Species kit (Progen GmbH). In this test, IgG antibodies in the sera of immunized mice were quantified according to the manufacturer's guidelines. This test allowed the determination of specific IgG antibodies against TBEV in Vienna Units (VIEU/ml) based on a standard curve and reaction with inactivated virus.

2.12. Viruses

For the virus neutralization assay and challenge experiment, we used the TBEV strain Hypr (Czech prototype strain originally isolated in Czechoslovakia in 1953 from the blood of a 10-year-old child infected with TBEV) passaged five times in the brains of suckling mice and once in porcine stable kidney (PS) cells before its use in the present study. The virus was provided by the Collection of Arboviruses, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences (<https://arboviruscollection.bcco.cz>).

2.13. Virus neutralization assay

Sera were inactivated by heat (56 °C for 30 min) and diluted 1:4 in Leibowitz L-15 medium (Sigma-Aldrich) with 3% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, and 1% glutamine (Sigma-Aldrich). Subsequently, 2-fold serial dilutions of the samples in L-15 medium (50 µL/well) were incubated with 10³ PFU/mL of TBEV strain Hypr (50 µL/well) in 96-well plates for 90 min at 37 °C. The virus dose was adjusted to produce a near confluent cytopathic effect with

90–95% cytolysis. Porcine kidney stable cells (PS) were then added (3 × 10⁴ cells in 100 µL per well). After 5 days of incubation, the cytopathic effect was examined using an inverted microscope (Olympus). The highest serum dilution that inhibited the cytopathic effect of the virus was considered the endpoint titer. Samples with a titer of 1:20 and higher were considered positive for the presence of anti-TBEV neutralization antibodies. The data represent the mean values from two independent experiments performed in duplicate.

2.14. Challenge experiment

Ten female BALB/c mice, 6 weeks of age (Envigo), were immunized according to the immunization protocol described above with a mixture of antigen and adjuvant. The other ten mice injected with adjuvant only served as a control group. For evaluation of the protective effect of vaccination, all immunized and control mice were infected intraperitoneally with TBEV (10³ PFU per mouse, strain Hypr) 18 days after the third dose injection. The morbidity and survival of the infected mice were evaluated daily during a four-week experimental period. Mice were euthanized when severe signs of TBE neuroinfection occurred. The challenge experiment was performed in accordance with Czech law and guidelines for the use of laboratory animals. The protocol was approved by the Departmental Expert Committee for the Approval of Projects of Experiments on Animals of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic and the Committee on the Ethics of Animal Experimentation at the Veterinary Research Institute (Approval No. 26674/2020-MZE-18134).

2.15. Statistical analysis and graphic design

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.3.1 software.

The graphic design was performed with BioRender.

3. Results

3.1. Expression and characterization of *Leishmania*-derived TBEV VLPs

TBEV prM and E proteins were previously shown to form virus-like particles when expressed together in eukaryotic cells (Allison et al., 1995; Schlich et al., 1996). In the present study, the prMP2AE construct (Fig. 1) based on both proteins was used to produce TBEV VLPs in the *L. tarentolae* expression system. Sequences of the prM and E genes were cloned into the pLEXSY_I-blecherry3 vector. The original signal sequence for the prM protein was replaced with the one from the pLEXSY_I-blecherry3 vector—a signal peptide for LMSAP1 phosphatase from *L. mexicana*, which is naturally secreted from cells. This substitution was made for higher production of protein secreted into the culture medium and to provide proper post-translational processing (Wiese et al., 1995). The sequences of the prM and E protein genes were separated by P2A peptide sequence. The P2A peptide from porcine teschovirus-1 was added to facilitate the separation of proteins and further VLP formation (Fig. S1). The genetic sequence of the P2A peptide was introduced after the prM protein gene, followed by the signal sequence (ss) (second transmembrane domain of prM protein) and the E protein gene. The P2A sequence is preceded by a short, 3 amino acid linker to avoid spherical hindrance (Kim et al., 2011). The genetic sequence of the whole prMP2AE construct was codon-optimized for the *L. tarentolae* expression system.

The expression of recombinant proteins was carried out in cell cultures of recombinant protozoa using an inducible stable cell line of *L. tarentolae* (Kushnir et al., 2005). The production was performed for 72 h after tetracycline induction. Protein expression in the cell extract and culture medium was confirmed by immunoblotting with specific antibodies (Fig. 2). Both prM/M and E proteins were detected in cell extracts at high levels. These proteins were also secreted in substantial amounts

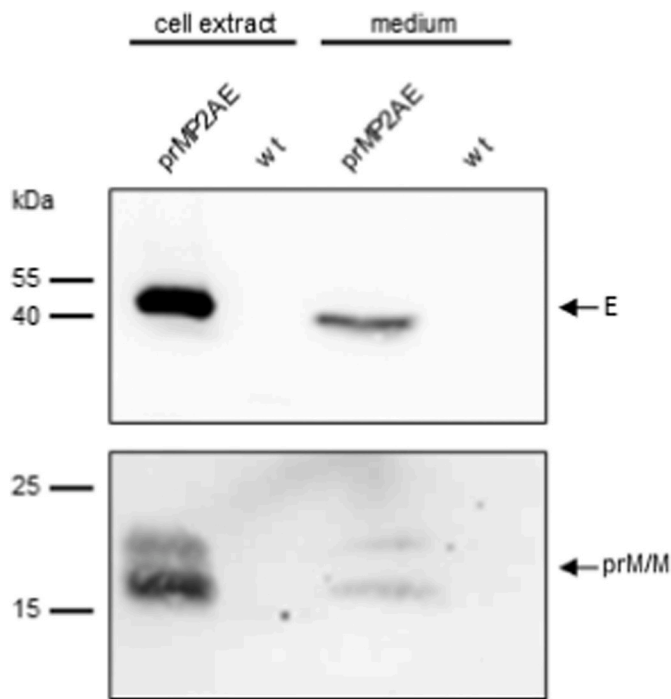


Fig. 2. Analysis of the production of prM and E proteins by *L. tarentolae*. Western blot analysis of prM and E protein production in cell extract and medium with 4G2 anti-E mAbs (top) and L24 anti-prM serum (bottom) under nonreducing conditions. Cell extract and medium from wild-type *L. tarentolae* (wt) were used as a negative control.

into the culture medium, which was chosen for further analyses. The molecular mass of the E protein was determined to be approximately 50 kDa. Two forms of prM/M were detected at approximately 17–20 kDa. The uncleaved prM protein has a theoretical mass of ~26 kDa, a pr fragment of ~17 kDa and a mature M protein of approximately 10 kDa. At least one of the detected forms may correspond to the pr fragment or uncleaved prM protein; in particular, we did not observe any band that could correspond to the M protein. This finding may indicate that the pr fragment is still not fully cleaved from the M protein and that the pr fragment as well as the intact prM protein may be present. As according to prediction using NetPhos-3.1 software (DTU Health Tech) prM protein has 11 sites of high phosphorylation potential, the presence of two bands may also be attributed to phosphorylated and unphosphorylated forms of this protein.

To confirm that recombinant proteins form VLPs in the culture medium, we conducted further analyses. The formation of higher density structures was first confirmed by ultracentrifugation of VLPs from the culture medium in a sucrose density gradient. Seven fractions were harvested and analyzed by immunoblotting. Both proteins were detected in fractions with approximately 36–44% sucrose concentration (Fig. 3a). According to Schalich et al. (1996), the buoyant density of TBEV VLPs is approximately 1.14 g/cm³, which is in agreement with our results, as a sucrose density of 36% (w/w) corresponds to approximately 1.15 g/cm³. Furthermore, we analyzed the detergent sensitivity of the obtained VLPs. VLPs were treated with the strong nonionic detergent Triton X-100 and again ultracentrifuged in a sucrose density gradient (Fig. 3b). After treatment, the majority of both proteins were detected in fractions with a lower sucrose density and/or the proteins did not efficiently enter the gradient. As Triton breaks down higher protein and membrane structures, the results may indicate that some complex, enveloped particles are being formed. Coomassie staining of the collected fractions showed that ultracentrifugation allowed VLP purification (Fig. 3c). The fractions with the highest concentrations of VLPs were combined, and the protein concentration was determined by the

Bradford method. The efficiency of VLP production was approximately 7–10 mg per 1 L of *Leishmania* culture.

To finally confirm VLP formation, we performed transmission electron microscopy analysis. The analyzed samples contained spherical particles with a diameter of approximately 50–60 nm (Fig. 3d). Additionally, the quality of the obtained particles was verified with immunogold labeling. Two specific monoclonal antibodies against the E protein, a 4G2 antibody against the fusion loop epitope and a 19/1786 neutralizing antibody that binds to the conformational epitope between the DI-DIII domains of the E protein, were used (Füzik et al., 2018). Both antibodies reacted with VLPs, suggesting that these epitopes are properly exposed on the surface of the produced particles.

Moreover, nanoparticle tracking analysis (NTA) was performed to assess the size distribution and concentration of purified VLPs. The analysis showed that the population of particles was homogenous in size (Fig. 3e). The mean hydrodynamic diameter was calculated to be 159.5 ± 2.0 nm. Since the same analysis performed on purified medium from wild-type *L. tarentolae* showed only the presence of much smaller particles (Fig. S2), this suggests that analyzed particles are proper VLPs particles.

The estimated number of VLPs purified from 1 L of culture was calculated to be 9.1 × 10¹⁰. NTA also allowed the stability assessment of VLPs. Analysis was carried out on two samples, one freshly purified and one stored at 4 °C for 18 months after purification. There was only a slight change in particle distribution between the samples, which may suggest that the VLPs can be successfully stored for long periods of time. This was also confirmed by ELISA, western blotting and Coomassie staining, which did not show differences between the freshly purified sample and the one stored at 4 °C for 18 months after purification (Fig. S3).

Purified VLPs were subjected to further functional analyses. The antigenic properties of VLPs were assessed by ELISAs using the same antibodies as in immunogold labeling: the specific monoclonal antibodies 4G2 and 19/1786 as well as anti-prM polyclonal serum (Fig. 4a). ELISAs clearly indicated that the produced VLPs are specifically and strongly recognized by the 19/1786 antibody. As the 19/1786 antibody is a neutralizing antibody, the strong binding with VLPs may suggest the proper conformation of the E glycoprotein. The detection with anti-prM serum was not as efficient in the ELISA test. Strong recognition by this serum in a previous Western blot assay may suggest that the produced and purified VLPs may be a combination of mature or only partially mature particles. The produced VLPs were also weakly recognized by the 4G2 antibody; thus, we believe that the fusion loop is covered by the prM protein or hidden in the produced VLPs.

Furthermore, N-glycosylation of prM/M and E proteins present on VLPs was analyzed by treatment with endoglycosidase PNGase F (Fig. 4b). Both the E and prM (pr fragment) proteins possess one N-glycosylation site. In both cases, a shift in molecular mass was observed by western blots after enzyme treatment, which proved that both proteins are glycosylated. Moreover, both forms of the prM/M protein were affected by PNGase F treatment, which confirmed that the detected prM/M proteins were in the form of pr fragments or uncleaved prM proteins. However, taken together, the efficient expression and the data from functional analysis suggest that VLPs may have high potential as good immunogens. Therefore, VLPs purified from the cell culture medium were used for immunization studies in an animal model.

3.2. Immunogenicity of *Leishmania*-derived TBEV VLPs

For determination of the immunogenicity of TBEV VLPs, a group of BALB/c mice were immunized subcutaneously with 3 doses of 10 µg of VLPs in combination with an adjuvant on Days 0, 14 and 28. AddaVax, a squalene-based oil-in-water nanoemulsion, was used as the adjuvant to improve the immunogenic response. AddaVax is an analog of the MF59 adjuvant licensed for human use in Europe. Blood samples were taken before each immunization and 14 days after the last vaccination (on Day

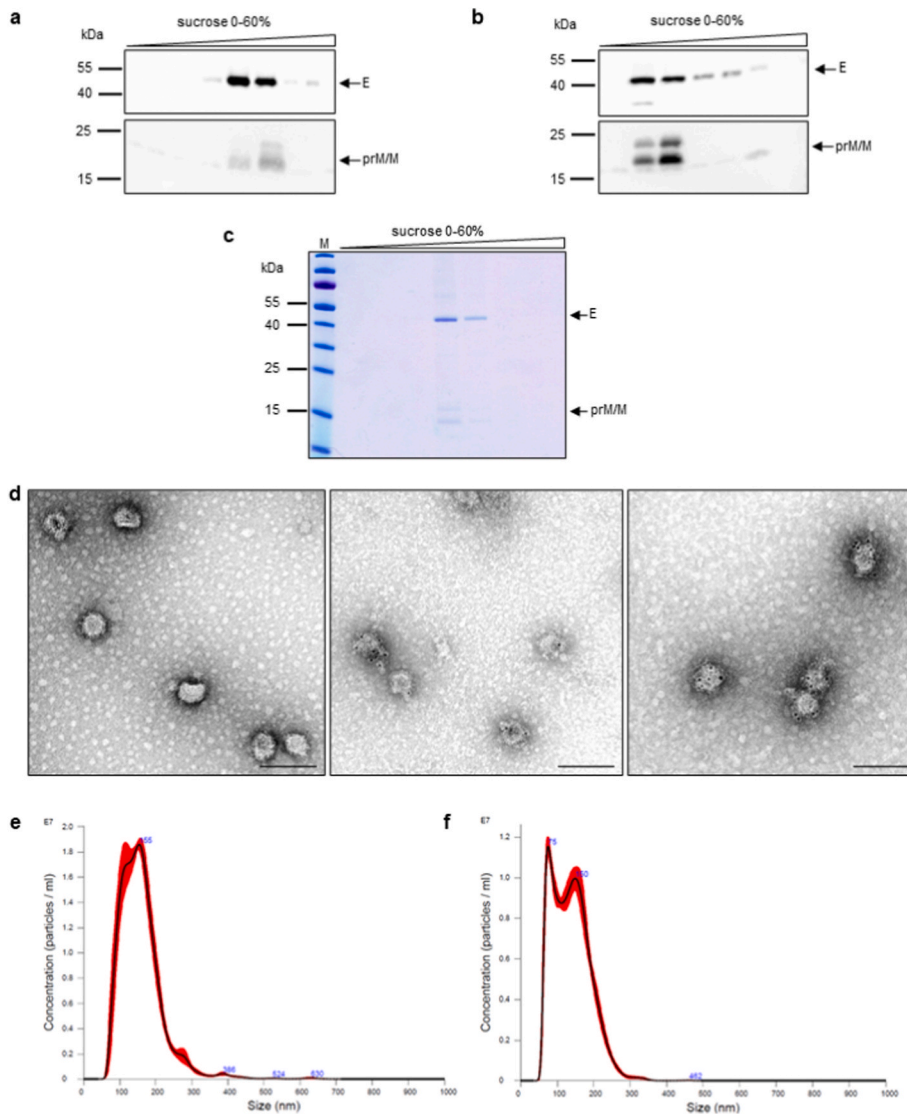


Fig. 3. Analysis of virus-like particle formation. **a** Western blot analysis of fractions collected after ultracentrifugation in a sucrose density gradient (0–60% sucrose/TNE) with 4G2 anti-E Abs and L24 anti-prM serum under nonreducing conditions. **b** Western blot analysis of fractions collected after ultracentrifugation in a sucrose density gradient (0–60% sucrose/TNE) with 4G2 anti-E Abs (*top*) and L24 anti-prM serum (*bottom*) under nonreducing conditions. Prior to ultracentrifugation, the sample was treated with Triton X-100. **c** Coomassie staining of fractions collected after ultracentrifugation in a sucrose density gradient (0–60% sucrose/TNE) of samples not treated with Triton X-100 under reducing conditions. M – molecular marker. **d** Transmission electron micrographs of virus-like particles. After ultracentrifugation in a sucrose density gradient, the particles were negatively contrasted with 2% uranyl acetate and analyzed with a transmission electron microscope (*left*). For confirmation of the specificity of the observed particles, immunogold labeling with 4G2 (*middle*) and 19/1786 (*right*) anti-E mAbs and secondary Abs conjugated with 6 nm gold particles was performed. Scale bar 100 nm **e** Analysis of the size distribution and quantification of freshly purified VLPs (*left*) and VLPs after 18 months of storage at 4 °C. Histograms show the average size distribution of the measured particles. Numbers in blue indicate the size of particles from each peak, and the red surface corresponds to the standard deviation values. Numbers on the y-axis are the results from samples with a concentration of 0.1 mg/ml VLPs.

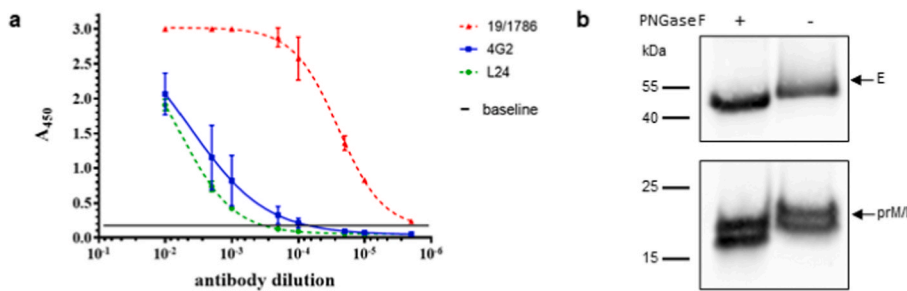


Fig. 4. Functional analysis of purified VLPs. **a** Recognition of particles with specific antibodies. The 4G2 and 19/1786 anti-E mAbs and L24 anti-prM serum were used. The plate was coated with 5 µg/mL VLP protein. For each antibody, the mean from two independent experiments performed in triplicate is shown. Error bars indicate standard deviations. **b** Western blot analysis of prM and E protein mobility shifts after PNGase F treatment under reducing and denaturing conditions. The 19/1786 anti-E mAbs (*top*) and L24 anti-prM serum (*bottom*) were used.

42). Mice in the control group were immunized with the same schedule only with PBS buffer in the presence of AddaVax adjuvant. Animals did not show any side effects during vaccination. Sera were pooled, and the humoral response elicited by immunization was analyzed by determining specific antibody titers using an ELISA test (Fig. 5). VLPs (Fig. 5a) and E protein (Fig. 5b) produced in mammalian cells were used as antigens for titration. The obtained results confirmed that full immunization with the produced VLPs resulted in high antibody titers reaching 1×10^5 . Analyses of antibody levels after each immunization showed that the titer in the experimental group began to grow after the

second immunization, while the level of antibodies in sera from the control group did not show significant changes. Similar levels of antibodies for these two antigens may suggest that most of them are directed against the E protein. The commercially available test based on inactivated virus allowed estimation of antibody levels in the sera of vaccinated mice in Vienna Units (Fig. 5c). In the experimental group, the specific antibody concentration was approximately 55 VIEU/mL, while in the control group, it was equal to approximately 5 VIEU/mL. The level of antibodies after final immunization was significantly higher than in the control animals in all tests. Subsequently, the neutralizing potential

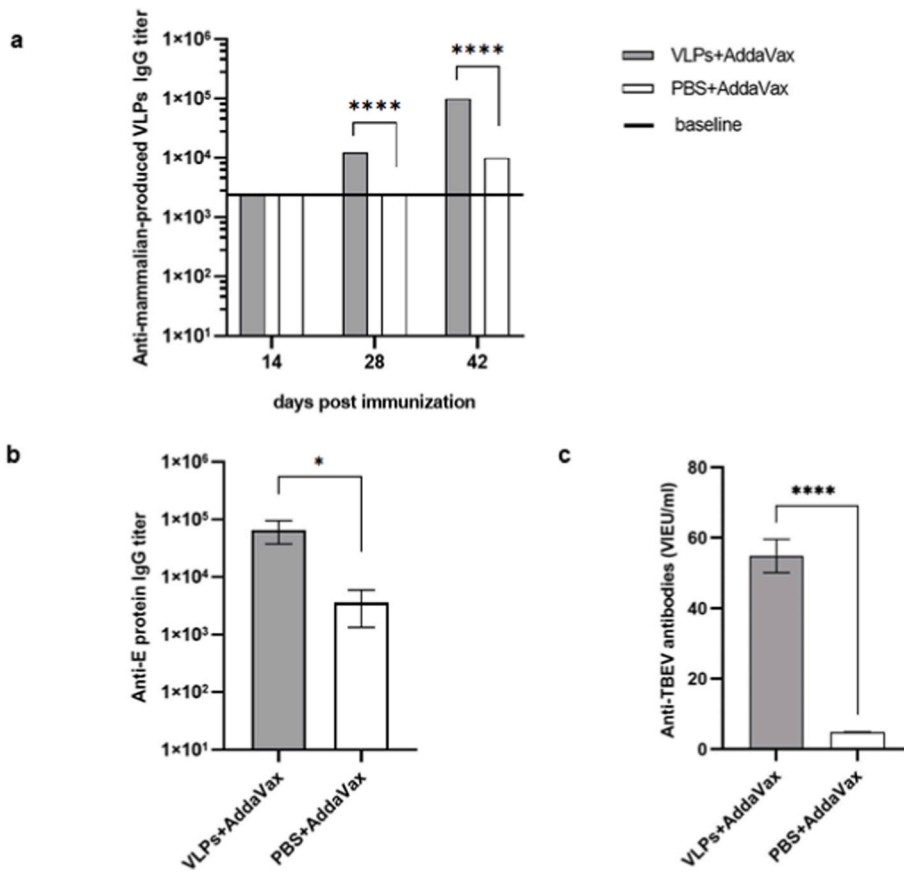


Fig. 5. Analysis of the humoral response after immunization with *Leishmania*-derived VLPs in BALB/c mice. VLPs + AddaVax refers to a group immunized with antigen, and PBS + AddaVax is a control group vaccinated only with adjuvant. **a** The results show antibody titers in mouse sera before every immunization and 14 days after the last immunization. Mammalian-derived VLPs (10 µg/mL) were used as an antigen. Baseline was established as the serum antibody level prior to the vaccination. P values were calculated using the multiple *t*-test (****, $P < 0.05$). **b** Titers of anti-E antibodies in sera of immunized mice 14 days after the last immunization. The plate was coated with 15 µg/mL purified E protein. The P value was calculated using the unpaired *t*-test (*, $P < 0.05$). Antibody titers were calculated as the highest serum dilution for which absorbance value was higher than the mean background value plus two standard deviations (a, b). **c** The concentration of anti-TBEV antibodies in mouse sera 14 days after the last immunization based on the standard curve. The P value was calculated using the unpaired *t*-test (****, $P < 0.0001$). The data represent the values from three independent experiments performed in duplicate, and error bars indicate standard deviations.

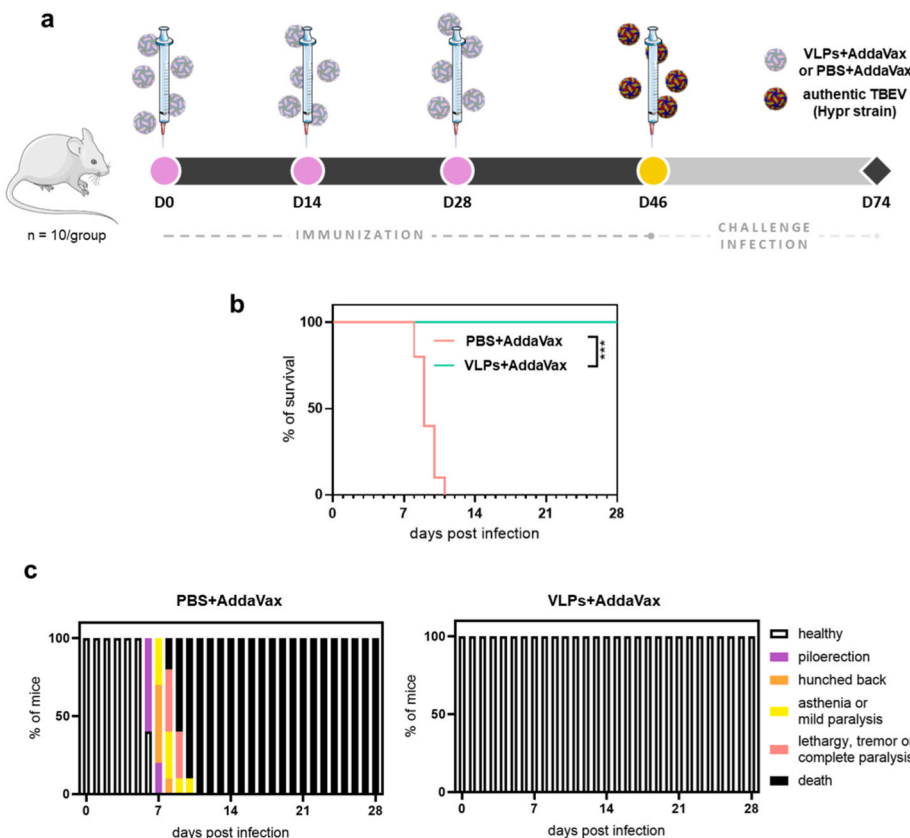


Fig. 6. Efficacy of vaccine candidate in challenge experiments. **a** Experimental protocol. Mice were immunized with three doses of the vaccine candidate (VLPs + AddaVax) two weeks apart. A control group was injected with the adjuvant only (PBS + AddaVax). Eighteen days after injection of the third dose, the mice were challenged with authentic TBEV. Morbidity and survival were assessed during a four-week experimental period. (Figure created with Servier Medical Art, available at www.servier.com). **b** Kaplan-Meier survival curve. The P value was calculated using the Mantel-Cox test (***, $P < 0.001$). **c** Histograms show disease progression in the control group receiving adjuvant alone (left) and in the group immunized with the vaccine candidate (right).

of postimmunization sera was analyzed. The experiment was conducted with the TBEV Hypr strain. The sera from the experimental group were able to neutralize the virus up to a dilution of 1:160. The serum from the control group did not show any neutralizing potential. Finally, a challenge experiment with a lethal dose of TBEV was performed to verify whether immunization with the prepared vaccine would protect animals from the development of TBE (Fig. 6a). All vaccinated and infected mice survived until the end of the experiment at 28 days post-infection (Fig. 6b) and did not show any symptoms of TBE (Fig. 6c). In contrast, mice from the control group started to develop symptoms on the sixth day post-infection and had to be euthanized by the eleventh day after infection. Therefore, we can conclude that VLPs produced in *L. tarentolae* were highly immunogenic, causing effective production of neutralizing antibodies and providing protection against a lethal dose of TBEV, as confirmed in the challenge experiment.

4. Discussion

Despite available vaccines, TBEV is still a major concern in many European and Asian countries (Bogovic, 2015). This report is the first to evaluate the production of TBEV VLPs in the *L. tarentolae* expression system, which provides post-translational processing, including glycosylation processes, very similar to that of mammalian cells. Only a few viral antigens have been previously successfully produced in the *L. tarentolae* system (Breton et al., 2007; Baechlein et al., 2013; Pion et al., 2014; Grzyb et al., 2016; Czarnota et al., 2016; Fischer et al., 2016). *L. tarentolae* cultures can be easily scaled up; therefore, they are good candidates for industrial scale production. The use of this expression system could also lead to significantly lower vaccine production costs than are currently incurred for inactivated vaccines. Production costs in the *L. tarentolae* system are lower than in mammalian cells, due to lower costs of the culture medium as well as lower requirements for cell cultures. The purification procedure can also be carried out more easily and at a lower cost because the culturing medium for *L. tarentolae* has fewer components than the medium for mammalian cells. All these, in turn, could directly translate into greater availability of the TBEV vaccine. Additionally, it may lead to the development of a cheap veterinary vaccine, as immunization of animals can be a way to reduce viral reservoirs and reduce transmission to humans (Salát and Růžek, 2020). In our study, the introduction of additional elements (e.g., the signal sequence from *L. mexicana* and P2A peptide) in addition to the sequences of the TBEV structural proteins made it possible to obtain a very high yield of recombinant particles. Although some studies have shown that the addition of the *L. mexicana* signal peptide can impair the production of some recombinant proteins (Breton et al., 2007; Pion et al., 2014), our results confirmed the data obtained by Wiese et al., 1995) and Grzyb et al., 2016 (Wiese et al., 1995; Grzyb et al., 2016), which indicated that proteins fused with this signal sequence are efficiently produced and successfully secreted into the culture medium. Codons were optimized to obtain the highest possible production efficiency (Breton et al., 2007). Moreover, to our knowledge, the P2A peptide was successfully used for the first time to facilitate the separation of the TBEV prM and E proteins. All these factors allowed not only a high expression efficiency but also a very high secretion of particles into the culture medium, which translates into the ease of their purification using a one-step purification process (Figs. 2 and 3a, c). VLP formation was further confirmed by electron microscopy analysis using immunogold labeling with two different antibodies recognizing the E protein (Fig. 3d). A high level of recognition of particles by neutralizing 19/1786 antibody suggests that the exposition of important epitopes is correct and therefore can induce a strong immunological response (Füzik et al., 2018).

L. tarentolae has been shown to be the first single-cell organism able to produce biantennary *N*-glycans similar to those in higher eukaryotic organisms, lacking only sialylation (Breitling et al., 2002). Both the TBEV prM and E proteins have one *N*-glycosylation site. The role of these

glycans is still not fully understood, but it has been shown that the removal of *N*-glycans from the E protein reduces the infectivity of viral particles (Yoshii et al., 2013). Therefore, it is important that the glycosylation pattern is also maintained in the vaccine candidate antigen so that the immune response induced by the vaccine provides the highest possible level of protection from the native virus. It has also been shown that glycosylation may be important for TBEV VLP secretion (Goto et al., 2005). In this study, the glycosylation profile of proteins composing VLPs was also examined. We confirmed that both the prM and E proteins were fully glycosylated, as shown by PNGase F treatment (Fig. 4b).

The strong immunogenicity potential of *Leishmania*-derived TBEV VLPs was confirmed by immunization of mice. Our study showed that immunization with VLPs results in high antibody titers measured by ELISAs with heterologous-derived antigens from mammalian cells (Fig. 5), and the sera from immunized animals had strong neutralizing properties against the virus. Moreover, immunization with VLPs protected mice from developing any TBE symptoms in experimental infection with a lethal dose of TBEV (Fig. 6). Without a doubt, the high safety profile and strong immunogenic potential of the vaccine antigen characterized in this study call for further investigation of these promising observations.

To our knowledge, this is the first study undertaken to prove that the production of flaviviral VLPs is possible in a system based on the protozoa *L. tarentolae*. We have also shown that the particles produced in this system have strong immunogenic properties and are a good candidate for a cost-efficient and highly effective TBEV vaccine. Further studies, such as the analysis of protection from other virus subtypes and safety studies, need to be conducted to confirm the high potential of this vaccine antigen. However, based on the present study, we believe that the VLP particles described in this report may be good candidates for the production of TBEV vaccines on an industrial scale.

Funding

This work was funded by the National Science Centre, Poland [grant number 2015/19/D/NZ6/01717]; Ministry of Education and Science of Poland [grant number MNiSW/2020/317/DIR]; UGrants - University of Gdansk [grant number 533-OC30-GS40-21]; the Czech Science Foundation [grant number 20-14325S]; and Ministry of Industry and Trade of the Czech Republic [grant number FV40076].

Author contribution

Conceptualization: M.Z., D.R. and E.K.; Data curation: M.Z., G.B., J. S., P.S. and K.B.; Data analysis and interpretation: M.Z., J.S., P.S., D.R. and E.K.; Funding acquisition: D.R., M.Z. and E.K.; Investigation and assays: M.Z., G.B., J.S., P.S., and K.B.; Methodology: M.Z., P.S. and D.R.; Project administration: E.K.; Supervision: D.R. and E.K.; Visualization: M.Z., J.S. and P.S.; Writing – original draft: M.Z. and E.K.; Writing – review & editing: M.Z., B.S., D.R. and E.K. All authors have read the manuscript drafts and approved the submitted version.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgments

We thank Matthias Niedrig for providing the 19/1786 anti-TBEV antibodies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511>.

References

- Allison, S.L., Stadler, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1995. Synthesis and secretion of recombinant tick-borne encephalitis virus protein E in soluble and particulate form. *J. Virol.* 69 (9), 5816–5820.
- Aparecida, T., Oliveira, D., Torres, R., Victor, J., Moraes, B De, Lima, R., et al., 2019. Application of the LEXSY *Leishmania tarentolae* system as a recombinant protein expression platform : a review. *Process Biochem.* [Internet] 87, 164–173. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.08.019> (August).
- Baechlein, C., Meemken, D., Pezzoni, G., Engemann, C., Grummer, B., 2013. Expression of a truncated hepatitis E virus capsid protein in the protozoan organism *Leishmania tarentolae* and its application in a serological assay. *J. Virol. Method.* 193 (1), 238–243.
- Barrett, P.N., Schober-Bendixen, S., Ehrlich, H.J., 2003. History of TBE vaccines. *Vaccine* 21 (Suppl. 1), S41–S49.
- Barrows, N.J., Campos, R.K., Liao, K.C., Prasanth, K.R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.C., et al., 2018. Biochemistry and molecular Biology of flaviviruses. *Chem. Rev.* 118 (8), 4448–4482.
- Bogovic, P., 2015. Tick-borne encephalitis: a review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases* 3 (5), 430.
- Breitling, R., Klingner, S., Callewaert, N., Pietrucha, R., Contreras, R., Geyer, A., et al., 2002. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr. Purif.* 25 (2), 209–218.
- Breton, M., Zhao, C., Ouellette, M., Tremblay, M.J., Papadopoulou, B., 2007. A recombinant non-pathogenic *Leishmania* vaccine expressing human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) Gag elicits cell-mediated immunity in mice and decreases HIV-1 replication in human tonsillar tissue following exposure to HIV-1 infection. *J. Gen. Virol.* 88 (1), 217–225.
- Czarnota, A., Tyborowska, J., Peszyńska-Sularz, G., Gromadzka, B., Bieńkowska-Szewczyk, K., Grzyb, K., 2016. Immunogenicity of *Leishmania*-derived hepatitis B small surface antigen particles exposing highly conserved E2 epitope of hepatitis C virus. *Microb. Cell Factories* 15 (1), 1–12.
- Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M., Pfeffer, M., 2011. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill.* 16 (39).
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28 (4), 882–890.
- Fares, W., Dachraoui, K., Cherni, S., Barhoumi, W., Slimane, T Ben, Younsi, H., et al., 2021. Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: ixodidae) ticks, Tunisia. *Ticks Tick Borne Dis.* [Internet] 12 (1), 101606. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101606>. Available from:
- Fischer, K., dos Reis, V.P., Finke, S., Sauerhering, L., Stroh, E., Karger, A., et al., 2016. Expression, characterisation and antigenicity of a truncated Hendra virus attachment protein expressed in the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *J. Virol. Method.* 228 (Feb), 48–54.
- Fuenmayor, J., Gòdia, F., Cervera, L., 2017. Production of virus-like particles for vaccines. *N. Biotech.* 39 (Part B), 174–180.
- Füzik, T., Formanová, P., Růžek, D., Yoshii, K., Niedrig, M., Plevka, P., 2018. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat. Commun.* 9 (1), 1–11.
- Goto, A., Yoshii, K., Obara, M., Ueki, T., Mizutani, T., Kariwa, H., et al., 2005. Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine* 23 (23), 3043–3052.
- Grzyb, K., Czarnota, A., Brzozowska, A., Cieślak, A., Ł, Rąbalski, Tyborowska, J., et al., 2016. Immunogenicity and functional characterization of *Leishmania*-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Sci. Rep.* 1–11.
- Heinz, F.X., Allison, S.L., Stiasny, K., Schalich, J., Holzmann, H., Mandl, C.W., et al., 1995. Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* 13 (17), 1636–1642.
- Khamassi Khbou, M., Romdhane, R., Foughali, A.A., Sassi, L., Suin, V., Rekik, M., et al., 2020. Presence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in sheep in Tunisia, North Africa. *BMC Vet. Res.* 16 (1), 1–8.
- Kim, J.H., Lee, S.R., Li, L.H., Park, H.J., Park, J.H., Lee, K.Y., et al., 2011. High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice. *PLoS One* 6 (4), 1–8.
- Kushnir, S., Gase, K., Breitling, R., Alexandrov, K., 2005. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. *Protein Expr. Purif.* 42 (1), 37–46.
- Lattová, E., Straková, P., Pokorná-Formanová, P., Grubhoffer, L., Bell-Sakyi, L., Zdráhal, Z., et al., 2020. Comprehensive N-glycosylation mapping of envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus grown in human and tick cells. *Sci. Rep.* [Internet] 10 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70082-2>. Available from:
- Lehrer, A., Holbrook, M., 2011. Tick-borne encephalitis vaccines. *J. Bioterrorism Biodefense* (Suppl. 1).
- Lua, L.H.L., Connors, N.K., Sainsbury, F., Chuan, Y.P., Wibowo, N., Middelberg, A.P.J., 2014. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* 111 (3), 425–440.
- Mansbridge, C.T., Osborne, J., Holding, M., Dryden, M., Aram, M., Brown, K., et al., 2022. Autochthonous tick-borne encephalitis in the United Kingdom: a second probable human case and local eco-epidemiological findings. *Ticks Tick Borne Dis.* [Internet] 13 (1), 101853. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101853>. Available from:
- Pion, C., Courtois, V., Husson, S., Bernard, M.C., Nicolai, M.C., Talaga, P., et al., 2014. Characterization and immunogenicity in mice of recombinant influenza haemagglutinins produced in *Leishmania tarentolae*. *Vaccine* 32 (43), 5570–5576.
- Roby, J.A., Setoh, Y.X., Hall, R.A., Khromykh, A.A., 2015. Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins. *J. Gen. Virol.* 96 (7), 1551–1569.
- Russell, P.K., Brandt, W.E., Dalrymple, J.M., 1980. Chemical and antigenic structure of flaviviruses. In: Schlesinger, R.W. (Ed.), *The Togaviruses: Biology, Structure, Replication*, pp. 503–529. New York.
- Růžek, D., Dobler, G., Mantke, O.D., 2010. Tick-borne encephalitis: pathogenesis and clinical implications. *Trav. Med. Infect. Dis.* 8 (4), 223–232.
- Růžek, D., Avšič Županc, T., Borde, J., Chrdle, A., Eyer, L., Karganova, G., et al., 2019. Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antivir. Res.* 164 (Apr), 23–51.
- Salát, J., Růžek, D., 2020. Tick-borne encephalitis in domestic animals. *Acta Virol.* 64 (2), 226–232.
- Salát, J., Formanová, P., Huňady, M., Eyer, L., Palus, M., Ruzek, D., 2018. Development and testing of a new tick-borne encephalitis virus vaccine candidate for veterinary use. *Vaccine* 36 (48), 7257–7261.
- Schalich, J., Allison, S.L., Stiasny, K., Mandl, C.W., Kunz, C., Heinz, F.X., 1996. Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J. Virol.* 70 (7), 4549–4557.
- Wiese, M., Ilg, T., Lottspeich, F., Overath, P., 1995. Ser/Thr-rich repetitive motifs as targets for phosphoglycan modifications in *Leishmania mexicana* secreted acid phosphatase. *EMBO J.* 14 (6), 1067–1074.
- World Health Organization, 2017. *Global Vector Control Response 2017–2030*.
- Yoshii, K., 2019. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* 81 (3), 343–347.
- Yoshii, K., Yanagihara, N., Ishizuka, M., Sakai, M., Kariwa, H., 2013. N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *J. Gen. Virol.* 94 (10), 2249–2258.
- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., Cheng, A., 2017. Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses* 9 (11), 1–14.

Title

Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles

Authors

Marta Zimna¹, Gabriela Brzuska¹, Jiří Salát^{2,3}, Pavel Svoboda^{2,3,4,5}, Klaudia Baranska¹, Boguslaw Szewczyk¹, Daniel Růžek^{2,3,4}, Ewelina Krol^{1*}

¹ Department of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Abrahama 58, 80-307 Gdansk, Poland.

marta.zimna@phdstud.ug.edu.pl (M.Z.); gabriela.brzuska@phdstud.ug.edu.pl (G.B.); klaudia.baranska@phdstud.ug.edu.pl (K.B.); szewczyk@biotech.ug.gda.pl (B.S.); ewelina.krol@biotech.ug.edu.pl (E.K.)

² Laboratory of Emerging Viral Infections, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100 Brno, Czech Republic. salat@vri.cz (J.S.); svoboda@vri.cz (P.S.); ruzekd@paru.cas.cz (D.R.)

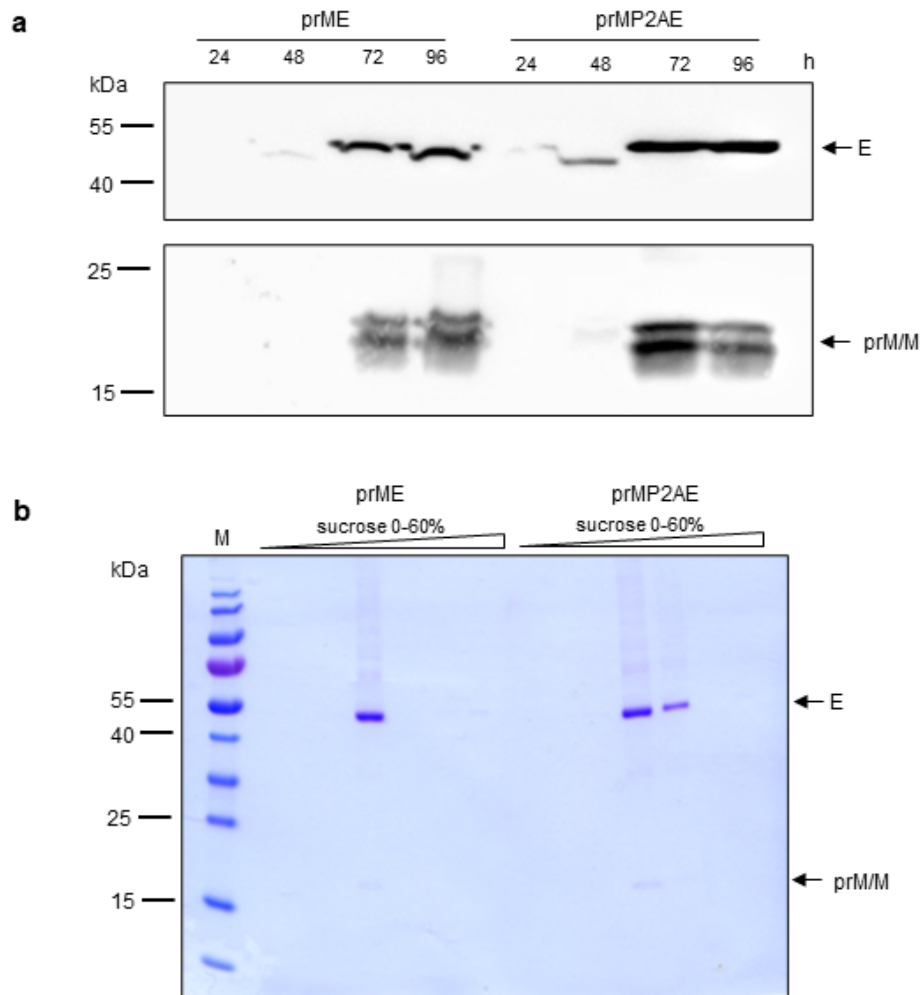
³ Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, CZ-37005 Ceske Budejovice, Czech Republic. salat@vri.cz (J.S.); svoboda@vri.cz (P.S.); ruzekd@paru.cas.cz (D.R.)

⁴ Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 735/5, CZ-62500 Brno, Czech Republic. svoboda@vri.cz (P.S.); ruzekd@paru.cas.cz (D.R.)

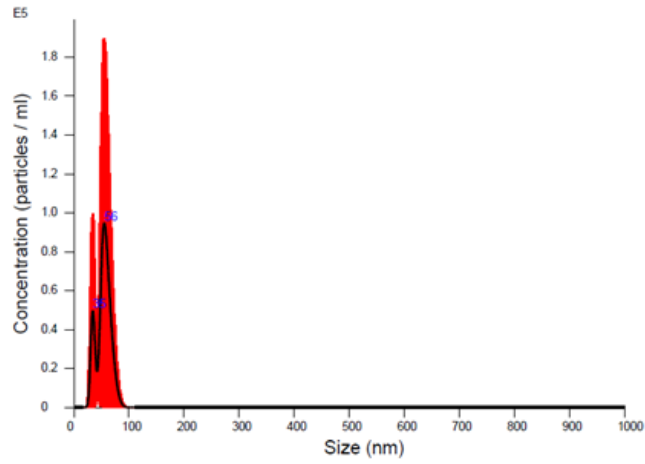
⁵ Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 61242 Brno, Czech Republic. svoboda@vri.cz (P.S.)

* Correspondence: Ewelina Krol, Abrahama 58, 80-307 Gdansk, Poland; ewelina.krol@biotech.ug.edu.pl; Tel.: +48-58-523-63-83

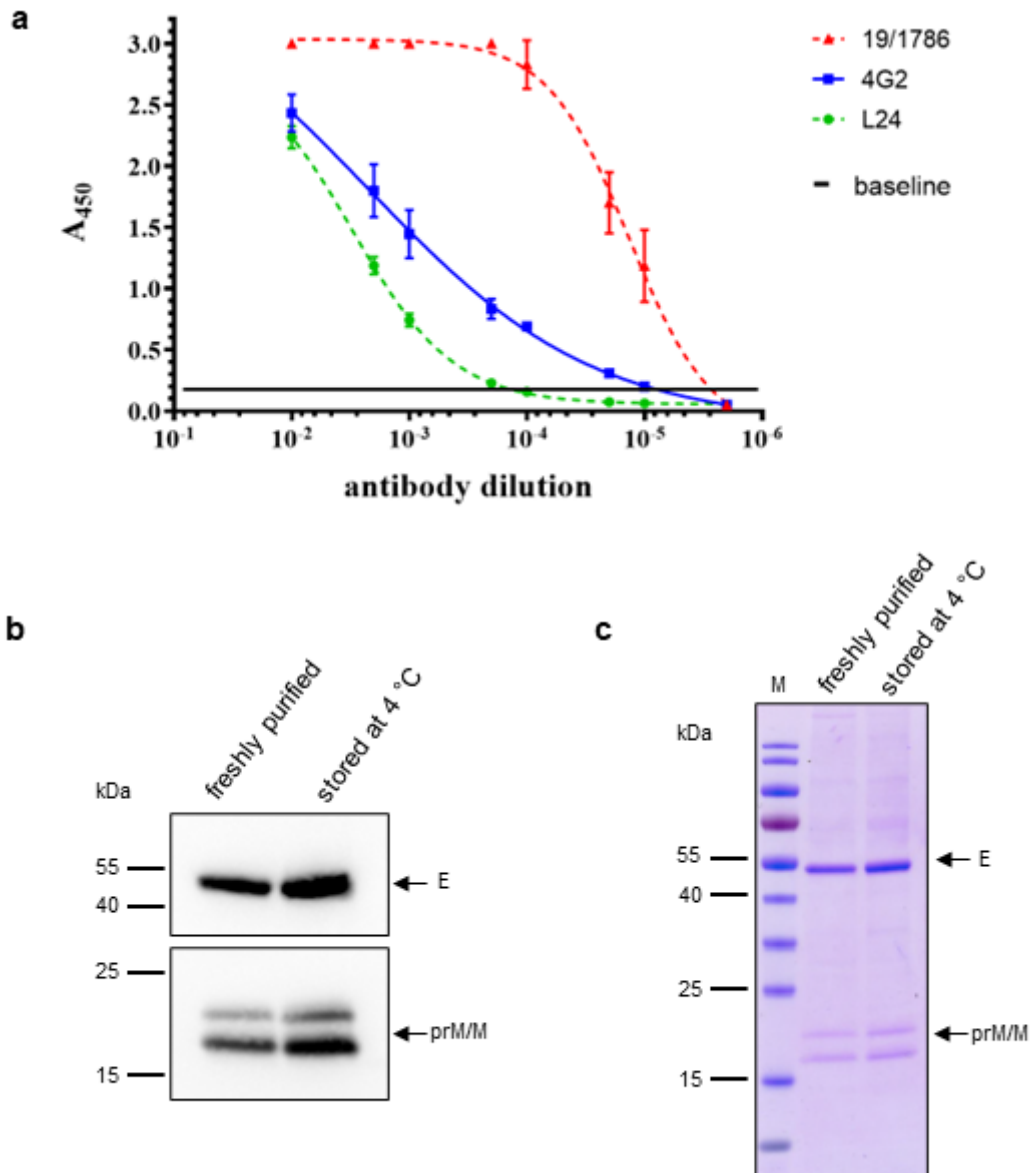
Supplementary Data:



Supplementary figure 1. Comparison of efficiency of production of construct without (prME) and with P2A peptide (prMP2AE). **a** Analysis of the secretion of prM and E proteins to the medium for prME and prMP2AE constructs in different time points. Western blot analysis of prM and E protein production in cell extract and medium with 4G2 anti-E mAbs (*top*) and L24 anti-prM serum (*bottom*) under nonreducing conditions. **b** Coomassie staining of fractions collected after ultracentrifugation in a sucrose density gradient (0-60% sucrose/TNE) for prME and prMP2AE constructs under reducing conditions. M – molecular marker.



Supplementary figure 2. Analysis of the size distribution and quantification of particles in purified medium from wild-type *L. tarentolae*. Histograms show the average size distribution of the measured particles. Numbers in blue indicate the size of particles from each peak, and the red surface corresponds to the standard deviation values.



Supplementary figure 3. Analysis of VLPs stability. **a** Recognition of particles stored in 4 °C for 18 months with specific antibodies. The 4G2 and 19/1786 anti-E mAbs and L24 anti-prM serum were used. The plate was coated with 5 µg/mL of VLP protein. For each antibody, the mean from two independent experiments performed in duplicate is shown. Error bars indicate standard deviations. **b** Western blot analysis of freshly purified sample and purified sample stored in 4 °C for 18 months with 4G2 anti-EAbs (*top*) and L24 anti-prM serum (*bottom*) under nonreducing conditions. **c** Coomassie staining of freshly purified sample and purified sample stored in 4 °C for 18 months under nonreducing conditions. M – molecular marker.

7.3. (P3) Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of Leishmania-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate. Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Růžek, D., Krol, E. (2024). *Antiviral research*, 228, 105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>



Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles – A recombinant vaccine candidate

Marta Zimna^a, Gabriela Brzuska^a, Jiří Salát^{b,c}, Daniel Růžek^{b,c,d}, Ewelina Krol^{a,*}

^a Department of Recombinant Vaccines, Intercollegiate Faculty of Biotechnology, University of Gdansk and Medical University of Gdansk, Abrahama 58, 80-307, Gdansk, Poland

^b Laboratory of Emerging Viral Infections, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, CZ-62100, Brno, Czech Republic

^c Institute of Parasitology, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, CZ-37005, Ceske Budejovice, Czech Republic

^d Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 735/5, CZ-62500, Brno, Czech Republic

ARTICLE INFO

Keywords:

Tick-borne encephalitis virus
Virus-like particles
Vaccine
Adjuvants
Leishmania tarentolae

ABSTRACT

Tick-borne encephalitis virus (TBEV) is a tick-borne flavivirus that induces severe central nervous system disorders. It has recently raised concerns due to an expanding geographical range and increasing infection rates. Existing vaccines, though effective, face low coverage rates in numerous TBEV endemic regions. Our previous work demonstrated the immunogenicity and full protection afforded by a TBEV vaccine based on virus-like particles (VLPs) produced in *Leishmania tarentolae* cells in immunization studies in a mouse model. In the present study, we explored the impact of adjuvants (AddaS03™, Alhydrogel®+MPLA) and administration routes (subcutaneous, intramuscular) on the immune response. Adjuvanted groups exhibited significantly enhanced antibody responses, higher avidity, and more balanced Th1/Th2 response. IFN- γ responses depended on the adjuvant type, while antibody levels were influenced by both adjuvant and administration routes. The combination of *Leishmania*-derived TBEV VLPs with Alhydrogel® and MPLA via intramuscular administration emerged as a highly promising prophylactic vaccine candidate, eliciting a robust, balanced immune response with substantial neutralization potential.

1. Introduction

Infectious diseases remain a substantial global health concern for both humans and animals. Especially important are respiratory viral and arboviral infections. Flaviviruses are a class of vector-borne positive-sense RNA viruses. They are particularly important, given their potential to emerge unexpectedly and induce severe medical conditions (Pierson and Diamond, 2018). Climate change contributes to the prolonged presence of vectors transmitting flaviviruses, including ticks and mosquitoes. Therefore it heightens the risk of infection with these viruses (Tsoumani et al., 2023). Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection can result in central nervous system (CNS) disorders like meningitis and meningoencephalitis. Its primarily transmitted through tick bites (Dumpis et al., 1999). TBEV was first identified in 1937 in the Soviet Union. Since then, its geographical presence has expanded. Now

it has been identified in many European countries, East Asia, and recently reported in North Africa (Fares et al., 2021; Mansbridge et al., 2022; Yoshii, 2019). The incidence of tick-borne encephalitis has notably increased in Europe over the past two decades, ranking it as the second most severe tick-transmitted disease. The World Health Organization reports 10,000–12,000 annual cases of tick-borne encephalitis, with a considerable number of infections being asymptomatic or displaying nonspecific symptoms, implying a significantly underreported magnitude of the issue (Donoso Mantke et al., 2011; World Health Organization, 2017).

As of now, no licensed therapeutic agent exists for treating TBEV infections, and the standard approach involves symptom relief. Consequently, preventive vaccination stands as the most effective means of combatting this virus infection. In Europe (outside Russia), two vaccines against TBEV are available: FSME-Immun® (Pfizer) and Encepur®

* Corresponding author. Abrahama 58, 80-307 Gdansk, Poland.

E-mail addresses: marta.zimna@phdstud.ug.edu.pl (M. Zimna), gabriela.brzuska@phdstud.ug.edu.pl (G. Brzuska), salat@vri.cz (J. Salát), ruzekd@paru.cas.cz (D. Růžek), ewelina.krol@biotech.ug.edu.pl (E. Krol).

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

Received 30 January 2024; Received in revised form 16 May 2024; Accepted 17 June 2024

Available online 19 June 2024

0166-3542/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

(Novartis). Both vaccines are based on formaldehyde-inactivated European subtype whole virus particles and incorporate aluminum hydroxide as an adjuvant to booster the immune response (Lehrer and Holbrook, 2011).

In our previous work, we described the characterization of TBEV virus-like particles (VLPs) produced for the first time in the *Leishmania tarentolae* expression system. These VLPs exhibited promising potential as a vaccine candidate. The TBEV envelope is comprised of two essential proteins: the envelope glycoprotein (E) and the membrane protein (M). The glycoprotein E, positioned as the outermost and visually prominent structural element of virions, plays a crucial role in the formation of infectious particles (Barrows et al., 2018). Numerous studies, including our previous work, have demonstrated the ability of glycoprotein E to form VLPs in conjunction with the M protein. These non-infectious particles, incorporating both proteins within a lipid membrane, have been explored as a prospective vaccine antigen (Tang et al., 2023; Yoshii et al., 2008; Yun et al., 2014; Zimna et al., 2023).

Due to their high effectiveness in animal studies and providing complete protection against the disease in challenge experiment, TBEV VLPs have a high potential for future use as a vaccine antigen (Zimna et al., 2023). The VLPs present a less complex production process compared to currently used inactivated vaccines, offering a potential for easier commercialization. Additionally, they provide the possibility of implementing the DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy. In our current study, we specifically investigated the influence of adjuvants and the route of vaccine administration on the immune response elicited by these VLPs. This analysis aimed to identify the optimal combination for achieving the highest level of protection. Antibody responses are pivotal in the defense against viral infections, offering protection through various mechanisms such as blocking virus binding, opsonization, phagocytosis, and lysis of infected cells. Furthermore, a balanced Th1/Th2 response is crucial for effective immunity. Given that the type of immune response is significantly influenced by the adjuvant used, its careful selection is paramount for the efficacy of a potential vaccine (Ellebedy and Ahmed, 2016).

In our previous proof-of-concept study involving *Leishmania*-derived VLPs, we utilized AddaVax™ (InvivoGen) as the adjuvant. AddaVax™ is a squalene-based oil-in-water nanoemulsion, analogous to the MF59® (Novartis) adjuvant. The MF59®-adjuvanted seasonal influenza vaccine, Flud® (Novartis), originally licensed in 1997 for elderly use, has subsequently received approval for inclusion in human vaccines across more than 30 countries (Ko and Kang, 2018; O'Hagan et al., 2013, 1997).

In this study, we opted to employ two other adjuvants: AddaS03™ (InvivoGen) and a combination of MPLA (Monophosphoryl Lipid A) (InvivoGen) with Alhydrogel® (InvivoGen). AddaS03™, an analog of AS03® (GlaxoSmithKline), like the previously used AddaVax™, is a squalene-based oil-in-water nanoemulsion. However, it also contains DL- α -tocopherol and the surfactant polysorbate 80 (Tween® 80) for enhanced stability (["https://www.invivogen.com/addas03-adjuvant,"](https://www.invivogen.com/addas03-adjuvant) n.d.). AS03® is included in pandemic H5N1 influenza vaccines and has been used in studies for malaria vaccine (Stanisic and Good, 2023; Wilkins et al., 2017). It has been demonstrated to induce transient NF- κ B-dependent innate immune responses, promoting the production of cytokines and chemokines at the injection site and in the draining lymph nodes. This, in turn, facilitates the migration of crucial immune cells. A notable characteristic of AS03® is its inclusion of DL- α -tocopherol, the most bioavailable form of vitamin E. This distinguishes AS03® from other oil-in-water adjuvants, allowing it to augment both cell-mediated and humoral immune responses compared to vaccines without adjuvants (Garçon et al., 2012; Morel et al., 2011; Shi et al., 2019).

Alhydrogel® is an aluminum hydroxide wet gel suspension known for its mechanism of action in enhancing antigen presentation by antigen-presenting cells (APCs). It achieves this by increasing antigen uptake, leading to the induction of a Th2 response. Additionally, Alhydrogel® can activate innate immunity pathways by stimulating pattern

recognition receptors (PRRs) ("[https://www.invivogen.com/alhydrogel,](https://www.invivogen.com/alhydrogel)" n.d.). MPLA, extracted from the lipopolysaccharide (LPS) of *Salmonella minnesota*, exerts its action by activating Toll-like receptor 4 (TLR4). This activation strongly induces a Th1 response through the NF- κ B-dependent pathway, leading to the production of pro-inflammatory cytokines ("[https://www.invivogen.com/mpla-vaccigrade,](https://www.invivogen.com/mpla-vaccigrade)" n.d.; Iwasaki and Medzhitov, 2004). The combination of MPLA with Alhydrogel® functions as an analog of AS04® (GlaxoSmithKline), a formulation utilized in licensed VLP-based vaccines such as Fendrix® (against HBV) and Cervarix® (against HPV) (Cimica and Galarza, 2017; Rachel Skinner et al., 2016). In this vaccine formulation, MPLA and an antigen are adsorbed on aluminum hydroxide, promoting the stimulation of both Th1 and Th2 responses while providing stability to the vaccine formulation (Didierlaurent et al., 2017; Giannini et al., 2006).

In this study, we conducted a comprehensive analysis of both humoral and cellular responses, along with evaluating the virus neutralizing potential of sera from mice immunized with *Leishmania*-derived TBEV VLPs in combination with the described adjuvants, administered via subcutaneous (s.c.) and intramuscular (i.m.) routes.

2. Materials and methods

2.1. Production of VLPs

VLPs were produced as described before (Zimna et al., 2023). Briefly, recombinant prMP2AE proteins based on TBEV Neudorfl strain were expressed using *L. tarentolae* stable cell line. The medium from induced cells was collected and ultracentrifuged in a two-step process. Subsequently, buffer was exchanged to sterile PBS and purified antigen was used for immunization.

2.2. Immunization protocol

Groups of 6 (3 for control groups) female BALB/c mice, 6–8 weeks of age, were immunized subcutaneously or intramuscularly with a mixture of antigen and adjuvant or antigen without any adjuvant (as summarized in Fig. 1). Mice were immunized with 10 μ g of antigen in sterile PBS buffer or water on Days 0, 14 and 28. The total protein content in the VLP antigen for immunization was quantified using a Quick Start™ Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Two types of adjuvants were used: AddaS03™ and Alhydrogel® in combination with MPLA. All adjuvants were purchased from InvivoGen. Antigen was mixed with AddaS03™ directly before administration and in case of combination with Alhydrogel® and MPLA, the antigen was mixed with adjuvant 36 h before administration. The total volume of one dose was 100 μ l in subcutaneous administration and 50 μ l in intramuscular administration. Control groups were immunized with adjuvant and PBS/water depending on the adjuvant or with PBS only. On Day 42, the mice were sacrificed, and the sera were collected for immunological response analysis. All experiments on animals were conducted by an accredited company (Tri-City Academic Laboratory Animal Centre, Medical University of Gdansk, Gdansk, Poland) in accordance with the current guidelines for animal experimentation. The protocols were approved by the Local Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Science and Technology in Bydgoszcz (Permit Number: 24/2022). All surgeries were performed under isoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering.

2.3. ELISPOT assay

T-cell response was analyzed by an enzyme-linked immune spot assay (ELISPOT) detecting IFN- γ after stimulation of mouse splenocytes according to the manufacturer's instructions (BD Sciences). Briefly, 96-well ELISPOT plates were coated with anti-mouse IFN- γ antibody and blocked using RPMI Medium 1640 supplemented with 10% FBS, 25 mM HEPES buffer, Pen-strep antibiotic and 2 mM L-glutamine (Thermo

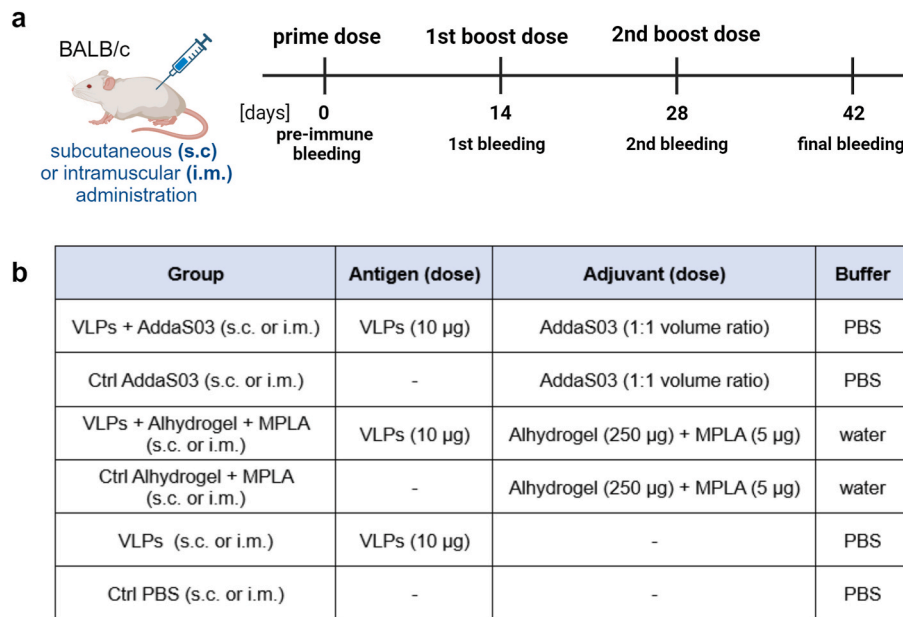


Fig. 1. Schematic illustration of the immunization study. **a** Visual representation of the immunization schedule. **b** Immunization dosing for each experimental and control group of BALB/c mice ($n = 6$ for experimental groups, $n = 3$ for control groups).

Fisher Scientific). Splenocytes were isolated from the mice in the 42nd day after the first immunization by passage through 70 µm strainers followed by treatment with ACK lysing buffer (Thermo Fisher Scientific). After washing, splenocytes were seeded at 5×10^5 cells/well and stimulated overnight at 37 °C with 4 groups of synthetic peptides overlapping regions of prM and E proteins (ProteoGenix) at the concentration of 2 µg/mL. Concanavalin A was used as a positive control and complete medium was used as a negative control. The mean number of spots from duplicate wells were calculated for each animal and adjusted to represent the mean number of spots forming cells (SFC) per 10^6 splenocytes. For additional analyses splenocytes from all animals from the group were pooled together and stimulated with the VLPs used and an immunogen at the concentration of 10 µg/mL. Other steps of the experiment were performed as described above.

2.4. Analysis of antibody levels

The titers of anti-TBEV antibodies were analyzed by a commercial IMMUNOZYM FSME IgG All-Species kit (Progen GmbH) based on an inactivated virus as an antigen. Total anti-TBEV IgG antibodies in the post-immunization sera were quantified according to the manufacturer's protocol. Concentration of antibodies was calculated based on a standard curve and expressed in Vienna Units (VIEU/mL). Second test used for titration of IgG antibodies was ELISA based on mammalian-produced VLPs (purified as described previously (Zimna et al., 2023)). 96-well ELISA plate was coated overnight with 5 µg/mL of mammalian cell-derived TBEV VLPs. Then the plates were blocked for 2 h with 3% BSA (w/v) in PBS-T. Serially diluted mouse sera were added to the plate and incubated for 2 h. The binding of antibodies from sera to recombinant proteins was detected with secondary goat anti-mouse HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) for total IgGs or with one of the following antibodies for the detection of specific class of IgGs: goat, cross-adsorbed anti-mouse IgG1 (Thermo Fisher Scientific), goat anti-mouse IgG2a (Thermo Fisher Scientific), goat, cross-adsorbed anti-mouse IgG2b (Thermo Fisher Scientific) or goat, cross-adsorbed anti-mouse IgG3 (Thermo Fisher Scientific). TMB Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific) was used for detection of bound antibodies. After the reaction was stopped with 0.5 M H₂SO₄, the signal intensity was measured at 450 nm with a plate reader (Tecan).

2.5. Evaluation of antibodies avidity

Avidity of antibodies was determined as described before (Brzuska et al., 2023). Serum samples were subjected to ELISA based on mammalian-produced VLPs as described above. In order to determine avidity of antibodies potassium thiocyanate (KSCN) was used as a chaotropic agent. After coating and blocking the plate, it was incubated with serum samples diluted 1:50 (dilution allowing to achieve the A₄₅₀ value of ~2.2–2.5) for 2 h. Then the plate was treated with 1.5 M KSCN (200 µL/well) for 30 min at room temperature. After the secondary goat anti-mouse HRP-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were added, the protocol was followed as described above. Avidity index was calculated as a ratio of mean absorbance value from KSCN treated sample to the non-treated sample and expressed as a percentage.

2.6. Viruses

For the virus neutralization assay, we used the following TBEV strains: Hypr (originally isolated in Czechoslovakia in 1953 from a 10-year-old child; passed five times in the brains of suckling mice and once in BHK-21 cells before its use in the present study), 9001 (originally isolated in 1978 from *Ixodes ricinus* ticks in Czechoslovakia; passed two times in the brains of suckling mice, once in PS cells and then again in the brains of suckling mice), and Neudoerfl (originally isolated in 1971 from *I. ricinus* ticks in Austria; passed five times in the brains of suckling mice, and once in UKF-NB-4, before its use in the present study). These viruses were sourced from the Collection of Arboviruses, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences (<https://arboviruscollection.bcco.cz>) for strains Hypr and 9001, and from Prof. Franz X. Heinz at the Medical University of Vienna, Austria, for strain Neudoerfl.

2.7. Virus neutralization test

Sera were inactivated by heat (56 °C for 30 min) and diluted 1:4 in Leibowitz L-15 medium (Sigma-Aldrich) with 3% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, and 1% glutamine (Sigma-Aldrich). Subsequently, 2-fold serial dilutions of the samples in L-15 medium (50 µL/well) were incubated with 10^3 PFU/mL of TBEV (strain Hypr/9001/Neudoerfl) (50 µL/well) in 96-well plates for 90 min at 37 °C. The virus dose was adjusted to produce a near confluent

cytopathic effect with 90–95% cytolysis. Porcine kidney stable cells (PS) were then added (3×10^4 cells in 100 μ L per well). After 5 days of incubation, the cytopathic effect was examined using an inverted microscope (Olympus). The highest serum dilution that inhibited the cytopathic effect of the virus was considered the endpoint titer. Samples with a titer of 1:20 and higher were considered positive for the presence of anti-TBEV neutralization antibodies.

2.8. Statistical analysis and graphic design

Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9.3.1 software. The graphic design was performed with BioRender.

3. Results

The goal of this study was to analyze the immunogenicity of *Leishmania*-derived VLPs in combination with different adjuvants and via various routes of administration. Production of VLPs was conducted as described before (Zimna et al., 2023). Since we demonstrated the effectiveness of immunization with such VLPs in a previous challenge experiment, here we decided to focus on the profile of the immune response and determine whether changes in the adjuvant type or route of administration could increase the level of immune response compared to the previously used AddaVax™ in s.c. administration. We performed immunological studies in a mouse animal model. Six different groups of mice were immunized with VLPs: three via s.c. and three via i.m. administration, each with different combinations of adjuvants—AddaSO3™ and Alhydrogel®+MPLA, or VLPs without any adjuvant (Fig. 1). Control groups were immunized with PBS or water with the respective adjuvant.

3.1. T-cell response

T-cell response was analyzed by an ELISPOT detecting interferon-gamma (IFN- γ) secretion by isolated murine splenocytes after stimulation with a mitogen (peptides covering prM and E proteins or VLPs) (Fig. 2). No IFN- γ production was detected for pools covering pr and M regions (data not shown). For the E protein, the response was detected only for both groups adjuvanted with Alhydrogel®+MPLA for peptides covering the E ectodomain (Fig. 2a). The response was slightly higher in s.c. administration; however, the difference was not statistically significant. Some slight response to E ectodomain peptides was also detected for the group immunized with AddaSO3™ in i.m. administration. As an additional analysis, we performed ELISPOT in which splenocytes from the groups in i.m. administration were stimulated with the same VLPs as those used for immunization (Fig. 2b). IFN- γ production was detected in

all groups, though in the group without any adjuvant, its level was lower than in adjuvanted groups. For both groups with adjuvant, the level of response was similar, despite the fact that in ELISPOT with peptides stimulation, the group with AddaSO3™ showed a much lower level of response.

3.2. Antibody response

Antibody response was analyzed in the preimmune sera and in the sera collected after each immunization to assess the kinetics of antibodies generated in response to immunization (Fig. 3). Sera from animals from each group were pooled together for all experiments. The IgG titers were first measured with a commercial test based on inactivated virus (Fig. 3a). In all analyzed groups, the level of antibodies increased after each dose. After the prime immunization, the level of antibodies was similar for adjuvanted and non-adjuvanted groups; however, after boosting doses, a significant difference between these groups was noticed. Concentration of antibodies was rising in all groups; however, the increase was much higher in adjuvanted groups than in non-adjuvanted ones. It is worth noting that the levels of antibodies were different for the same adjuvant but used in different routes of administration. The highest concentrations of antibodies were observed for the group with AddaSO3™ in s.c. administration and the group with Alhydrogel®+MPLA in i.m. administration for which it reached over 300 VIEU/mL. The highest increase in antibodies concentration after the last boosting was detected in the AddaSO3™ s.c. group, where it was almost tripled. Interestingly, in our previous study where mice were immunized according to the same schedule but with AddaVax™ instead of AddaSO3™ the level of antibodies reached less than 60 VIEU/mL (Zimna et al., 2023). In fact, the level of antibodies after the second dose of immunization in all adjuvanted groups was already higher than after the last (third) dose in our previous study. In that case, vaccination provided full protection in the challenge experiment. Therefore, since the currently reached antibody levels are already higher after the second dose, it is possible that administering only two doses with the currently used adjuvants would have already provided a sufficient level of protection. The level of antibodies was also assessed with ELISA based on mammalian-derived VLPs (Fig. 3b). In this case, in non-adjuvanted groups, antibodies were not detected until the first boosting dose and did not increase after the second boosting dose. The titer was also lower than in adjuvanted groups. In all adjuvanted groups, the titer was at the same level. The antibodies were detected already after the prime dose and reached the highest level after the first boost. Interestingly, after the second boosting dose, a 1-log decrease in the titer was observed in all adjuvanted groups. Moreover, titers of different IgG classes were determined to further assess the immune response (Fig. 3c). IgG1, IgG2a,

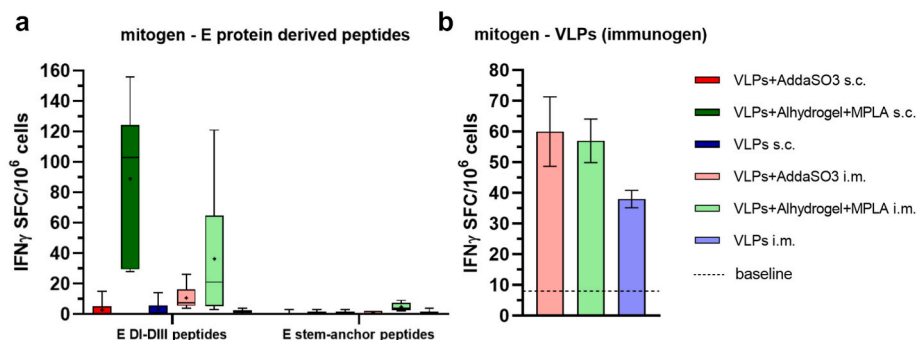


Fig. 2. Analysis of cellular response to E protein derived peptides and VLPs used as an immunogen by IFN- γ ELISPOT. **a** Box plot diagram of IFN- γ spot-forming cells (SFC) per 10^6 mouse splenocytes. Splenocytes from six individual BALB/c mice per immunized group were stimulated with pools of 15-mer overlapping peptides covering ectodomain and stem-anchor regions of E protein (2 μ g/mL). The box region is the 25 to 75th percentile and whiskers are min. and max. values; the horizontal line indicates the median value and + indicates the mean value. **b** Column diagram of IFN- γ spot-forming cells (SFC) per 10^6 mouse splenocytes. Splenocytes from six immunized BALB/c mice per group were pooled together and stimulated with *Leishmania*-derived VLPs (10 μ g/mL). Baseline was determined as the mean value for all control groups.

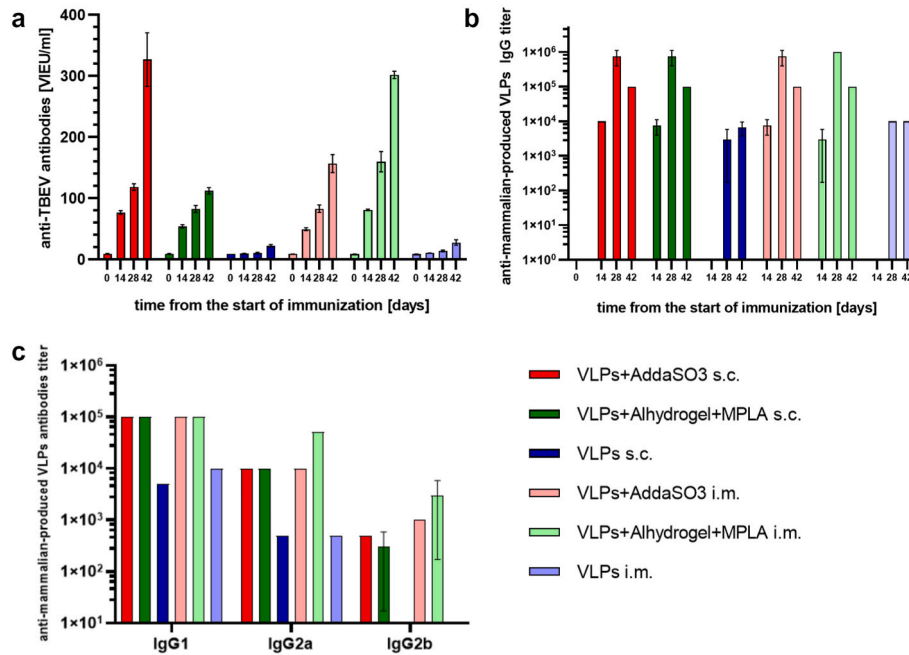


Fig. 3. Analysis of the humoral response after immunization with *Leishmania*-derived VLPs in BALB/c mice. **a** The concentration of anti-TBEV antibodies in mouse sera before prime immunization and after each dose based on the standard curve. **b** The antibody endpoint titers against mammalian-derived VLPs (10 µg/mL) in mouse sera before prime immunization and after every dose. **c** The antibody endpoint titers of different IgG classes against mammalian-derived VLPs (10 µg/mL) in mouse sera in the 42nd day after prime immunization. The antibody endpoint titer was calculated as the highest dilution for which the mean absorbance value is greater than twice the mean absorbance value in the same dilution of serum of the corresponding control group (b, c). All data represent the values from two independent experiments performed in triplicate.

and IgG2b levels were higher in the adjuvanted groups compared to groups immunized only with VLPs. IgG1 antibody titers were higher than other IgG titers for all groups, indicating that the immune response is shifted towards Th2 response. For the adjuvanted groups, IgG2a level was the same, except for Alhydrogel®+MPLA in i.m. administration for each it was elevated compared to other groups and closer to the level of IgG1. IgG2b antibodies were only detected in adjuvanted groups. Their level did not differ much between different adjuvants, however, for both adjuvants, it was higher in i.m. than in s.c. administration. IgG3 antibodies were not detected in any group (data not shown). Overall, the most balanced type of response was present in the group immunized with Alhydrogel®+MPLA in i.m. administration and the obtained results emphasize the role of adjuvants in shaping the immune response profile.

Furthermore, we analyzed the avidity of antibodies directed against mammalian-derived VLPs to further characterize the immune response. We performed ELISA with KSCN as a chaotropic agent using sera collected after the final dose of immunization (Fig. 4). In all adjuvanted groups, the avidity was very high, reaching 100%, regardless of the type of adjuvant or route of administration. However, in the groups immunized without any adjuvant, the avidity was much lower, below 50%.

3.3. Virus neutralization

Finally, we analyzed the neutralizing potential of antibodies elicited by immunization in different groups. Three different strains of TBEV were used for this experiment (Fig. 5). In non-adjuvanted groups, the titer of neutralization was above the baseline based on control groups; however, it was still below 1:20, which was considered the lowest positive result, confirming that the presence of adjuvant is necessary to provide a sufficient level of immune response. In adjuvanted groups, the neutralization titer was higher in i.m. administration for all virus subtypes and depended more on the route of administration than the adjuvant type. The highest titers of neutralization were detected for both adjuvants in i.m. administration for Neudorfl strain. Interestingly, in s.c.

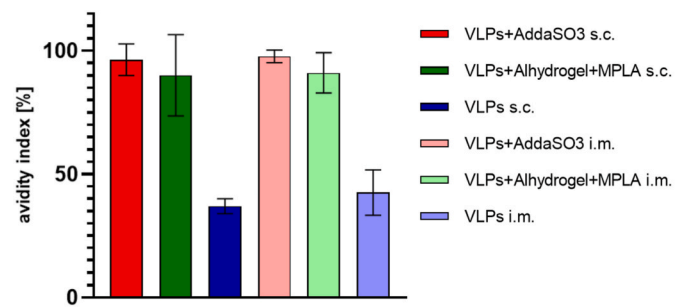


Fig. 4. The avidity of IgG antibodies directed against TBEV VLPs. The avidity ELISA was conducted using KSCN solution to measure the binding strength of IgGs in the sera from the day 42nd after first immunization to mammalian-derived VLPs. The avidity index was calculated as a ratio of sample treated with KSCN solution to non-treated sample and expressed as a percentage. The data represent the values from two independent experiments performed in triplicate.

administration, the neutralization titers were higher for Hypr strain, despite immunization with VLPs based on Neudorfl strain. The lowest neutralizing potential of postimmunization sera was detected for 9001 strain; however, in adjuvanted groups, it was still above 1:20, indicating the potential for virus neutralization during infection.

Overall, the results from all performed analyzes indicate that the VLPs exhibit the highest potential as a vaccine antigen if combined with Alhydrogel® and MPLA in i.m. administration, compared to other groups. Both antibody level and the sera neutralization titer were also higher than in our previous study, where VLPs were used for immunization in combination with AddaVax™ in s.c. administration (Zimna et al., 2023). T-cell response was also present, which has not been detected previously. As the vaccination in the previous study was effective in the challenge experiment and provided complete protection from infection, we believe that the proposed variant of immunization

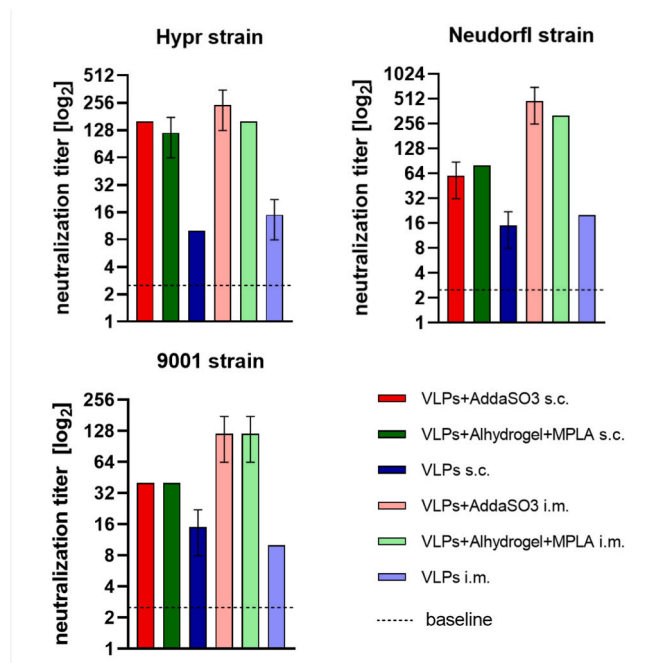


Fig. 5. TBEV neutralization assay. Virus neutralization test was conducted with sera collected from immunized mice on day 42 post-primary immunization. The neutralizing capacity of the sera against three different TBEV strains (Hypr, Neudorf, and 9001) was assessed. The highest serum dilution inhibiting the virus's cytopathic effect was identified as the endpoint titer. The data represent mean values derived from a single experiment conducted in duplicate. Baseline was determined as the mean value for all control groups.

would also be effective in such experiment. Considering all the data, we believe that proposed vaccine may yield optimum results in providing a balanced immune response and eliciting high titers of neutralizing antibodies.

4. Discussion

Recombinant vaccines present a promising solution to the limited use of inactivated vaccines against TBEV in endemic areas with low vaccination coverage. Our previous study demonstrated that a potential recombinant vaccine, leveraging TBEV VLPs produced in the *L. tarentolae* system, offers a cost-effective and easily producible candidate with remarkable efficacy in protecting against TBEV infections (Zimna et al., 2023). Here, our research concentrates on identifying the most effective adjuvant and administration route to elicit an optimal immune response. Given the significance of a balanced Th1/Th2 immune response for adequate protection, we employed adjuvants designed to stimulate both response types (Howard et al., 2022; Newton et al., 2016). While the role of cellular response in TBEV remains incompletely understood, existing studies suggest that relying solely on humoral response may not suffice to prevent the virus from infecting the CNS (Dörrbecker et al., 2010). Additionally, studies indicate that an excessively robust inflammatory response might facilitate the invasion of the CNS. Consequently, maintaining a delicate balance between Th1 and Th2 responses becomes even more crucial in the context of TBEV infection (Bogovič et al., 2019).

Previous analyses, as well as our present study, consistently demonstrate that the magnitude and nature of the immune response are profoundly influenced by the choice and type of adjuvant. While VLPs alone elicited an immune response, the addition of an adjuvant significantly enhanced the response. Intriguingly, the impact of the same adjuvant varied depending on the route of administration. This underscores the importance of considering the route of vaccine

administration in conjunction with adjuvant selection, as numerous studies emphasize its role in shaping the immune response during vaccine development (Durando et al., 2011; Mohanan et al., 2010; Schmidt et al., 2016). In this context, the incorporation of an adjuvant not only elevated the magnitude of the immune response but also contributed to a more favorable equilibrium between Th1 and Th2 responses. Moreover, it exerted a discernible impact on the quality of antibodies generated post-immunization, markedly enhancing their avidity. The heightened avidity of antibodies holds significance not only for heightened protection but also for the sustenance of a more enduring immune response (Bachmann et al., 1997; Tsai et al., 2013).

Our findings also reveal that the neutralization titer does not necessarily align with the highest antibody levels in the same groups. For instance, the group with the AddaS03™ adjuvant in s.c. administration exhibited a much higher antibody level than the group with the same adjuvant in intramuscular i.m. administration. However, the neutralization titer was higher after i.m. administration. Similarly, the level of antibodies in s.c. administration was much higher than in our previous study with a similar adjuvant, AddaVax™, also in s.c. administration, but there was no significant difference in the neutralization titer. This suggests that a significant portion of the antibodies induced by immunization with AddaS03™ in s.c. administration may not be neutralizing or may not have a strong affinity towards the virus.

Regarding the induction of Th1 response, the most robust results were obtained for the combination of Alhydrogel® and MPLA in both tested routes of administration. IFN- γ production was slightly higher in s.c. administration. After i.m. administration with this adjuvant, the levels of IgG2a and 2b were slightly higher than in other adjuvanted groups, which may suggest that the response was more shifted towards Th1 type (and thus better balanced with Th2). However, in neither case, the difference was statistically significant. All the presented results affirm the high utility of *Leishmania*-derived VLPs as a vaccine antigen for preventing TBEV infections. To ensure a high level of immune response and its proper balance, the use of an adjuvant is necessary. After considering all the presented data, we believe that the most effective adjuvant is the combination of Alhydrogel® and MPLA administered intramuscularly. This immunization variant resulted in a high titer of antibodies with high avidity, a high titer of virus neutralization, and the most balanced immune response. The detection of an IFN- γ response in the ELISPOT test, along with the analysis of antibody isotypes, confirmed a better balance between Th1 and Th2 response than in the other immunization variants. Therefore, we consider this variant as an ideal candidate for a prophylactic vaccination against TBEV.

Funding

This work was funded by the National Science Centre, Poland [grant number 2015/19/D/NZ6/01717]; and Ministry of Education and Science of Poland [grant number MNiSW/2020/317/DIR]. JS and DR were supported from EEA and Norway Grants Fund for Regional Cooperation (project number 2018-1-0659).

CRediT authorship contribution statement

Marta Zimna: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Gabriela Brzuska:** Investigation, Data curation. **Jiří Salát:** Investigation, Formal analysis, Data curation. **Daniel Růžek:** Writing – review & editing, Supervision, Methodology, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Ewelina Krol:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

References

- <https://www.invivogen.com/addas03-adjuvant> [WWW Document], n.d.
- <https://www.invivogen.com/alhydrogel> [WWW Document], n.d.
- Bachmann, M.F., Kalinke, U., Althage, A., Freer, G., Burkhart, C., Roost, H.P., Aguet, M., Hengartner, H., Zinkernagel, R.M., 1997. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 276, 2024–2027. <https://doi.org/10.1126/science.276.5321.2024>.
- Barrows, N.J., Campos, R.K., Liao, K.C., Prasanth, K.R., Soto-Acosta, R., Yeh, S.C., Schott-Lerner, G., Pompon, J., Sessions, O.M., Bradrick, S.S., Garcia-Blanco, M.A., 2018. Biochemistry and Molecular Biology of flaviviruses. *Chem. Rev.* 118, 4448–4482. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00719>.
- Bogović, P., Lusa, L., Korva, M., Pavletić, M., Rus, K.R., Lotrić-Furlan, S., Avšič-županc, T., Strle, K., Strle, F., 2019. Inflammatory immune responses in the pathogenesis of tick-borne encephalitis. *J. Clin. Med.* 8, 1–16. <https://doi.org/10.3390/jcm8050731>.
- Brzuska, G., Zimna, M., Baranska, K., Szweczyk, B., Strakova, P., Ruzek, D., Krol, E., 2023. The influence of adjuvant type on the immunogenicity of RBD/N Cocktail antigens as a vaccine candidate against SARS-CoV-2 virus. *Microbiol. Spectr.* 11, 1–14. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02564-22>.
- Cimica, V., Galarza, J.M., 2017. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clin. Immunol.* 183, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2017.08.004>.
- Didierlaurent, A.M., Morel, S., Lockman, L., Giannini, S.L., Bisteau, M., Carlsen, H., Kielland, A., Vosters, O., Vanderheyde, N., Schiavetti, F., Larocque, D., Mechelen, M. Van, Garc, N., 2017. AS04, an aluminum Salt- and TLR4 Agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901474>.
- Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M., Pfeffer, M., 2011. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill.* 16 <https://doi.org/10.2807/ese.16.39.19976-en>.
- Dörbbecker, B., Doblér, G., Spiegel, M., Hufert, F.T., 2010. Tick-borne encephalitis virus and the immune response of the mammalian host. *Travel Med. Infect. Dis.* 8, 213–222. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.05.010>.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999. Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28, 882–890.
- Durando, P., Iudici, R., Alicino, C., Alberti, M., De Florentis, D., Ansaldi, F., Icardi, G., 2011. Adjuvants and alternative routes of administration towards the development of the ideal influenza vaccine. *Hum. Vaccin.* 7, 29–40. <https://doi.org/10.4161/hv.7.0.14560>.
- Ellebedy, A.H., Ahmed, R., 2016. Antiviral Vaccines: Challenges and Advances. *Vaccine B*, second ed., pp. 283–310. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802174-3.00015-1>
- Fares, W., Dachraoui, K., Cherni, S., Barhoumi, W., Slimane, T. Ben, Younsi, H., Zhioua, E., 2021. Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks, Tunisia. *Ticks Tick. Borne. Dis* 12, 101606. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101606>.
- Garçon, N., Vaughn, D.W., Didierlaurent, A.M., 2012. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert Rev. Vaccines* 11, 349–366. <https://doi.org/10.1586/erv.11.192>.
- Giannini, S.L., Hanon, E., Moris, P., Mechelen, M. Van, Morel, S., Dessy, F., Fourneau, M. A., Colau, B., Suzich, J., Losonsky, G., Dubin, G., Wettendorff, M.A., 2006. Enhanced Humoral and Memory B Cellular Immunity Using HPV16/18 L1 VLP Vaccine Formulated with the MPL/Aluminium Salt Combination (AS04) Compared to Aluminium Salt Only, 24, pp. 5937–5949. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.005>.
- Howard, F.H.N., Kwan, A., Winder, N., Mughal, A., Collado-Rojas, C., Muthana, M., 2022. Understanding immune responses to viruses—Do underlying Th1/Th2 cell biases predict outcome? *Viruses* 14. <https://doi.org/10.3390/v14071493>.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like Receptor Control of the Adaptive Immune Responses, vol. 5, pp. 987–995. <https://doi.org/10.1038/ni1112>.
- Ko, E.J., Kang, S.M., 2018. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* 14, 3041–3045. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1495301>.
- Lehrer, A.T., Holbrook, M.R., 2011. Tick-borne encephalitis virus vaccines. *J. Bioterror. Biodef.* 2011, 773–788. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0090-5.00011-2>.
- Mansbridge, C.T., Osborne, J., Holding, M., Dryden, M., Aram, M., Brown, K., Sutton, J., 2022. Autochthonous tick-borne encephalitis in the United Kingdom: a second probable human case and local eco-epidemiological findings. *Ticks Tick. Borne. Dis* 13, 101853. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101853>.
- Mohanan, D., Slütter, B., Henriksen-Lacey, M., Jiskoot, W., Bouwstra, J.A., Perrie, Y., Kündig, T.M., Gander, B., Johansen, P., 2010. Administration routes affect the quality of immune responses: a cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *J. Control. Release* 147, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.012>.
- Morel, S., Didierlaurent, A., Bourguignon, P., Delhaye, S., Baras, B., Jacob, V., Planty, C., Elouahabi, A., Harvengt, P., Carlsen, H., Kielland, A., Chomez, P., Garçon, N., Van Mechelen, M., 2011. Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* 29, 2461–2473. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.01.011>.
- Newton, A.H., Cardani, A., Braciale, T.J., 2016. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin. Immunopathol.* 38, 471–482. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0558-0>.
- O'Hagan, D.T., Ott, G.S., Van Nest, G., 1997. Recent advances in vaccine adjuvants: the development of MF59 emulsion and polymeric microparticles. *Mol. Med. Today* 3, 69–75. [https://doi.org/10.1016/S1357-4310\(96\)10058-7](https://doi.org/10.1016/S1357-4310(96)10058-7).
- O'Hagan, D.T., Ott, G.S., Van Nest, G., Rappuoli, R., Del Giudice, G., 2013. The history of MF59® adjuvant: A phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev. Vaccines* 12, 13–30. <https://doi.org/10.1586/erv.12.140>.
- Pierson, T.C., Diamond, M.S., 2018. The continued emerging threat of flaviviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>.
- Rachel Skinner, S., Apter, D., De Carvalho, N., Harper, D.M., Konno, R., Paavonen, J., Romanowski, B., Roteli-Martins, C., Burlet, N., Mihalyi, A., Struyf, F., 2016. Human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for the prevention of cervical cancer and HPV-related diseases. *Expert Rev. Vaccines* 15, 367–387. <https://doi.org/10.1586/14760584.2016.1124763>.
- Schmidt, S.T., Khadke, S., Korsholm, K.S., Perrie, Y., Rades, T., Andersen, P., Foged, C., Christensen, D., 2016. The administration route is decisive for the ability of the vaccine adjuvant CAF09 to induce antigen-specific CD8⁺ T-cell responses: the immunological consequences of the biodistribution profile. *J. Control. Release* 239, 107–117. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.034>.
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., Sun, B., 2019. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* 37, 3167–3178. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.04.055>.
- Stanisic, D.L., Good, M.F., 2023. Malaria vaccines: progress to date. *BioDrugs* 37, 737–756. <https://doi.org/10.1007/s40259-023-00623-4>.
- Tang, J., Fu, M., Xu, C., Xue, B., Zhou, A., Chen, S., Zhao, H., Zhou, Y., Chen, J., Yang, Q., Chen, X., 2023. Development of a novel virus-like particle-based vaccine for preventing tick-borne encephalitis virus infection. *Viro. Sin.* 38, 767–777. <https://doi.org/10.1016/j.virs.2023.06.003>.
- Tsai, W.-Y., Lai, C.-Y., Wu, Y.-C., Lin, H.-E., Edwards, C., Jumnainsong, A., Kliks, S., Halstead, S., Mongkolsapaya, J., Sreanont, G.R., Wang, W.-K., 2013. High-avidity and potentially neutralizing cross-reactive human monoclonal antibodies derived from secondary dengue virus infection. *J. Virol.* 87, 12562–12575. <https://doi.org/10.1128/jvi.00871-13>.
- Tsoumani, M.E., Papailia, S.I., Papageorgiou, E.G., Voyiatzaki, C., 2023. Climate change impacts on the prevalence of tick-borne diseases in Europe 18. In: <https://doi.org/10.3390/envirosciproc2023026018>.
- <https://www.invivogen.com/mpla-vaccigrade> [WWW Document], n.d.
- Wilkins, A.L., Kazmin, D., Napolitani, G., Clutterbuck, E.A., Pulendran, B., Siegrist, C.A., Pollard, A.J., 2017. AS03- and MF59-adjuvanted influenza vaccines in children. *Front. Immunol.* 8 <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01760>.
- World Health Organization, 2017. *Global Vector Control Response 2017-2030*.
- Yoshii, K., 2019. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* 81, 343–347. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0373>.
- Yoshii, K., Goto, A., Kawakami, K., Kariwa, H., Takashima, I., 2008. Construction and application of chimeric virus-like particles of tick-borne encephalitis virus and mosquito-borne Japanese encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* 89, 200–211. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82824-0>.
- Yun, S.M., Jeong, Y.E., Wang, E., Lee, Y.J., Han, M.G., Park, C., Lee, W.J., Choi, W.Y., 2014. Cloning and expression of recombinant tick-borne encephalitis virus-like particles in *Pichia pastoris*. *Osong Public Heal. Res. Perspect.* 5, 274–278. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.08.005>.
- Zimna, M., Brzuska, G., Salát, J., Svoboda, P., Baranska, K., Szweczyk, B., Růžek, D., Krol, E., 2023. Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on Leishmania-derived virus-like particles. *Antiviral Res* 209. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511>.

8. Podsumowanie badań

8.1. Produkcja i charakterystyka VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym *L. tarentolae*

Wyniki przedstawione w publikacji P2 potwierdziły po raz pierwszy, że system ekspresyjny *L. tarentolae* pozwala na uzyskanie funkcjonalnych VLPs TBEV. VLPs złożone były z białek E i prM/M TBEV, które posiadają zdolność tworzenia VLPs po wspólnej ekspresji genów białek w komórkach eukariotycznych. Konstrukt prMP2AE (P2 Fig.1), zawierający geny obu białek, wprowadzono do komórek *L. tarentolae* i otrzymano linię stabilną. Geny TBEV pochodziły ze szczepu Neudoerfl, należącego do subtypu europejskiego. Naturalna sekwencja sygnałowa białka prM została zastąpiona przez sekwencję sygnałową dla fosfatazy LMSAP1 z gatunku *L. mexicana* w celu zwiększenia poziomu sekrecji rekombinowanych białek. Dodatkowo pomiędzy sekwencje genów białek prM i E wprowadzono sekwencję peptydu P2A ze świńskiego teschowirusa-1, aby ułatwić rozdzielanie białek i wydajne tworzenie VLPs (P2 Fig. S1).

Produkcja i sekrecja obu białek w komórkach *L. tarentolae* została potwierdzona przy wykorzystaniu metody western blotting (P2 Fig 2). Masa cząsteczkowa białka E wynosiła zgodnie z oczekiwaniami około 50 kDa. Dla białka prM/M zaobserwowano dwie formy przy 17–20 kDa, co wskazało na prawdopodobnie niepełne odcinanie fragmentu pr od białka M, a więc niepełne dojrzewanie cząstek. Ze względu na wysoki poziom sekrecji obu białek do dalszych analiz wykorzystano pożywkę hodowlaną. We frakcji tej znajduje się mniej zanieczyszczeń niż we frakcji komórkowej, co przyczynia się do wyższej czystości uzyskiwanych VLPs. Cząstki w pożywce hodowlanej charakteryzują się również wyższym poziomem homogenności niż we frakcji komórkowej.

Kolejne przeprowadzone analizy potwierdziły, że uzyskiwane rekombinowane białka składają się w VLPs. Jedną z zastosowanych metod było ultrawierowanie w gradiencie gęstości sacharozy i badanie wrażliwości na detergent (Triton X-100) (P2 Fig. 3ab). Wykazało ono, że oba produkowane białka TBEV znajdują się w tej samej frakcji, której gęstość odpowiada gęstości wyporu VLPs TBEV. Natomiast w przypadku próbki traktowanej detergentem przed nałożeniem na gradient gęstości sacharozy oba białka zostały wykryte we frakcjach o niższej gęstości, co sugeruje, że struktura VLPs złożonych z białek TBEV zakotwiczonych w błonach została zakłócona. Barwienie zebranych frakcji rozdzielonych w żelu poliakrylamidowym za pomocą Coomassie wykazało, że ultrawierowanie w gradiencie gęstości umożliwiło oczyszczenie VLPs (P2 Fig. 3c). Przeprowadzone badania wykazały również wysoką

wydajność produkcji, na poziomie 7-10 mg białka na 1 litr hodowli w skali laboratoryjnej. Wskazuje to na wysoki potencjał do przeniesienia na skalę przemysłową i wydajnej produkcji preparatu szczepionkowego.

Transmisyjna mikroskopia elektronowa potwierdziła obecność kulistych cząstek o średnicy około 50–60 nm, a więc odpowiadających rozmiarom VLPs TBEV (P2 Fig. 3d). Natomiast wykorzystanie znakowania typu Immunogold ze specyficznymi przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku E potwierdziło, że są to struktury VLPs TBEV. Wysoki poziom rozpoznania przez przeciwciała neutralizujące TBEV wskazał również, że uzyskane VLPs mogą posiadać wysoki potencjał immunogeny. Analiza śledzenia nanocząstek (NTA, ang. *nanoparticles tracking analysis*) wykazała jednorodny rozkład wielkości cząstek, ze średnią średnicą hydrodynamiczną $159,5 \pm 2,0$ nm, co wskazuje na prawidłowe tworzenie się VLPs (P2 Fig. 3e). Podobne cząstki nie zostały wykryte w pożywce z *L. tarentolae* bez wprowadzonych genów TBEV (P2 Fig. S2). Ponadto ocena stabilności wykazała jedynie nieznaczne zmiany w rozkładzie cząstek po 18 miesiącach przechowywania w temperaturze 4°C, co sugeruje długoterminową stabilność VLPs (P2 Fig. 3f). W cząstkach przechowywanych przez długi okres w 4°C nie zaobserwowano też zmian w teście ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*), analizie western blotting, ani barwieniu Coomassie (P2 Fig. S3) w porównaniu ze świeżo przygotowanym preparatem.

Oczyszczone VLPs zostały poddane analizom funkcjonalnym w celu oceny ich właściwości antygenowych i stanu glikozylacji. Testy ELISA wykorzystujące specyficzne przeciwciała monoklonalne (4G2 i 19/1786) przeciwko białku E i surowicę poliklonalną anti-prM ujawniły odrębne wzorce rozpoznawania (P2 Fig. 4a). Przeciwciało 19/1786, posiadające zdolność neutralizacji TBEV, wykazywało silne wiązanie z VLPs, co wskazuje na prawidłową konformację glikoproteiny E. Rozpoznanie przez surowicę skierowaną przeciwko białku prM było znacznie słabsze (mimo silnego rozpoznania w analizie western blotting), co sugeruje, że uzyskane VLPs mogą być częściowo dojrzałe lub stanowić mieszaninę dojrzałych i niedojrzałych cząstek. Podobnie niski poziom rozpoznania cząstek przez przeciwciało 4G2 może sugerować maskowanie pętli fuzyjnej przez białko prM (a więc niepełne lub brak odcięcia fragmentu pr) lub jej ukrycie w strukturze VLPs.

N-glikozylacja białek prM/M i E, została potwierdzona przez traktowanie endoglikozydazą PNGazą F (P2 Fig. 4b). Analiza western blotting wykazała zmianę masy cząsteczkowej po obróbce enzymatycznej, potwierdzając obecność reszt cukrowych w obu białkach. Co więcej, traktowanie PNGazą F miało wpływ na obie formy białka prM/M, co potwierdziło obecność fragmentu pr lub nieprzeciętego białka prM. Pomimo tego, uzyskane

dane dotyczące wysokiej wydajności produkcji i analizy funkcjonalnej sugerują, że VLPs wykazują znaczny potencjał do zastosowania jako immunogen.

8.2. Ocena immunogenności VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym

L. tarentolae

Kolejnym etapem badań była ocena immunogenności uzyskanych VLPs w modelu zwierzęcym. W tym celu grupa 6 myszy BALB/c została zaszczepiona trzema dawkami VLPs (10 µg na dawkę) w połączeniu z adiuwantem AddaVax™, opartym na nanoemulsji skwalenu w wodzie. Immunizacja została wykonana podskórnie, a poszczególne dawki podane zostały w odstępach 14 dni. Grupa kontrolna została zaszczepiona według takiego samego schematu, jednak zamiast VLPs otrzymała sam adiuwant. Uzyskane surowice zostały wykorzystane do oceny odpowiedzi humoralnej za pomocą testów ELISA oraz zdolności neutralizacji TBEV.

Przeprowadzone testy ELISA oparte były na VLPs TBEV oraz białku E TBEV produkowanych w komórkach ssaczych (P2 Fig. 5ab). W oby wypadkach miana przeciwciał w grupie eksperymentalnej po pełnej immunizacji sięgały 1×10^5 . Poziom przeciwciał w grupie eksperymentalnej zaczął znacznie wzrastać po podaniu drugiej dawki, podczas gdy grupa kontrolna wykazywała tylko minimalne zmiany, które najprawdopodobniej wynikały z podania adiuwantu. Porównywalne poziomy przeciwciał przeciwko obu antygenom w teście ELISA sugerowały, że dominujące były przeciwciała skierowane przeciwko białku E. Do oceny poziomu przeciwciał po immunizacji został wykorzystany również komercyjny test ELISA oparty na inaktywowanym wirusie (P2 Fig. 5c). W grupie eksperymentalnej stężenie przeciwciał przeciwko TBEV wyniosło 55 VIEU/ml, natomiast w grupie kontrolnej 5 VIEU/ml.

Uzyskane surowice poszczepienne wykorzystano też do oceny ich właściwości neutralizujących TBEV (we współpracy z Veterinary Research Institute, Brno). Surowica z grupy eksperymentalnej neutralizowała TBEV szczepu Hypr (subtyp europejski) do rozcieńczenia 1:160, podczas gdy surowica z grupy kontrolnej nie wykazywała potencjału neutralizacyjnego względem TBEV.

Ostatecznym eksperymentem potwierdzającym skuteczność immunizacji za pomocą opisanych VLPs był eksperyment typu *challenge* (P2 Fig. 6) przeprowadzony również we współpracy z Veterinary Research Institute, Brno. Myszy BALB/c zostały zaszczepione według opisanego wyżej schematu, a następnie podano im letalną dawkę wirusa. Zwierzęta po infekcji były poddawane obserwacji przez 28 dni. W grupie badanej nie zaobserwowano żadnych objawów infekcji, natomiast w grupie kontrolnej między szóstym a jedenastym dniem

od infekcji wszystkie myszy zaczęły wykazywać objawy neurologiczne i zostały poddane eutanazji. Eksperyment ten potwierdził, że immunizacja za pomocą uzyskanych VLPs TBEV w połączeniu z adiuwantem AddaVax™ zapewnia pełną ochronę przed infekcją TBEV.

Podsumowując, VLPs TBEV produkowane w *L. tarentolae* wykazały wysoką immunogenność, wywołując silną produkcję przeciwciał neutralizujących i zapewniając pełną ochronę przed infekcją TBEV.

8.3. Wpływ adiuwantu i drogi podania na immunogenność VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym *L. tarentolae*

Po potwierdzeniu skuteczności immunizacji za pomocą opisanych VLPs, kolejnym etapem było zbadanie wpływu adiuwantów oraz drogi podania preparatu na immunogenność cząstek, tak, aby wybrać optymalną formułację potencjalnej szczepionki. W związku z tym, że poprzednie etapy badań potwierdziły, że immunizacja za pomocą uzyskanych VLPs zapewnia pełną ochronę podczas infekcji w eksperymencie typu *challenge*, na tym etapie badań celem było scharakteryzowanie odpowiedzi immunologicznej dla różnych wariantów immunizacji.

W badaniu wykorzystano ten sam model zwierzęcy, oparty na myszach szczepu BALB/c. Schemat szczepień również obejmował podanie 3 dawek po 10 µg w odstępach 14 dni (P3 Fig. 1). Jako adiuwanty zastosowano AddaS03™ oraz kombinację Alhydrogel®+MPLA. AddaS03™, podobnie jak stosowany wcześniej AddaVax™, jest oparty na nanoemulsji skwalenu w wodzie, jednak zawiera również D- α -tokoferol oraz środek powierzchniowo czynny polisorbit 80 (Tween® 80) zwiększający stabilność. Wzmacnia on zależną od NF- κ B wrodzoną odpowiedź immunologiczną, promując wytwarzanie cytokin i migrację komórek odpornościowych, poprawiając zarówno komórkową, jak i humoralną odpowiedź immunologiczną. Alhydrogel® zwiększa prezentację antygeny przez APC, prowadząc do odpowiedzi Th2, podczas gdy MPLA aktywuje TLR4, indukując odpowiedź Th1 poprzez szlak zależny od NF- κ B. Oba warianty adiuwantów powinny stymulować zarówno odpowiedź humoralną, jak i komórkową, prowadząc do równowagi między nimi. Oprócz grup szczepionych VLPs w połączeniu z opisanymi adiuwantami, analizowano też podanie preparatu zawierającego tylko VLPs, bez żadnego adiuwantu. Wszystkie te formułacje zostały podane w dwóch drogach podania – podskórnej i domięśniowej. Dla każdej z badanych grup utworzono odpowiednią grupę kontrolną, szczepioną według tego samego schematu, odpowiednim adiuwantem/buforem, ale bez VLPs.

Odpowiedź komórkowa była analizowana za pomocą testu ELISPOT wykrywającego IFN- γ (P3 Fig. 2). Splenocyty izolowane ze śledzion myszy po immunizacji stymulowane były za pomocą peptydów pokrywających nachodzące na siebie fragmenty ektodomeny białka E TBEV. Analiza odpowiedzi wykazała, że produkcja IFN- γ stymulowana była jedynie w grupach, którym podawano VLPs w połączeniu z Alhydrogel® + MPLA (P3 Fig 2a). Ta kombinacja adiuwantów stymulowała produkcję IFN- γ w obu drogach podania, jednak przy podaniu podskórnym była ona nieznacznie wyższa. Jako dodatkową analizę dla grup szczepionych domięśniowo splenocyty stymulowano również za pomocą VLPs, które stosowane były do immunizacji (P3 Fig. 2b). W tym wypadku odpowiedź IFN- γ zaobserwowano we wszystkich grupach, jednak w obu grupach adiuwantowanych poziom odpowiedzi był zbliżony i wyższy niż w grupie immunizowanej samymi VLPs.

Odpowiedź humoralna została przeanalizowana za pomocą testu ELISA opartego na VLPs TBEV produkowanych w komórkach ssaczych oraz komercyjnego testu ELISA opartego na inaktywowanym wirusie (P3 Fig. 3). Do analiz wykorzystane zostały końcowe surowice pobrane po podaniu ostatniej dawki, a także surowice pobrane przed szczepieniem i po podaniu każdej dawki, aby określić kinetykę zmian poziomu przeciwciał. Surowice poszczególnych osobników w każdej grupie zostały połączone i w ten sposób wykorzystane we wszystkich przeprowadzonych testach. Wszystkie analizowane grupy wykazywały wzrost poziomu przeciwciał po każdej dawce szczepionki. Po pierwszej dawce poziomy przeciwciał były podobne w grupach adiuwantowanych i bez adiuwantu (P3 Fig. 3ab). Po podaniu kolejnych dawek odnotowano znaczny wzrost poziomu przeciwciał. Szczególnie zauważalny był on w grupach adiuwantowanych, a największe stężenia uzyskano w grupach z adiuwantami AddaS03™ w podaniu podskórnym oraz Alhydrogel®+MPLA w podaniu domięśniowym, przekraczając 300 VIEU/mL. Dla grupy z AddaS03™ w podaniu podskórnym odnotowano największy wzrost poziomu przeciwciał po podaniu ostatniej dawki, był on niemal trzykrotny. W porównaniu z wcześniejszym badaniem, w którym używano adiuwantu AddaVax™, stężenia przeciwciał były znacząco wyższe. W związku z tym, że w poprzednim badaniu immunizacja zapewniała pełną ochronę przed infekcją przy niższych stężeniach przeciwciał, prawdopodobne jest, że przy opisanych nowych formulacjach dwie dawki mogą być wystarczające do zapewnienia pełnej ochrony. W celu dokładniejszego scharakteryzowania odpowiedzi immunologicznej zbadany został również poziom przeciwciał dla poszczególnych klas IgG (P2 Fig. 3c). W grupach adiuwantowanych poziomy przeciwciał IgG1, IgG2a i IgG2b były wyższe niż w grupach bez adiuwantu. Dominujące były przeciwciała klasy IgG1, co wskazuje na przewagę odpowiedzi Th2. W grupie z Alhydrogel®+MPLA w podaniu

domięśniowym poziom IgG2a był wyższy, osiągając poziom zbliżony do IgG1, co wskazywało na lepsze zbalansowanie odpowiedzi Th1/Th2. IgG2b wykryto tylko w grupach adiuwantowanych, a ich poziom był wyższy przy podaniu domięśniowym niż podskórnym. Najbardziej zrównoważoną odpowiedź uzyskano w grupie z adiuwantem Alhydrogel®+MPLA w podaniu domięśniowym, co podkreśla rolę adiuwantów oraz drogi podania preparatu w kształtowaniu odpowiedzi immunologicznej. Przeprowadzona została też ocena poziomu awidności przeciwciał (P3 Fig. 4), która wykazała, że w grupach adiuwantowanych była ona bardzo wysoka, osiągając 100%, niezależnie od rodzaju adiuwantu czy sposobu podania. Natomiast w grupach bez adiuwantu awidność była znacznie niższa, poniżej 50%.

Jako ostatni etap badań przeprowadzona została analiza potencjału neutralizującego przeciwciał z wykorzystaniem trzech różnych szczepów wirusa (P3 Fig 5.) (we współpracy z Veterinary Research Institute, Brno), która wykazała, że w grupach bez adiuwantu miano neutralizacji było poniżej ustalonego progu 1:20, co potwierdziło konieczność stosowania adiuwantu dla uzyskania wystarczającego poziomu odpowiedzi immunologicznej. W grupach adiuwantowanych miano neutralizacji było wyższe przy podaniu domięśniowym dla wszystkich szczepów wirusa, niezależnie od zastosowanego adiuwantu. Wysokie miano neutralizacji we wszystkich adiuwantowanych grupach dla trzech różnych szczepów TBEV wskazują, że przeciwciała powstające w wyniku immunizacji mogą skutecznie neutralizować wirusa podczas infekcji.

Uzyskane wyniki wskazują, że VLPs wykazują największy potencjał jako antygen szczepionkowy w połączeniu z adiuwantem w postaci Alhydrogel®+MPLA w podawaniu domięśniowym, przewyższając inne grupy zarówno pod względem poziomu przeciwciał, jak i miana neutralizacji surowicy. Ta kombinacja wykazała również wyższą skuteczność w porównaniu z poprzednim badaniem z AddaVax™ w podawaniu podskórnym. Dodatkowo, nowe podejście do immunizacji wywołało odpowiedź limfocytów T, która wcześniej nie została wykryta. Wyniki te sugerują, że ten wariant immunizacji z wysokim prawdopodobieństwem byłby równie skuteczny w eksperymencie typu *challenge*, przy jednoczesnym zapewnieniu zrównoważonej odpowiedzi immunologicznej i wysokiego miana przeciwciał neutralizujących.

9. Wnioski końcowe

- System ekspresyjny *Leishmania tarentolae* może być skutecznie wykorzystywany do produkcji funkcjonalnych VLPs TBEV z wysoką wydajnością.
- Uzyskane w tym systemie VLPs są wysoce immunogenne i stymulują produkcję wysokich poziomów przeciwciał neutralizujących wirusa.
- Szczepienie preparatem zawierającym VLPs w połączeniu z adiuwantem zapewnia pełną ochronę przed rozwinięciem objawów infekcji w modelu mysim.
- Zastosowanie adiuwantu znacząco zwiększa poziom odpowiedzi immunologicznej po szczepieniu VLPs TBEV.
- Droga podania antygeny w postaci VLPs ma wpływ na profil odpowiedzi immunologicznej oraz stopień neutralizacji wirusa.
- Profil odpowiedzi immunologicznej różni się w zależności od stosowanego adiuwantu, ale nie wpływa to znacząco na poziom neutralizacji wirusa.
- Cząstki VLPs w połączeniu z tym samym adiuwantem stymulują odpowiedź immunologiczną o różnym profilu w zależności od drogi podania antygeny.
- Najwyższy poziom odpowiedzi immunologicznej z uzyskaniem odpowiedniej równowagi między odpowiedzią humoralną, a komórkową wzbudza immunizacja z użyciem VLPs w połączeniu z kombinacją adiuwantów Alhydrogel®+MPLA w podaniu domięśniowym.
- **VLPs TBEV produkowane w systemie ekspresyjnym *L. tarentolae* są dobrym kandydatem na szczepionkę profilaktyczną przeciwko temu wirusowi.**

10. Literatura

1. Zlobin, V. I., Pogodina, V. V. & Kahl, O. A brief history of the discovery of tick-borne encephalitis virus in the late 1930s (based on reminiscences of members of the expeditions, their colleagues, and relatives). *Ticks Tick. Borne. Dis.* **8**, 813–820 (2017).
2. Kubinski, M. *et al.* Tick-borne encephalitis virus: A quest for better vaccines against a virus on the rise. *Vaccines* **8**, 1–45 (2020).
3. Postler, T. S. *et al.* Renaming of the genus Flavivirus to Orthoflavivirus and extension of binomial species names within the family Flaviviridae. *Arch. Virol.* **168**, 1–7 (2023).
4. Bogovic, P. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J. Clin. Cases* **3**, 430 (2015).
5. Sukhorukov, G. A. *et al.* The Baikal subtype of tick-borne encephalitis virus is evident of recombination between Siberian and Far-Eastern subtypes. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **17**, 1–17 (2023).
6. Dai, X., Shang, G., Lu, S., Yang, J. & Xu, J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China article. *Emerg. Microbes Infect.* **7**, (2018).
7. Slon Campos, J. L., Mongkolsapaya, J. & Screaton, G. R. The immune response against flaviviruses. *Nat. Immunol.* **19**, 1189–1198 (2018).
8. Ruzek, D. *et al.* Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.* **164**, 23–51 (2019).
9. Pustijanac, E. *et al.* Tick-Borne Encephalitis Virus: A Comprehensive Review of Transmission, Pathogenesis, Epidemiology, Clinical Manifestations, Diagnosis, and Prevention. *Microorganisms* **11**, (2023).
10. Yoshii, K. *et al.* A conserved region in the prM protein is a critical determinant in the assembly of flavivirus particles. *J. Gen. Virol.* **93**, 27–38 (2012).
11. Zhang, X. *et al.* Structures and functions of the envelope glycoprotein in flavivirus infections. *Viruses* **9**, 1–14 (2017).
12. Rey, F. A., Heinz, F. X., Mandl, C., Kunz, C. & Harrison, S. C. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* vol. 375 291–298 (1995).
13. Fritz, R. *et al.* The Unique Transmembrane Hairpin of Flavivirus Fusion Protein E Is Essential for Membrane Fusion. *J. Virol.* **85**, 4377–4385 (2011).
14. Füzik, T. *et al.* Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a

- monoclonal antibody. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
15. Goto, A. *et al.* Role of the N-linked glycans of the prM and E envelope proteins in tick-borne encephalitis virus particle secretion. *Vaccine* **23**, 3043–3052 (2005).
 16. Ishida, K., Yagi, H., Kato, Y. & Morita, E. N-linked glycosylation of flavivirus E protein contributes to viral particle formation. *PLoS Pathog.* **19**, 1–26 (2023).
 17. Zhang, Y. *et al.* Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure* **12**, 1607–1618 (2004).
 18. Heinz Franz *et al.* Structural Changes and Functional Control of the Tick-Borne Encephalitis Virus Glycoprotein E by the Heterodimeric Association with Protein prM. *Virology* vol. 198 109–117 (1994).
 19. Schalich, J. *et al.* Recombinant subviral particles from tick-borne encephalitis virus are fusogenic and provide a model system for studying flavivirus envelope glycoprotein functions. *J. Virol.* **70**, 4549–4557 (1996).
 20. Lorenz, I. C. *et al.* Intracellular Assembly and Secretion of Recombinant Subviral Particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *J. Virol.* **77**, 4370–4382 (2003).
 21. Ferlenghi, I. *et al.* Molecular Organization of a Recombinant Subviral Particle from Tick-Borne Encephalitis Virus Henry Wellcome Building for Genomic Medicine. *Mol. Cell* **7**, 593–602 (2001).
 22. Lua, L. H. L. *et al.* Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnol. Bioeng.* **111**, 425–440 (2014).
 23. Heinz, F. X. *et al.* Recombinant and virion-derived soluble and particulate immunogens for vaccination against tick-borne encephalitis. *Vaccine* **13**, 1636–1642 (1995).
 24. Allison, S. L. *et al.* Two Distinct Size Classes of Immature and Mature Subviral Particles from Tick-Borne Encephalitis Virus. *J. Virol.* **77**, 11357–11366 (2003).
 25. Heinz, F. X. & Stiasny, K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* **55**, 289–295 (2012).
 26. Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. & Rossmann, M. G. A structural perspective of the Flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**, 13–22 (2005).
 27. Belova, O. A. *et al.* Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **8**, 895–906 (2017).
 28. Labuda, M., Jones, L. D., Williams, T. & Nuttall, P. A. Enhancement of tick-borne encephalitis virus transmission by tick salivary gland extracts. *Med. Vet. Entomol.* **7**, 193–196 (1993).

29. Ličková, M., Havlíková, S. F., Sláviková, M. & Klempa, B. Alimentary infections by tick-borne encephalitis virus. *Viruses* **14**, (2022).
30. Růžek, D., Dobler, G. & Mantke, O. D. Tick-borne encephalitis: Pathogenesis and clinical implications. *Travel Med. Infect. Dis.* **8**, 223–232 (2010).
31. Achazi, K. *et al.* Rodents as sentinels for the prevalence of tick-borne encephalitis virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **11**, 641–647 (2011).
32. Slovák, M. *et al.* Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **5**, 962–969 (2014).
33. Springer, A., Glass, A., Topp, A. K. & Strube, C. Zoonotic Tick-Borne Pathogens in Temperate and Cold Regions of Europe—A Review on the Prevalence in Domestic Animals. *Front. Vet. Sci.* **7**, 1–21 (2020).
34. Topp, A. K. *et al.* Seroprevalence of tick-borne encephalitis virus in wild and domestic animals in northern Germany. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **14**, 102220 (2023).
35. Jaenson, T. G. T. *et al.* The importance of wildlife in the ecology and epidemiology of the TBE virus in Sweden: Incidence of human TBE correlates with abundance of deer and hares. *Parasites and Vectors* **11**, 1–18 (2018).
36. Omazic, A. *et al.* Dairy milk from cow and goat as a sentinel for tick-borne encephalitis virus surveillance. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **95**, (2023).
37. Bogovic, P., Lotric-Furlan, S. & Strle, F. What tick-borne encephalitis may look like: Clinical signs and symptoms. *Travel Med. Infect. Dis.* **8**, 246–250 (2010).
38. Kohlmaier, B. *et al.* Clinical characteristics of patients with tick-borne encephalitis (Tbe): A european multicentre study from 2010 to 2017. *Microorganisms* **9**, 1–15 (2021).
39. Worku, D. A. Tick-Borne Encephalitis (TBE): From Tick to Pathology. *J. Clin. Med.* **12**, 1–25 (2023).
40. Hansen, M. A., Samannodi, M. S., Castelblanco, R. L. & Hasbun, R. Clinical epidemiology, risk factors, and outcomes of encephalitis in older adults. *Clin. Infect. Dis.* **70**, 2377–2385 (2020).
41. Ali, M. G. *et al.* Recent advances in therapeutic applications of neutralizing antibodies for virus infections: an overview. *Immunol. Res.* **68**, 325–339 (2020).
42. Bogovič, P. *et al.* Comparison of laboratory and immune characteristics of the initial and second phase of tick-borne encephalitis. *Emerg. Microbes Infect.* **11**, 1647–1656 (2022).
43. Howard, F. H. N. *et al.* Understanding Immune Responses to Viruses—Do Underlying

- Th1/Th2 Cell Biases Predict Outcome? *Viruses* **14**, (2022).
44. Garber, C. *et al.* T cells promote microglia-mediated synaptic elimination and cognitive dysfunction during recovery from neuropathogenic flaviviruses. *Nat. Neurosci.* **22**, 1276–1288 (2019).
 45. Carletti, T., Zakaria, M. K. & Marcello, A. The host cell response to tick-borne encephalitis virus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **492**, 533–540 (2017).
 46. Bogovič, P. *et al.* Inflammatory immune responses in the pathogenesis of tick-borne encephalitis. *J. Clin. Med.* **8**, 1–16 (2019).
 47. Elicited, E. & Patel, A. H. Effect of Glycan Shift on Antibodies against Hepatitis C Virus E2. 1–17.
 48. Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M. & Pfeffer, M. Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Eurosurveillance* **16**, (2011).
 49. Angulo, F. J. *et al.* Publicly available surveillance data on tick-borne encephalitis in Europe, 2023. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **15**, 102388 (2024).
 50. Walter, M., Vogelgesang, J. R., Rubel, F. & Brugger, K. Tick-borne encephalitis virus and its European distribution in ticks and endothermic mammals. *Microorganisms* **8**, 1–12 (2020).
 51. Bakker, J. W. *et al.* Differential susceptibility of geographically distinct *Ixodes ricinus* populations to tick-borne encephalitis virus and louping ill virus. *Emerg. Microbes Infect.* **13**, (2024).
 52. Im, J. *et al.* Geographic distribution of Tick-borne encephalitis virus complex. *J. Vector Borne Dis.* **57**, 14–22 (2020).
 53. Sun, R. X. *et al.* Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **8**, 631–639 (2017).
 54. Tkachev, S. E. *et al.* Genetic diversity and geographical distribution of the Siberian subtype of the tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **11**, 101327 (2020).
 55. Hayasaka, D. *et al.* Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia. *J. Gen. Virol.* **82**, 1319–1328 (2001).
 56. Fares, W. *et al.* Tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks, Tunisia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* **12**, 101606 (2021).
 57. Yoshii, K. Epidemiology and pathological mechanisms of tick-borne encephalitis. *J. Vet. Med. Sci.* **81**, 343–347 (2019).
 58. Mansbridge, C. T. *et al.* Autochthonous tick-borne encephalitis in the United Kingdom: A second probable human case and local eco-epidemiological findings. *Ticks Tick.*

- Borne. Dis.* **13**, 101853 (2022).
59. Khamassi Khbou, M. *et al.* Presence of antibodies against tick-borne encephalitis virus in sheep in Tunisia, North Africa. *BMC Vet. Res.* **16**, 1–8 (2020).
 60. Riccardi, N. *et al.* Tick-borne encephalitis in Europe: a brief update on epidemiology, diagnosis, prevention, and treatment. *Eur. J. Intern. Med.* **62**, 1–6 (2019).
 61. Gray, J. S., Dautel, H., Estrada-Peña, A., Kahl, O. & Lindgren, E. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2009**, 1–12 (2009).
 62. Jenkins, V. A., Silbernagl, G., Baer, L. R. & Hoet, B. The epidemiology of infectious diseases in Europe in 2020 versus 2017–2019 and the rise of tick-borne encephalitis (1995–2020). *Ticks Tick. Borne. Dis.* **13**, 101972 (2022).
 63. Lehrer, A. T. & Holbrook, M. R. Tick-borne encephalitis virus vaccines. *J. Bioterror. Biodef.* **2011**, 773–788 (2011).
 64. <https://szczepienia.pzh.gov.pl/szczepionki/kleszczowe-zapalenie-mozgu/>.
 65. Kollaritsch, H. *et al.* The current perspective on tick-borne encephalitis awareness and prevention in six Central and Eastern European countries: Report from a meeting of experts convened to discuss TBE in their region. *Vaccine* **29**, 4556–4564 (2011).
 66. Zepeda-Cervantes, J., Ramírez-Jarquín, J. O. & Vaca, L. Interaction Between Virus-Like Particles (VLPs) and Pattern Recognition Receptors (PRRs) From Dendritic Cells (DCs): Toward Better Engineering of VLPs. *Front. Immunol.* **11**, 1–22 (2020).
 67. Cox, M. M. J. Innovations in the Insect Cell Expression System for Industrial Recombinant Vaccine Antigen Production. *Vaccines* **9**, (2021).
 68. Cid, R. & Bolívar, J. Platforms for production of protein-based vaccines: From classical to next-generation strategies. *Biomolecules* **11**, 1–33 (2021).
 69. Shirbaghaee, Z. & Bolhassani, A. Different applications of virus-like particles in biology and medicine: Vaccination and delivery systems. *Biopolymers* **105**, 113–132 (2016).
 70. Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S. & Kshirsagar, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. *Crit. Rev. Biotechnol.* **36**, 1110–1122 (2016).
 71. Breitling, R. *et al.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein Expr. Purif.* **25**, 209–218 (2002).
 72. Basile, G. & Peticca, M. Recombinant Protein Expression in *Leishmania tarentolae*. *Mol. Biotechnol.* **43**, 273–278 (2009).

73. Dortay, H. & Mueller-Roeber, B. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. *Microb. Cell Fact.* **9**, 1–10 (2010).
74. Panasiuk, M. *et al.* Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe cancer immunotherapy. *J. Nanobiotechnology* **20**, 1–13 (2022).
75. 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**, 1–19 (2020).
76. Bolhassani, A., Shirbaghaee, Z., Agi, E. & Davoudi, N. VLP production in *Leishmania tarentolae*: A novel expression system for purification and assembly of HPV16 L1. *Protein Expr. Purif.* **116**, 7–11 (2015).
77. Varotto-Boccazzi, I. *et al.* Epidemic Preparedness—*Leishmania tarentolae* as an Easy-to-Handle Tool to Produce Antigens for Viral Diagnosis: Application to COVID-19. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
78. Lai, J. Y., Klatt, S. & Lim, T. S. Potential application of *Leishmania tarentolae* as an alternative platform for antibody expression. *Crit. Rev. Biotechnol.* **39**, 380–394 (2019).
79. Ellebedy, A. H. & Ahmed, R. *Antiviral Vaccines: Challenges and Advances. The Vaccine Book: Second Edition* (Elsevier Inc., 2016). doi:10.1016/B978-0-12-802174-3.00015-1.
80. Ko, E. J. & Kang, S. M. Immunology and efficacy of MF59-adjuvanted vaccines. *Hum. Vaccines Immunother.* **14**, 3041–3045 (2018).
81. O’Hagan, D. T., Ott, G. S., Van Nest, G., Rappuoli, R. & Del Giudice, G. The history of MF59® adjuvant: A phoenix that arose from the ashes. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 13–30 (2013).
82. Shi, S. *et al.* Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* **37**, 3167–3178 (2019).
83. Morel, S. *et al.* Adjuvant System AS03 containing α -tocopherol modulates innate immune response and leads to improved adaptive immunity. *Vaccine* **29**, 2461–2473 (2011).
84. Garçon, N., Vaughn, D. W. & Didierlaurent, A. M. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water

- emulsion. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 349–366 (2012).
85. <https://www.invivogen.com/addas03-adjuvant>.
 86. Wilkins, A. L. *et al.* AS03- and MF59-adjuvanted influenza vaccines in children. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
 87. Stanistic, D. I. & Good, M. F. Malaria Vaccines: Progress to Date. *BioDrugs* **37**, 737–756 (2023).
 88. Iwasaki, A. & Medzhitov, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **5**, 987–995 (2004).
 89. <https://www.invivogen.com/alhydrogel>.
 90. Cimica, V. & Galarza, J. M. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clin. Immunol.* **183**, 99–108 (2017).
 91. Rachel Skinner, S. *et al.* Human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine for the prevention of cervical cancer and HPV-related diseases. *Expert Rev. Vaccines* **15**, 367–387 (2016).
 92. Didierlaurent, A. M. *et al.* AS04, an Aluminum Salt- and TLR4 Agonist-Based Adjuvant System, Induces a Transient Localized Innate Immune Response Leading to Enhanced Adaptive Immunity. *J. Immunol.* **183**, 6186–6197 (2009).
 93. Giannini, S. L. *et al.* Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16 / 18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL / aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. **24**, 5937–5949 (2006).
 94. D’Amico, C., Fontana, F., Cheng, R. & Santos, H. A. Development of vaccine formulations: past, present, and future. *Drug Deliv. Transl. Res.* **11**, 353–372 (2021).

11. Inne osiągnięcia naukowe

11.1. Publikacje naukowe niebędące częścią rozprawy

- Brzuska, G., Zimna, M., Barańska, K., Szewczyk, B., Strakova, P., Ruzek, D., Krol, E. (2023). The Influence of Adjuvant Type on the Immunogenicity of RBD/N Cocktail Antigens as a Vaccine Candidate against SARS-CoV-2 Virus. *Microbiology spectrum*, 11(3), e0256422. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02564-22>

11.2. Konferencje naukowe

- Zimna M.*, Brzuska G., Salát J., Svoboda P., Barańska K., Szewczyk B., Růžek D., Krol E. „Leishmania-derived virus-like particles as a potential vaccine antigen against tick-borne encephalitis virus.” 8th European Congress of Virology, 4-7 maja 2023, Gdańsk (wystąpienie ustne)
 - Zimna M.*, Brzuska G., Salát J., Svoboda P., Barańska K., Szewczyk B., Růžek D., Krol E. „Functional characterization and immunogenicity of a new tick-borne encephalitis virus vaccine candidate based on Leishmania-derived virus-like particles.” 8th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH, 20-22 czerwca 2022, Kraków (wystąpienie ustne)
- (*) autor prezentujący

11.3. Patenty

- Krol E., Zimna M., Brzuska G., Szewczyk B., Boch-Kminikowska S.; Rekombinowana cząstka wirusopodobna kleszczowego zapalenia mózgu oraz jej zastosowanie medyczne; Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej, Pat.244794; przyznano 5 grudnia 2023

11.4. Zgłoszenia patentowe

- Krol E., Zimna M., Brzuska G., Szewczyk B., Boch-Kminikowska S.; Amino acid sequence of recombinant tick-borne encephalitis virus-like particles and their use as a vaccine antigen for prevention of tick-borne encephalitis virus infections; Europejski Urząd Patentowy, EP22173183.9; data zgłoszenia – 13 maja 2022

11.5. Granty naukowe

- Grant uzyskany w ramach konkursu UGrants–start (Program małych grantów – UGrants) (2021). Opracowanie modyfikowanych, rekombinowanych cząstek wirusopodobnych wirusa kleszczowego zapalenia mózgu jako potencjalnego antygenu szczepionkowego.

11.6. Pozostałe nagrody

- Wyróżnienie w konkursie „Eureka! DGP 2024 – Odkrywamy polskie wynalazki” za wynalazek: Rekombinowana cząstka wirusopodobna kleszczowego zapalenia mózgu oraz jej zastosowanie medyczne

12. Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy

place, date *Gdansk, 7.11.2024*

Marta Zimna
Laboratory of Recombinant Vaccines
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of UG & MUG
University of Gdansk
(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- conceptualization,
- data curation,
- data analysis and interpretation,
- funding acquisition,
- investigation and assays: DNA sequences design, cloning, stable cell lines in *L. tarentolae*, VLPs production in *L. tarentolae*, characterization of VLPs, TEM samples preparation, immunogoldstaining, preparation of samples for mouse immunization, production and purification of VLPs in mammalian cells, analysis of mouse serum antibody titers by ELISA with mammalian-derived VLPs and by a commercial kit.
- methodology,
- visualization,
- writing – original draft,
- writing – review & editing.

Title: **Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2024;228;105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

was as follows:

- writing – review & editing,
- writing – original draft,
- visualization,
- methodology,
- investigation: production and purification of VLPs, preparation of samples for mouse immunization, production and purification of VLPs in mammalian cells, analysis of mouse serum antibody titers by ELISA with mammalian-derived VLPs and by a commercial kit, evaluation of antibodies avidity, ELISPOT assay.
- formal analysis,
- data curation,
- conceptualization.

Title: ***Leishmania tarentolae* as a platform for the production of vaccines against viral pathogens**

Authors: Marta Zimna, Ewelina Król

Published in: *npj Vaccines*, 2024,9:212
<https://doi.org/10.1038/s41541-024-01005-9>

was as follows:

- writing – original draft,
- writing – review & editing.

..........
(signature)

place, date Gdańsk, 07.11.2024

Dr hab. Ewelina Król, prof. UG
Laboratory of Recombinant Vaccines
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of UG & MUG
University of Gdansk
(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- conceptualization,
- data analysis and interpretation,
- funding acquisition,
- project administration,
- supervision,
- writing – original draft,
- writing – review & editing.

Title: **Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2024;228;105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

was as follows:

- writing – review & editing,
- supervision,
- project administration,
- funding acquisition,
- formal analysis,
- conceptualization.

Title: ***Leishmania tarentolae* as a platform for the production of vaccines against viral pathogens**

Authors: Marta Zimna, Ewelina Król

Published in: *npj Vaccines*, 2024,9:212
<https://doi.org/10.1038/s41541-024-01005-9>

was as follows:

- writing – review & editing.



(signature)

place, date .. *Gdańsk 29/10/2024*

Klaudia Barańska
Laboratory of Recombinant Vaccines
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of UG & MUG
University of Gdansk
(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- data curation,
- investigation and assays: E protein purification from mammalian cells, analysis of mouse serum antibody titers by ELISA with E protein.

Klaudia Barańska

(signature)

place, date Gdansk, 28.10.2021

Prof. dr hab. Bogusław Szewczyk
Laboratory of Recombinant Vaccines
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of UG & MUG
University of Gdansk
(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- writing – review & editing.


.....
(signature)

place, date *Gdansk, 29.10.2024*

Dr Gabriela Brzuska
Laboratory of Recombinant Vaccines
Intercollegiate Faculty of Biotechnology of UG & MUG
University of Gdansk
(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- data curation,
- investigation and assays: DNA sequences design, E protein purification from mammalian cells, analysis of mouse serum antibody titers by ELISA with E protein.

Title: **Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2024;228;105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

was as follows:

- data curation,
- investigation: ELISPOT assay.



.....
(signature)

Brno, 24. 10. 2024

prof. RNDr. Daniel Růžek, Ph.D.
Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic
Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic
Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209:105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- conceptualization,
- data analysis and interpretation,
- funding acquisition,
- methodology,
- supervision,
- writing – review & editing.

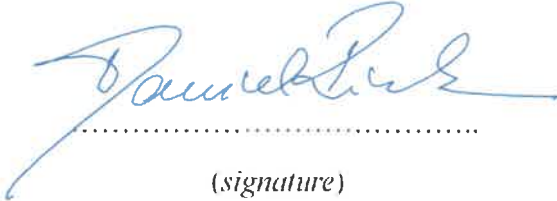
Title: **Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2024;228:105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

was as follows:

- writing – review & editing.
- supervision.
- methodology.
- funding acquisition.
- formal analysis.
- conceptualization.



.....
(signature)

Brno 24. 10. 2024

RNDr. Jiří Salát, Ph.D

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Biology Centre, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- data curation,
- data analysis and interpretation,
- investigation and assays: virus neutralization assay, challenge experiment,

Title: **Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of *Leishmania*-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2024;228;105941.
<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2024.105941>

was as follows:

- investigation: virus neutralization assay,
- formal analysis,
- data curation.



.....
(signature)

Prague, 30. 10. 2024

MVDr. Pavel Svoboda, Ph. D.

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czech Republic

University of Veterinary Sciences Brno, Department of Pharmacology and Pharmacy, Brno, Czech Republic

current address: Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic

(title, name and surname, affiliation)

CO-AUTORSHIP STATEMENT

Here, I declare that my contribution to the publication:

Title: **Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on *Leishmania*-derived virus-like particles**

Authors: Marta Zimna, Gabriela Brzuska, Jiří Salát, Pavel Svoboda, Klaudia Barańska, Bogusław Szewczyk, Daniel Růžek, Ewelina Król

Published in: *Antiviral research*, 2023;209;105511.
doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105511

was as follows:

- data curation,
- data analysis and interpretation,
- investigation and assays: virus neutralization assay, challenge experiment,
- methodology,
- visualization.



.....
(signature)