UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Kraków, 20 marca 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marty Zimnej

Niniejsza recenzja rozprawy doktorskiej została przygotowana w odpowiedzi na pismo Przewodniczącego Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego, dr hab. Mariusza Grinholca z dnia 9 stycznia 2025 roku. Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska „Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen szczepionkowy" została przygotowana przez mgr Martę Zimną pod kierunkiem dr hab. Eweliny Król, prof. UG. Badania zostały przeprowadzone w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Formalny opis rozprawy

Rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej została przygotowana w języku polskim, obejmuje ponad 70 stron i ma spójną oraz logiczną strukturę. Składa się ze streszczenia w języku polskim i angielskim, wykazu skrótów, wprowadzenia, celów badawczych, trzech publikacji stanowiących główne dzieło, podsumowania, wniosków końcowych oraz bibliografii. Należy zauważyć, że zawarcie w spisie treści danych szczegółowych publikacji, włączając w to identyfikatory DOI jest nadmiarowe i obniża jego przejrzystość. Oprócz części merytorycznych w pracy zawarto również informacje dotyczące samej doktorantki oraz jej realnego udziału w poszczególnych pracach.

Ocena merytoryczna

Rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej koncentruje się na produkcji i charakterystyce rekombinowanych cząstek wirusopodobnych (VLPs) wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV), wykorzystując system ekspresyjny oparty na

prof. dr hab. Krzysztof Pyrć
Małopolskie Centrum Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
ul. Gronostajowa 7a, 30-387 Kraków
e-mail: k.a.pyrc@uj.edu.pl
Tel.kom.: [redacted]

komórkach pierwotniaka *Leishmania tarentolae*. Wykorzystanie tego typu organizmów modelowych jest korzystne, ponieważ stanowi sensowny kompromis pomiędzy jakością uzyskiwanego materiału, a wydajnością ekspresji. Chociaż tylko komórki ssacze umożliwiają produkcję białek o identycznych wzorcach glikozylacji jak w natywnych wirusach, to koszt takiej produkcji jest bardzo wysoki, a jej efektywność niska. Praca jest ciekawa ze względu na swoją wartość biotechnologiczną. Jednak tematyka pracy jest istotna także z punktu widzenia ochrony zdrowia publicznego, ze względu na rosnące zagrożenie epidemiologiczne wirusem TBEV, który powoli, ale skutecznie zwiększa swój zasięg terytorialny. Ostatnie doniesienia wskazują, że stał się on powszechny nawet w krajach takich jak Wielka Brytania, gdzie wcześniej nie występował endemicznie. Obecnie dostępne szczepionki wymagają podania trzech dawek w ciągu roku. Taki schemat jest uciążliwy i często przerywany, dlatego wprowadzenie nowych formulacji umożliwiających immunizację np. po podaniu tylko jednej dawki byłoby korzystne.

Przedłożona praca opiera się na trzech publikacjach naukowych, opublikowanych w recenzowanych czasopismach o wysokiej pozycji: jedna praca w NPJ Vaccines oraz dwie prace w Antiviral Research. Publikacja pierwsza ma charakter przeglądowy, wprowadzający platformę ekspresyjną opartą na *L. tarentolae*, podczas gdy dwie pozostałe prace przedstawiają wyniki badań eksperymentalnych związanych z immunogennością VLPs TBEV.

W pierwszej pracy pt. „*Leishmania tarentolae as a platform for the production of vaccines against viral pathogens*” autorka omawia zastosowanie *L. tarentolae* jako nowej platformy do produkcji antygenów wirusowych wykorzystywanych w szczepionkach. Podczas, kiedy tradycyjne systemy ekspresji białek, oparte na komórkach ssaków, drożdży czy bakterii, mają swoje ograniczenia, takie jak wysokie koszty produkcji, potencjalna immunogenność niepożądanych elementów czy trudności w uzyskaniu odpowiednich modyfikacji potranslacyjnych, *L. tarentolae* wydaje się być bezpieczną, niskokosztową i wydajną alternatywą. W pracy przedstawiono przegląd badań dotyczących wykorzystania komórek pierwotniaka do produkcji antygenów pochodzących od patogenów, takich jak wirus grypy, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV), wirus brodawczaka ludzkiego (HPV) czy SARS-CoV-2. Omówiono również możliwość zastosowania *L. tarentolae* jako wektora w szczepionkach żywych. Choć takie zastosowanie wydaje się nieoczywiste, warto

zauważyć, że pierwotniak ten może kierować się do komórek dendrytycznych i tkanek limfatycznych, gdzie efektywnie może stymulować produkcję interferonu gamma (IFN-γ) i indukować silną odpowiedź zależną od limfocytów T. Co ważne, *L. tarentolae* nie namnaża się w komórkach dendrytycznych i ulega szybkiej eliminacji.

Prace doświadczalne obejmują funkcjonalną charakterystykę białek strukturalnych prM i E, ocenę immunologiczną VLPs oraz wpływ adiuwantu na skuteczność potencjalnej szczepionki.

Pierwsza z prac eksperymentalnych, „*Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis virus based on Leishmania-derived virus-like particles*", przedstawia funkcjonalną charakterystykę oraz immunogenność cząsteczek VLP zbudowanych na bazie białek TBEV produkowanych w *L. tarentolae*. W badaniu wykazano, że *L. tarentolae* jest efektywnym i wydajnym systemem do produkcji VLP, które są immunogenne. Rekombinowane białka strukturalne TBEV (prM/M i E) były dobrze rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące w analizach *in vitro*. Immunizacja myszy cząstkami VLP w połączeniu z adiuwantem AddaVax prowadziła do produkcji wysokich poziomów przeciwciał neutralizujących, a eksperyment z materiałem zakaźnym wykazał ochronę przed zgonem związanym z zakażeniem TBEV u myszy. Wyniki sugerują, że VLP pochodzące z opisanego systemu mogą być w przyszłości rozważane jako platforma do opracowania szczepionki dla ludzi.

Druga z prac eksperymentalnych, „*Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of Leishmania-derived tick-borne encephalitis virus-like particles – A recombinant vaccine candidate*", ocenia wpływ rodzaju adiuwantu oraz drogi podania na immunogenność VLPs TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym L. *tarentolae*. W badaniu porównano dwa adiuwanty: AddaS03™ (analog AS03®) oraz kombinacji Alhydrogel® (wodorotlenek glinu) i MPLA (monofosforylowy lipid A, analog AS04®). Szczepionki podawane były podskórnie lub domięśniowo.

Najbardziej optymalnym wariantem spośród przebadanych była immunizacja domięśniowa VLPs z dodatkiem adjuwantu Alhydrogel®+MPLA. Podanie tej formulacji indukowało silną odpowiedź neutralizującą wobec różnych szczepów wirusa, a co ważniejsze profil odpowiedzi Th1/Th2 był korzystny.

Jak wspomniałem, zaprezentowane prace opublikowano w renomowanych czasopismach, w których podlegały rygorystycznej ocenie. Prace są wysokiej jakości i wszystkie wnoszą wartość merytoryczną do dziedziny.

Chociaż bardzo pozytywnie oceniam pracę, zarówno jeżeli chodzi o wstęp, który dostarcza nam kompleksowe wprowadzenie do tematu, jak i same prace naukowe, mam kilka pytań dotyczących meritum pracy.

1. Czy w swojej pracy doktorantka rozważała ryzyko wystąpienia ADE (*antibody-dependent enhancement of infection*) w przypadku zakażeń innymi flawiwirusami? W tym momencie mamy już pierwsze przypadku zakażeń wirusem Zachodniego Nilu w Polsce, a Europa będzie coraz bardziej eksponowana na inne wirusy, takie jak Denga. Czy rozważano testowanie szczepów innych niż europejski? Czy przeprowadzono lub planowane jest przeprowadzenie analizy profilu klas wygenerowanych przeciwciał?
2. Nie do końca zrozumiałe jest dla mnie stwierdzenie dotyczące niskich kosztów. Chociaż muszę się zgodzić, że w przypadku szczepionek VLPs produkowanych w komórkach ssaczych cena będzie nieporównywalnie wyższa, to już szczepionki podjednostkowe, atenuaowane, czy mRNA będą znacznie tańsze w produkcji. Proszę o rozwinięcie tematu.
3. Z czego wynika wyższość zastosowania szczepionek VLPs nad szczepionkami podjednostkowymi?
4. Dlaczego stosowano IFNγ jako jedyny marker odpowiedzi komórkowej? W mojej ocenie praca zyskałaby na włączeniu nie tylko testów pośrednich, ale również funkcjonalnej analizy limfocytów cytotoksycznych poprzez np. test zabijania komórek zakażonych.
5. W tekście pracy pojawiają się niewielkie błędy terminologiczne (np. receptor toll-4 zamiast toll-like receptor 4), ale jest to raczej wyjątek.
6. Przedstawione badania mają bardzo wyraźny potencjał aplikacyjny. Jaka jest dalsza droga rozwoju? Czy podjęto współpracę lub rozmowy z SME albo większym przemysłem? Czy prace były prowadzone z uwzględnieniem wymagań dla tego typu wdrożeń?

Ocena edytorska

Praca została napisana poprawnym językiem naukowym i w sposób przyjemny wprowadza czytelnika w zagadnienie. Grafiki zostały przygotowane w sposób profesjonalny (problemem może być jedynie nieco niska rozdzielczość Ryc. 1) i klarownie opisane. Konstrukcja pracy prawidłowa, bibliografia obszerna i aktualna.

Podsumowanie

Rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej stanowi wartościowy wkład w rozwój dyscypliny, a przeprowadzone badania są wysokiej jakości i mają charakter aplikacyjny. Autorka wykazała się zarówno kompetencjami eksperymentalnymi, jak i dobrą znajomością literatury naukowej.

Na podstawie przeprowadzonej oceny stwierdzam, że praca spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnioskuję o dopuszczenie mgr Marty Zimnej do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Z uwagi na jakość samych wyników, jak i renomę czasopism naukowych w których zostały opublikowane, wnioskuję do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy.

Z wyrazami szacunku,

Signed by /
Podpisano przez:

Krzysztof Antoni
Pyrć

Date / Data:
2025-03-20 17:02

Krzysztof Pyrć

Podpis elektroniczny/certyfikat został usunięty podczas anonimizacji dokumentu.