



Ewa Szolańska

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marty Zimnej
pt. „Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu
produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen
szczepionkowy”

Recenzowana rozprawa została przygotowana w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego pod opieką promotora Pani dr hab. Eweliny Król, prof. Uczelni.

Rozprawa dotyczy opracowania rekombinowanej szczepionki nowej generacji chroniącej przed zakażeniem wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV ang. tick-borne encephalitis virus). TBEV powodujący poważne infekcje neurologiczne, takie jak zapalenie mózgu czy zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych stanowi istotne zagrożenie w wielu regionach Europy i Azji. W ostatnich kilkunastu latach obserwowany jest istotny wzrost częstości zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu (KZM) oraz rozszerzanie się zasięgu geograficznego TBEV. Należy brać pod uwagę, że ze względu na znaczną liczbę infekcji bezobjawowych prawdziwa skala problemu może być niedoszacowana. W związku z rosnącym zagrożeniem epidemiologicznym istnieje zatem potrzeba skutecznych działań profilaktycznych. Ale ze względu na wysoki koszt dostępnych szczepionek opartych na inaktywowanych wirusach, wymagających podania kilku dawek w celu wywołania trwałej odporności, ich użycie jest ograniczone, szczególnie w rejonach o niskim statusie ekonomicznym. Dodatkowo nie jest dostępna szczepionka weterynaryjna, której stosowanie mogłoby przyczynić się do obniżenia liczby zachorowań, ponieważ poza ukąszeniami kleszczy, istotny czynnik ryzyka stanowi spożycie produktów mlecznych pochodzących od zakażonych zwierząt.

Mając to na uwadze należy wysoko ocenić trafność i aktualność wyboru celu badań prezentowanych w rozprawie, którym było opracowanie szczepionki przeciwko TBEV opartej na rekombinowanych cząstkach wirusopodobnych (VLP) otrzymanych metodami inżynierii genetycznej z wykorzystaniem innowacyjnego eukariotycznego systemu ekspresji *Leishmania tarentolae*. Ze względu na użycie bardzo wydajnego systemu ekspresyjnego oraz brak konieczności stosowania restrykcyjnych zabezpieczeń, wymaganych w przypadku szczepionek opartych na inaktywowanym wirusie, koszt produkcji potencjalnej szczepionki w przypadku wdrożenia może być znacząco niższy w porównaniu z obecnie dostępnymi preparatami.

Rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej została przygotowana w formie zbioru trzech powiązanych artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych specjalistycznych, anglojęzycznych czasopismach naukowych z listy JCR. Praca opublikowana w 2024 roku *NPJ Vaccines* jest artykułem przeglądowym, prace eksperymentalne zostały opublikowane w *Antiviral research* 2023 i 2024 roku.

Napisana w języku polskim rozprawa ma poprawny układ, zawiera *Wykaz skrótów*, *Streszczenia* (w języku polskim i angielskim), *Listę publikacji wchodzących w skład rozprawy*,

Wstęp, Cel badań, Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy wraz z materiałami pomocniczymi, Podsumowanie badań, Wnioski końcowe, Literaturę, Inne osiągnięcia naukowe oraz Oświadczenia współautorów publikacji wchodzących w skład rozprawy.

W liczącym 18 stron *Wstępie* Autorka przedstawiła istotne informacje dotyczące: TBEV, genomu oraz białek wirusowych, ze szczególnym uwzględnieniem białek powierzchniowych; transmisji wirusa i wywoływanych chorób; odpowiedzi immunologicznej w infekcji TBEV; zalet wykorzystania VLP jako antygenów szczepionkowych i ich formulacji oraz systemu ekspresji *L. tarentolae*. Rozdział jest kompetentnym wprowadzeniem czytelnika w tematykę rozprawy. Jednak poproszę o pewne uzupełnienie. W podrozdziale dotyczącym epidemiologii Autorka podaje liczbę przypadków zachorowań na kleszczowe zapalenie mózgu na całym świecie. Jeśli są dostępne statystyki dla Polski poproszę Doktorantkę o ich przedstawienie podczas publicznej obrony.

Cel badań został klarownie sformułowany. Autorka wydzieliła kilka zadań badawczych. W *Podsumowaniu badań* Doktorantka w syntetyczny i dojrzały sposób opisała i przeanalizowała wyniki będące przedmiotem prac eksperymentalnych. Sformułowane przez Doktorantkę *Wnioski końcowe* z przeprowadzonych badań znajdują poparcie w uzyskanych danych.

Rozdział *Literatura* zawiera zestawienie 94 pozycji. Dobór prac świadczy o bardzo dobrej znajomości literatury dotyczącej tematyki projektu doktorskiego, którą Pani Marta Zimna wykazała się również jako współautorka pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy.

Rozprawa jest uzupełniona informacją o dorobku naukowym Doktorantki nie wchodzącym w skład rozprawy. Poza pracą opublikowaną w *Microbial spectrum* i dwoma ustnymi wystąpieniami na międzynarodowych konferencjach naukowych, obejmuje on patent przyznany przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej oraz zgłoszenie patentowe do Europejskiego Urzędu Patentowego. Przedmiotem patentu oraz zgłoszenia są wyniki badań prezentowanych w rozprawie.

Artykuły wchodzące w skład rozprawy są pracami zbiorowymi. Pani Marta Zimna jest pierwszą autorką wszystkich publikacji. Zamieszczone w rozprawie oświadczenia Doktorantki oraz wszystkich współautorów jednoznacznie świadczą o Jej wiodącym wkładzie w powstaniu artykułów. Obejmował on udział w opracowaniu koncepcji badań, wykonywanie eksperymentów, częściowe finansowanie badań, opracowanie i interpretację wyników oraz pisanie i edycję manuskryptu.

Pierwszy artykuł „*Leishmania tarentolae* as a platform for the production of vaccines against viral pathogens” (*NPJ Vaccines*, 2024) dotyczy zastosowań systemu ekspresyjnego *Leishmania tarentolae* w produkcji białek wirusowych wykorzystywanych jako antygeny szczepionkowe i diagnostyczne. System charakteryzuje wysoka wydajność i niski koszt produkcji rekombinowanych białek, oraz zdolność do przeprowadzania modyfikacji potranslacyjnych, takich jak N-glikozylacja, szczególnie istotna dla funkcjonalności białek wirusowych. Artykuł prezentuje rosnące w ostatnich latach zainteresowanie ośrodków naukowych oraz firm biotechnologicznych wykorzystaniem tego niekonwencjonalnego systemu jako alternatywy dla tradycyjnie wykorzystywanych systemów ekspresyjnych. Autorki przedstawiły przegląd literatury dotyczącej wykorzystania *L. tarentolae* do produkcji skutecznych eksperymentalnych szczepionek podjednostkowych, w szczególności opartych na VLP, oraz przykłady użycia pierwotniaka jako potencjalnej żywej szczepionki wektorowej, lub po inaktywacji jako nośnika antygenów.

Przedstawione w artykule zalety systemu *L. tarentolae* w pełni uzasadniają jego wybór do otrzymania antygeny w opracowywanej przez Doktorantkę potencjalnej szczepionce przeciw kleszczowemu zapaleniu mózgu.

Obie prace eksperymentalne prezentują badania wykonane przez zespół Zakładu Szczepionek Rekombinowanych we współpracy z Veterinary Research Institute w Brnie. W artykule “Functional characterization and immunogenicity of a novel vaccine candidate against tick-borne encephalitis

virus based on Leishmania-derived virus-like particles” (*Antiviral research*, 2023) opisano produkcję cząstek wirusopodobnych złożonych z głównych białek powierzchniowych TBEV - białka E (envelope) oraz białka prM (pre-membrane), po raz pierwszy otrzymanych w systemie ekspresyjnym opartym na pierwotniaku *L. tarentolae*. Racjonalne zaprojektowanie konstruktów wykorzystanego do otrzymania stabilnej linii *L. Tarentolae* nadprodukującej VLP, zapewniło wysoką wydajność produkcji rekombinowanych białek wydzielanych do pożywki hodowlanej. Białka były produkowane w N-glikozylowanej formie i mimo niepełnego odcinania N-terminalnej domeny białka M, składały się w koliste cząstki wirusopodobne, eksponujące na powierzchni epitopy silnie rozpoznawane przez przeciwciała neutralizujące wirusa w analizach *in vitro*.

Ocena immunogenności preparatów oczyszczonych VLP, przeprowadzona w modelu myszy BALB/c wykazała, że podskórne podanie trzech dawek antygeny w formułacji z adiuwantem AddaVax™ powodowało wzbudzenie silnej specyficznej odpowiedzi humoralnej. Obserwowano wysoki poziom przeciwciał skierowanych przeciwko białkom TBEV oraz inaktywowanemu wirusowi. Surowice poszczepienne wykazywały wysoką zdolność do neutralizacji TBEV szczepu Hypr należącego do podtypu europejskiego. Wysoki potencjał VLP TBEV do zastosowania jako szczepionka profilaktyczna został potwierdzony w eksperymencie typu challenge, w którym eksperymentalne szczepienie myszy za pomocą antygeny w połączeniu z adiuwantem AddaVax™ zapewniło pełną ochronę przed infekcją śmiertelną dawką wirusa szczepu Hypr TBEV.

Celem badań przedstawionych w pracy “Influence of adjuvant type and route of administration on the immunogenicity of Leishmania-derived tick-borne encephalitis virus-like particles - A recombinant vaccine candidate” (*Antiviral research*, 2024) było ustalenie optymalnej formułacji i sposobu podania potencjalnej szczepionki opartej na VLP TBEV produkowanych w systemie ekspresyjnym *L. tarentolae*. Przeprowadzono kompleksową analizę odpowiedzi immunologicznej, wraz z oceną potencjału do neutralizacji trzech różnych szczepów wirusa przez surowice myszy immunizowanych VLP bez adjuwantu oraz w połączeniu z adiuwantem AddaS03™ lub kombinacją Alhydrogel®+MPLA, podawanymi drogą podskórną lub domięśniową. Stwierdzono, że zastosowanie adjuwantu zwiększa poziom odpowiedzi immunologicznej. Odpowiedź komórkowa, była zależna od rodzaju adjuwantu, podczas gdy na poziom przeciwciał wpływały zarówno adjuwant, jak i droga podania. Immunizacja VLP w połączeniu z adjuwantami wpływała na awidność przeciwciał, która osiągała 100% niezależnie od rodzaju adjuwantu czy sposobu podania. Najwyższy poziom odpowiedzi immunologicznej, analizowanej pod względem miana przeciwciał, poziomu neutralizacji oraz uzyskania odpowiedniej równowagi między odpowiedzią humoralną i komórkową, obserwowano w wyniku immunizacji z użyciem VLPs w połączeniu z kombinacją adjuwantów Alhydrogel®+MPLA w podaniu domięśniowym. Są to bardzo interesujące wyniki. Na podkreślenie zasługuje ich znaczenie w kontekście potencjalnego wdrożenia szczepionki. Nie jest dostępny uniwersalny adjuwant, zatem konieczny jest wybór odpowiedniego do konkretnego antygeny. Agencje rejestrujące leki dopuszczają adjuwanty do użytku komercyjnego jako składnik konkretnego preparatu szczepionkowego.

Podsumowując pani Marta Zimna z powodzeniem zrealizowała zamierzone cele. Oceniana rozprawa doktorska prezentuje istotny wkład w opracowanie skutecznej szczepionki dla ludzi oraz weterynaryjnej o niższych kosztach produkcji i dogodnych warunkach transportu i przechowywania.

Realizacja projektu doktorskiego wymagała wykorzystania szerokiego spektrum metod i technik badawczych, co świadczy o dużych umiejętnościach praktycznych mgr Marty Zimnej.

Rozprawa została bardzo starannie przygotowana pod względem merytorycznym i redakcyjnym, zawiera bardzo nieliczne błędy mające charakter pomyłek pisarskich. Z obowiązku recenzenta zwrócę uwagę na niezręczne w mojej opinii sformułowanie użyte na str. 14: „Publikacja

P1 jest przeglądem literatury...i stanowi uzupełnienie wstępu przedstawionego w tej rozprawie.”
Podczas gdy publikacja jest jednym z artykułów będących podstawą rozprawy doktorskiej.

Lektura rozprawy nasunęła mi kilka pytań, poproszę Doktorantkę o ustosunkowanie się do nich podczas publicznej obrony:

1. Przebieg kliniczny kleszczowego zapalenia mózgu zależy od podtypu wirusa. Co wiadomo na temat podstaw molekularnych tych różnic?
2. Jaka jest homologia sekwencji aminokwasowej białek E oraz prM różnych podtypów TBEV? Czy można przewidywać, że opracowana szczepionka będzie skutecznie chronić przed rozwinięciem objawów infekcji wirusami należącymi do podtypów innych niż europejski?
3. Czy możliwe jest oszacowanie jaka będzie cena jednej dawki szczepionki przeznaczonej dla ludzi?
4. Jestem bardzo ciekawa jakie są perspektywy wdrożenia potencjalnej szczepionki.

Podsumowując stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Marty Zimnej jest zbiorem trzech opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych, w których Kandydatka miała wyodrębniony udział. Rozprawa przedstawia oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdza wiedzę teoretyczną mgr Marty Zimnej w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie naukowej biotechnologia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Stwierdzam, że przedłożona do oceny rozprawa doktorska zatytułowana „Rekombinowane cząstki wirusopodobne wirusa kleszczowego zapalenia mózgu produkowane w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae* jako potencjalny antygen szczepionkowy” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późn. zm.). W związku z tym wnioskuję do Rady Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego o jej przyjęcie i dopuszczenie mgr Marty Zimnej do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Jednocześnie mając na uwadze fakt, że wyniki badań realizowanych w ramach przygotowania rozprawy doktorskiej zostały opublikowane w prestiżowych recenzowanych czasopismach naukowych, oraz są one przedmiotem przyznanego patentu, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy.

Warszawa, dnia 5 marca 2025 r.



Dr hab. Ewa Szolajska
Środowiskowa pracownia Hodowli Komórkowych
i Produkcji Białek
Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN