

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

mgr Karolina Gackowska

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

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

W zaprezentowanej pracy doktorskiej podjęłam się sprawdzenia możliwości zastosowania szczepionki dwuwalentnej, zawierającej cząstki wirusopodobne (oparte na sHBsAg) i mRNA kodujące sekwencję nukleoproteiny wirusa grypy typu A (NP). Pierwszym z celów pracy było opracowanie wydajnej metody nadprodukcji i oczyszczania białek opartych na sHBsAg z systemu owadziego. Aby uprościć proces oczyszczania rekombinowanego białka w stosunku do opisanych już wcześniej protokołów, do białka dodałam sekwencję znacznika Twin-Strep-tag (TS-sHBsAg). Zastosowanie chromatografii powinowactwa przyczyniło się do uzyskania dużej ilości czystego białka w jednoetapowym procesie, które mogłam bezpośrednio użyć do dalszych badań. Do sekwencji TS-sHBsAg wprowadziłam również modyfikacje mające na celu możliwość związania mRNA (oparte na domenie wiążącej kwasy nukleinowe białka kapsydowego HBV) i również analizowałam proces nadprodukcji i oczyszczania tych wariantów. Sprawdziłam też, czy wprowadzone motywy mają wpływ na składanie się VLPs – wszystkie warianty oprócz jednego tworzyły VLPs. Starłam się również znaleźć optymalne warunki do rozkładania i składania się VLPs opartych na sHBsAg, jednak ze względu na negatywne wyniki, zdecydowałam się nie kontynuować badań w tym kierunku.

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

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

Wyniki niniejszej pracy wskazują, że zastosowanie mieszaniny zawierającej VLPs oraz mRNA może być nową atrakcyjną platformą szczepionkową. W toku badań zaprezentowałam nową metodę oczyszczania rekombinowanych sHBsAg z systemu owadziego z użyciem chromatografii powinowactwa i potwierdziłam funkcjonalność tych białek. Zaprojektowana przeze mnie matryca do produkcji mRNA również okazała się

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

skuteczna. Otrzymane wyniki dostarczają cennych informacji wspierających rozwój uniwersalnych podejść szczepionkowych przeciwko wielu patogenom oraz mogą stanowić podstawę dla kolejnych etapów badań i optymalizacji tej strategii.