

Załącznik 3a

Autoreferat

Katarzyna Grzyb



Zakład Biologii Molekularnej Wirusów
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

GDAŃSK 2026

1 Imię i nazwisko

Katarzyna Grzyb

2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

29.06.2007 Doktor nauk biologicznych w zakresie biologii - Uniwersytet Gdański, Instytut Biologii. Tytuł rozprawy: „*Identyfikacja i właściwości izoenzymów kinazy kreatynowej z plemników i mięśni szkieletowych śledzia (Clupea harengus)*”. Promotor pracy: prof. dr hab. Edward Skorkowski.

09.10.2001 Magister biologii w zakresie biologii molekularnej – Uniwersytet Gdański, Wydział Biologii, Geografii i Oceanologii.

3 Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

luty 2018 – obecnie – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed, Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Gdańsk

- Adiunkt – etat projektowy
- Kierowniczką projektów NCN: OPUS 14, OPUS 21
- Obszar badań: Badania nad opracowaniem szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV) oraz uniwersalnej szczepionki przeciwko SARS-CoV-2.

luty 2013 – grudzień 2016 – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed, Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Gdańsk

- Adiunkt – etat projektowy
- Kierowniczką projektów NCBiR: LIDER oraz NCN: SONATA 3
- Obszar badań: Badania nad opracowaniem szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV).

grudzień 2010 – luty 2012 – Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-GUMed, Zakład Biologii Molekularnej Wirusów, Gdańsk

- Specjalistka – etat projektowy w ramach projektu „*New preventative and therapeutic Hepatitis C vaccines: from pre-clinical to phase 1*”
- Obszar badań: Wprowadzenie nowych metod w badaniu cyklu życiowego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV).

marzec 2009 – CEINGE-Biotechnologie Avanzate, laboratorium firmy Okairos (obecnie ReiThera), Włochy

- 18-miesięczne stypendium podoktorskie Marie-Curie w ramach projektu „*Entry inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection*”, 6 PR UE
- Obszar badań: Przeciwciała przeciwko receptorowi SR-B1 jako skuteczna immunoterapia w leczeniu przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C.

4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.).

4.1 Tytuł głównego osiągnięcia naukowego

W kierunku skutecznej szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C: podejścia oparte na rekombinowanych glikoproteinach, cząstkach wirusopodobnych i DNA typu „minicircle”.

4.2 Cykl publikacji wchodzący w skład głównego osiągnięcia naukowego

Główne osiągnięcia przedstawione do oceny zawarte są w cyklu pięciu powiązanych tematycznie publikacji, które zostały opublikowane po uzyskaniu stopnia naukowego doktora oraz po odbyciu 18-miesięcznego stażu podoktorskiego w Neapolu. Wszystkie artykuły zostały opublikowane w czasopismach z listy JCR (Journal Citation Reports). We wszystkich pracach pełnię funkcję autora korespondującego a w jednej z nich dodatkowo autora pierwszego.

Publikacja 1

Grzyb, K*, Czarnota, A., Brzozowska, A., Cieślik, A., Rąbalski, Ł., Tyborowska, J., Bieńkowska-Szewczyk, K. (2016). Immunogenicity and functional characterization of Leishmania-derived hepatitis C virus envelope glycoprotein complex. *Scientific Reports*, 6, 30627, doi:10.1038/srep30627

*autor korespondujący

IF₂₀₁₆ - 4,25; IF_{5-letni} - 4,3; MEiN₂₀₁₆ - 40; MEiN₂₀₂₅ - 140; liczba cytowań - 10 (WoS)

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań i sformułowanie hipotez badawczych, rekrutację i wyszkolenie zespołu projektowego, nadzór naukowy nad zespołem projektowym, opracowanie metodologii badawczej, prace eksperymentalne (wdrożenie nowego systemu ekspresji białek Leishmania tarentolae w laboratorium, ekspresja heterodimeru HCV E1E2 oraz jego charakterystyka, oczyszczanie E1E2, przygotowanie próbek do immunizacji zwierząt, opracowanie schematu szczepień, a także analiza odpowiedzi humoralnej), uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej na badania na zwierzętach, analizę i wizualizację danych, interpretację wyników, przygotowanie pierwszej wersji manuskryptu, wysłanie manuskryptu do czasopisma, korespondencję z redaktorem, wprowadzenie zmian w manuskrypcie sugerowanych przez recenzentów, przygotowanie odpowiedzi na recenzje, administrację projektów, pozyskanie finansowania na badania w postaci grantów, w których pełniłam rolę kierownika LIDER i SONATA 3.

Publikacja 2

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. *Microbial Cell Factories*, 15, 62, doi:10.1186/s12934-016-0460-4

*autor korespondujący

IF₂₀₁₆ – 3,68; IF_{5-letni} – 6,1; MEiN₂₀₁₆ – 40; MEiN₂₀₂₅ – 100; liczba cytowań – 21 (WoS)

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: opracowanie koncepcji badań i sformułowanie hipotez badawczych, rekrutację i wyszkolenie zespołu projektowego, nadzór naukowy nad zespołem projektowym (w tym doktorantką, której byłam promotorką pomocniczą), opracowanie metodologii badawczej, udział w pracach eksperymentalnych (analiza odpowiedzi komórkowej ELISpot), uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej na badania na zwierzętach, udział w analizie danych i interpretacji wyników, udział w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, wysłanie manuskryptu do czasopisma, korespondencję z redaktorem, udział we wprowadzeniu zmian w manuskrypcie sugerowanych przez recenzentów oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, administrację projektów, pozyskanie finansowania na badania w postaci grantów, w których pełniłam rolę kierownika LIDER i SONATA 3.

Publikacja 3

Czarnota, A., Offersgaard, A., Pihl, A. F., Prentoe, J., Bukh, J., Gottwein, J. M., Bieńkowska-Szewczyk, K., **Grzyb, K***. (2020). 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(2), 294. doi:10.3390/vaccines8020294

*autor korespondujący

IF₂₀₂₀ - 4,42; IF_{5-letni} – 3,7; MEiN₂₀₂₀ – 140; liczba cytowań – 20 (WoS)

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych, nadzór naukowy nad zespołem projektowym (w tym doktorantką, której byłam promotorką pomocniczą), udział w analizie danych i interpretacji wyników, nawiązanie współpracy z naukowcami z Danii i korespondencję dotyczącą interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, wysłanie manuskryptu do czasopisma, korespondencję z redaktorem i współautorami z Danii związaną z edycją manuskryptu, udział we wprowadzeniu zmian w manuskrypcie sugerowanych przez recenzentów oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, administrację projektu, pozyskanie finansowania na badania w postaci grantu, w którym pełniłam rolę kierownika OPUS 14.

Publikacja 4

Czarnota, A*, Offersgaard, A., Owsianka, A., Alzua, G. P., Bukh, J., Gottwein, J. M., Patel, A. H., Bieńkowska-Szewczyk, K., **Grzyb, K***. (2023). The effect of glycan shift on antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 epitope elicited by chimeric sHBsAg-based virus-like particles. *Microbiology Spectrum*, doi:10.1128/spectrum.02546-22

*autor korespondujący

IF₂₀₂₃ – 3,7; IF_{5-letni} – 4,1; MEiN₂₀₂₃ – 100; liczba cytowań – 5 (WoS)

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych, nadzór naukowy nad zespołem projektowym (w tym doktorantką, której byłam promotorką pomocniczą), udział w analizie danych i interpretacji wyników, nawiązanie współpracy z naukowcami z Danii i Wielkiej Brytanii oraz korespondencję dotyczącą interpretacji wyników badań, udział w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, korespondencję z współautorami z Danii i Wielkiej Brytanii związaną z edycją manuskryptu, udział we wprowadzeniu zmian w manuskrypcie sugerowanych przez recenzentów oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, administrację projektu, pozyskanie finansowania na badania w postaci grantu, w którym pełniłam rolę kierownika OPUS 14.

Publikacja 5

Czarnota, A., Raszplewicz, A., Sławińska, A., Bieńkowska-Szewczyk, K., **Grzyb, K***. Micircle-based vaccine induces potent T-cell and antibody responses against hepatitis C virus. (2024). *Scientific Reports* 14, 26698, doi:10.1038/s41598-024-78049-3

*autor korespondujący

IF₂₀₂₄ – 3,9; IF_{5-letni} – 4,3; MEiN₂₀₂₄ – 140; liczba cytowań – 4 (WoS)

Mój wkład w powstanie tej pracy obejmował: udział w opracowaniu koncepcji badań i sformułowaniu hipotez badawczych, nadzór naukowy nad zespołem projektowym (w tym magistrantką, której byłam promotorką oraz doktorantką, której byłam promotorką pomocniczą), udział w opracowaniu metodologii badawczej, udział w pracach eksperymentalnych (analiza odpowiedzi komórkowej ELISpot), uzyskanie zgody Lokalnej Komisji Etycznej na badania na zwierzętach, udział w analizie danych, wizualizacji i interpretacji wyników, udział w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu, wysłanie manuskryptu do czasopisma, korespondencję z redaktorem, udział we wprowadzeniu zmian w manuskrypcie sugerowanych przez recenzentów oraz przygotowaniu odpowiedzi na recenzje, administrację projektu, pozyskanie finansowania na badania w postaci grantu, w którym pełniłam rolę kierownika OPUS 14.

Dane bibliometryczne dla pięciu publikacji stanowiących główne osiągnięcie habilitacyjne:

- Łączny Impact Factor (IF) publikacji zgodny z JCR w roku opublikowania: 19,95
- Łączna liczba punktów MEiN według wykazu obowiązującego w roku opublikowania: 460
- Łączny 5-letni Impact Factor (IF) publikacji zgodny z JCR: 22,5
- Aktualna łączna liczba punktów MEiN: 620

4.3 Omówienie celu naukowego i uzyskanych wyników głównego osiągnięcia habilitacyjnego

4.3.1 Wprowadzenie

Wirus zapalenia wątroby typu C (z ang. *hepatitis C virus - HCV*) został odkryty w latach 80. XX wieku jako czynnik zakaźny odpowiedzialny za przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby, które nie było wywołane ani przez wirus zapalenia wątroby typu A (HAV), ani typu B (HBV). Prace Harveya Altera, Michaela Houghtona i Charlesa Rice'a doprowadziły do

pełnej identyfikacji wirusa i potwierdziły jego zdolności do wywoływania zakażeń. Za to przełomowe odkrycie trzech badaczy otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny w 2020 roku. Ich osiągnięcia umożliwiły opracowanie testów diagnostycznych wykrywających zakażenie HCV, a w konsekwencji znacząco zwiększyły bezpieczeństwo transfuzji krwi, ponieważ do transmisji wirusa dochodzi przede wszystkim drogą krwio-pochodną. To z kolei utorowało drogę do rozwoju skutecznych leków przeciwwirusowych oraz badań nad szczepionką, która wciąż jest niedostępna¹.

Mimo, że odkrycie wirusa HCV i rozwój metod diagnostycznych znacząco przyczyniły się do ograniczenia liczby nowych zakażeń, wirus ten nadal stanowi poważny problem medyczny. Na świecie żyje obecnie około 50 milionów osób zakażonych HCV. Najwięcej infekcji występuje w krajach rozwijających się, gdzie dostęp do terapii antywirusowych pozostaje ograniczony. Z drugiej strony także w Stanach Zjednoczonych zaobserwowano wzrost liczby zakażeń HCV, szczególnie od około 2010 roku, w związku z nasileniem epidemii opioidów i zwiększeniem częstości iniekcyjnego używania narkotyków². Dodatkowo, niepokój budzi niska wykrywalność infekcji oraz duża liczba niezdiagnozowanych, często nieświadomych nosicieli wirusa. Wynika ona głównie z braku wyraźnych objawów klinicznych we wczesnej fazie infekcji. Według najnowszych danych poziom wykrywalności zakażeń HCV w Polsce należy do jednych z najniższych w Europie i wynosi zaledwie około 5%³. Jest to związane m.in. z brakiem powszechnych badań przesiewowych wśród grup wysokiego ryzyka, które mogłyby być wykonywane podczas rutynowych badań lekarskich. Wczesne rozpoznanie zakażenia ma kluczowe znaczenie, ponieważ u około 75% chorych ostra infekcja przechodzi w fazę przewlekłą, prowadzącą do poważnych uszkodzeń wątroby, zwłóknienia, marskości oraz raka wątrobowokomórkowego. Dlatego, nieleczona infekcja HCV w wielu przypadkach może zakończyć się śmiercią. Pomimo odkrycia wysoce skutecznych leków przeciwwirusowych DAA (z ang. *direct acting antivirals*), każdego roku nadal odnotowuje się około miliona nowych zakażeń HCV i około 242 tysiące przypadków śmiertelnych na świecie^{3,4}. W związku z tym Światowa Organizacja Zdrowia zakwalifikowała wirusa HCV do kluczowych patogenów, przeciwko którym konieczne jest opracowanie skutecznej szczepionki oraz wdrożyła globalną strategię eliminacji choroby wywołanej wirusem HCV, której celem jest zmniejszenie liczby nowych zakażeń HCV o 90% oraz redukcja liczby zgonów o 65% do 2030 roku⁵.

Poszukiwanie nowych terapii przeciwwirusowych przez długi czas było utrudnione ze względu na brak dogodnego modelu do badań cyklu życiowego wirusa *in vitro*. Powody, dla których HCV pochodzący z surowicy pacjenta nie może być zaadoptowany do hodowli w liniach komórkowych *in vitro* nadal nie są do końca znane. Mimo tego, zastosowanie systemów zastępczych takich jak retrowirusowe pseudocząsteczki (HCVpp) oraz replikony pozwoliło na studiowanie mechanizmów wnikania wirusa do komórki oraz cyklu replikacyjnego^{6,7}. Dopiero w 2005 roku kilku zespołom udało się uzyskać cząstki infekcyjne wirusa HCV w ludzkiej linii komórek nowotworowych Huh7⁸. System został nazwany w skrócie HCVcc (z ang. *cell culture-derived HCV*) i pozwolił na przeprowadzanie testów neutralizacji wirusa oraz badania poszczególnych etapów cyklu życiowego wirusa. Stosując powyższe modele badawcze w dość krótkim okresie nastąpił ogromny postęp w badaniach mechanizmów oddziaływań wirusa z komórką gospodarza. Powstały przede wszystkim nowe leki DAA i strategie terapii celujące bezpośrednio w białka wirusowe zaangażowane w różne etapy cyklu życiowego wirusa. Przed pojawieniem się DAA dla zakażonych pacjentów dostępna była tylko terapia oparta na interferonie i rybawirynie obarczona niską skutecznością i częstymi skutkami ubocznymi⁹.

Należy podkreślić fakt, że HCV charakteryzuje się bardzo wąską specyficznością ga-

tunkową, zakaża tylko ludzi i szympansy. Brak modeli zwierzęcych dla zakażeń HCV jest ważną przeszkodą w prowadzeniu badań nad szczepionką przeciwko HCV. Choć szympanasy jako jedyny naturalny model zwierzęcy dla HCV odegrały kluczową rolę w odkryciu i charakterystyce wirusa w latach 70. i 80. XX wieku, obecnie badania z ich udziałem są zabronione z powodu ograniczeń etycznych. Aktualnie do badań *in vivo* najczęściej stosuje się chimeryczne myszy po ksenotransplantacji ludzkich hepatocytów¹⁰. Myszy te jednak nie mają aktywnego systemu immunologicznego, co ogranicza ich zastosowanie w badaniach nad skutecznością szczepionek. Mimo tego, są one niezwykle pomocne w testowaniu nowych leków przeciwwirusowych i przeciwciał mających zastosowanie w immunoterapii. W 2011 po raz pierwszy zaproponowano immunokompetentny model myszy, w którym ekspresja genów kodujących ludzkie receptory wejścia dla HCV była wystarczająca do zakażenia wirusem mysich komórek wątroby, jednak niski poziom replikacji wirusa w transgenicznym myszach jest poważnym ograniczeniem w wykorzystaniu tego modelu zwierzęcego do rutynowych testów szczepionek na dużą skalę¹¹. Niedawne odkrycie wirusa zapalenia wątroby u szczurów (RHV) dostarczyło cennego modelu do badań. Jednak minusem jest to, że wirusy te są dość odległe genetycznie od HCV i nie odzwierciedlają w pełni przebiegu zakażenia HCV u ludzi¹².

Brak modeli zwierzęcych do badań do tego stopnia hamuje rozwój szczepionek, że pojawiły się dyskusje w środowisku naukowym na temat wprowadzenia kontrolowanego modelu zakażenia człowieka. Dostęp do wysoko skutecznych terapii DAA stwarza możliwość zaszczepienia zdrowych ochotników eksperymentalną szczepionką a następnie ich kontrolowanego zakażenia dobrze scharakteryzowanym szczepem HCV w celu oceny skuteczności podanej szczepionki. Pomimo wielu zalet takiego rozwiązania, model kontrolowanego zakażenia człowieka budzi wiele obaw natury etycznej^{13,14}.

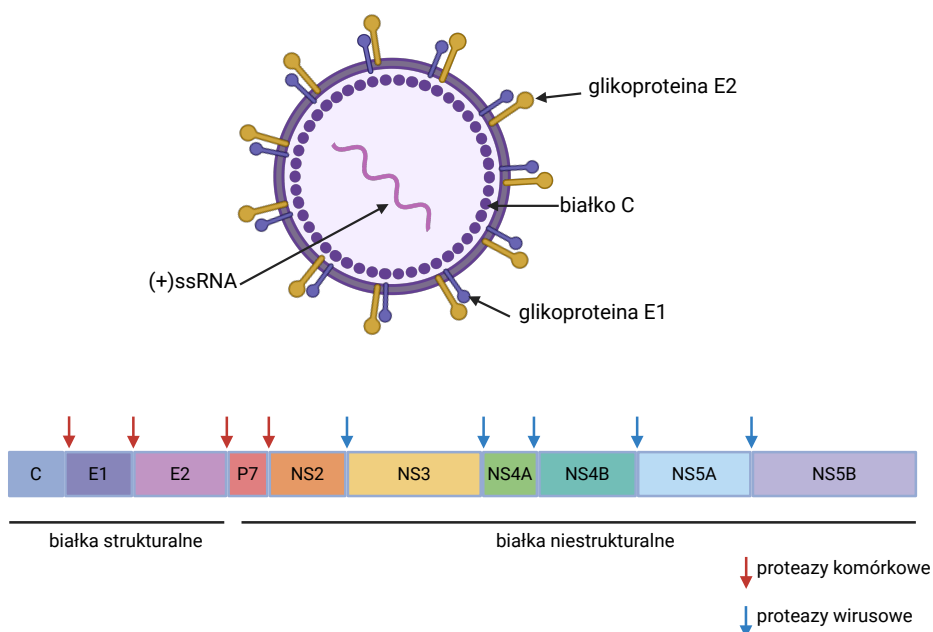
Wirus HCV charakteryzuje się dużą zmiennością genetyczną, która stanowi kolejną ważną przeszkodę w badaniach nad szczepionką. Do tej pory sklasyfikowano 8 głównych genotypów i ponad 100 podtypów wirusa, które wykazują zróżnicowaną dystrybucję geograficzną oraz odmienną odpowiedź na leczenie, co podkreśla konieczność opracowania szczepionki zapewniającej szeroką, pan-genotypową ochronę¹⁵.

Idealnym celem skutecznej szczepionki jest wywołanie odporności sterylizującej, mającej na celu całkowitą ochronę przed zakażeniem. W przypadku szczepionki przeciwko HCV taki cel prawdopodobnie jest trudny do osiągnięcia. Ze względu na to, że kliniczne następstwa zakażenia HCV rozwijają się dopiero po wielu latach a nawet dekadach chronicznej infekcji, zapobieganie przejściu zakażenia z postaci ostrej w postać przewlekłą przyniosłoby znaczące korzyści kliniczne. Aby osiągnąć ten cel, konieczne jest wywołanie ochronnej odpowiedzi immunologicznej – prawdopodobnie zarówno humoralnej, jak i komórkowej – zdolnej do eliminacji wirusa w ostrej fazie infekcji¹⁶.

Obecny przegląd badań nad szczepionką przeciwko HCV obejmuje szeroką i dynamicznie rozwijającą się gamę kandydatów. Tradycyjne podejścia obejmują wykorzystanie inaktywowanych wirusów, które indukują silną odpowiedź zarówno komórkową, jak i humoralną^{17,18}. Bardziej nowoczesne podejścia obejmują szczepionki podjednostkowe, cząstki wirusopodobne VLP (z ang. *Virus-like particle*), szczepionki oparte na kwasach nukleinowych (DNA i RNA) oraz szczepionki wektorowe. Rekombinowane białka osłonki wirusa HCV, E1 i E2, ze względu na to, że są wyeksponowane na powierzchni cząsteczki wirusowej mają zdolność do wywołania odpowiedzi humoralnej w postaci przeciwciał neutralizujących i są ważnym celem w projektowaniu szczepionek^{4,19}. Na uwagę zasługuje szczepionka oparta na heterodimerze E1E2, która osiągnęła pierwszą fazę badań klinicznych. Niestety, ze względu na trudności z produkcją i oczyszczaniem E1E2 z wnętrza

komórek ssaczych badania nie były kontynuowane w drugiej fazie²⁰. Dodatkowo, głównym problemem szczepionek podjednostkowych opartych na E1E2 jest indukcja przeciwciał o wąskim spektrum działania. Analiza odpowiedzi immunologicznej przeciwciał po immunizacji E1E2 z genotypu 1 wykazała ich niski potencjał neutralizujący wobec wariantów wirusa z genotypu 2 i 3²¹⁻²³.

Z uwagi na wysokie tempo mutacji oraz znaczną zmienność genetyczną HCV wiele strategii opracowania szczepionki opiera się na białkach niestrukturalnych wirusa (NS), które są bardziej konserwowane i indukują głównie silną odpowiedź komórkową^{24,25}. Jednak ostatnie badania kliniczne fazy I i II pokazują, że szczepionki oparte jedynie na białkach NS wirusa nie wykazały skuteczności ochronnej^{26,27}. Wyniki te podkreślają konieczność opracowania nowych rozwiązań, które będą jednocześnie indukować zarówno silną odpowiedź komórkową, jak i humoralną w postaci neutralizujących przeciwciał o szerokim spektrum działania. Budowę wirusa HCV oraz białka, które koduje ilustruje Rycina 1.



Rycina 1: Schemat przedstawiający budowę cząsteczki wirusa HCV oraz schemat białek wirusowych kodowanych przez genom HCV. Wirus HCV należy do grupy wirusów osłonkowych z rodziny *Flaviviridae*. Jego genom koduje jedną poliproteinę, która jest cięta przez wirusowe i komórkowe proteazy. W wyniku cięcia poliproteiny powstają trzy białka strukturalne: białko rdzenia C, E1, E2 i siedem białek niestrukturalnych: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B. Utworzono za pomocą BioRender.com

Do dziś szczepionka komercyjna przeciwko HCV nadal nie jest dostępna. Mimo dużej skuteczności terapii lekowej DAA w przypadku zakażeń prawie wszystkimi genotypami wirusa powszechne jej stosowanie w wielu krajach świata o niskim i średnim dochodzie jest ograniczone głównie ze względu na znaczące koszty terapii. Ponadto, pojawianie się mutantów HCV posiadających mutacje związane z opornością na leki skutkuje niekiedy niepowodzeniem zastosowanej terapii u części pacjentów²⁸. Biorąc pod uwagę niski poziom wykrywalności zakażeń, powszechnie uważa się, że profilaktyczna szczepionka mogłaby znacząco przyczynić się do zmniejszenia liczby zakażeń i zgonów będących wynikiem nie-

leczzonego zakażenia HCV¹⁶. Dlatego po odbyciu 18-miesięcznego stażu podoktorskiego we Włoszech i powrocie do kraju moje zainteresowania badawcze skupiły się na poszukiwaniu nowych kandydatów na szczepionkę przeciwko wirusowi HCV opartych na rekombinowanym heterodimerze E1E2 (publikacja nr 1) oraz chimerycznych cząstkach wirusopodobnych (VLP) eksponujących konserwowane epitopy glikoproteiny E2 wirusa HCV (publikacje nr 2, 3 i 4). Powyższe strategie szczepionkowe skupiały się głównie na wzbudzaniu skutecznej odpowiedzi humoralnej w postaci przeciwciał neutralizujących. Skuteczna szczepionka powinna równocześnie pobudzać obie gałęzie adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej nie tylko w postaci przeciwciał, ale i limfocytów T, dlatego w dalszych etapach badań postanowiłam zaprojektować szczepionkę, która angażowałaby dodatkowo odpowiedź komórkową przeciwko HCV. Do konstrukcji szczepionki zastosowałam wektory oparte na technologii „minicircle DNA” będące bezpieczniejszą alternatywą w porównaniu do tradycyjnych plazmidów bakteryjnych używanych do tej pory do projektowania szczepionek bazujących na DNA (publikacja nr 5).

4.3.2 Opracowanie nowych form heterodimeru E1E2 w komórkach *Leishmania tarentolae*

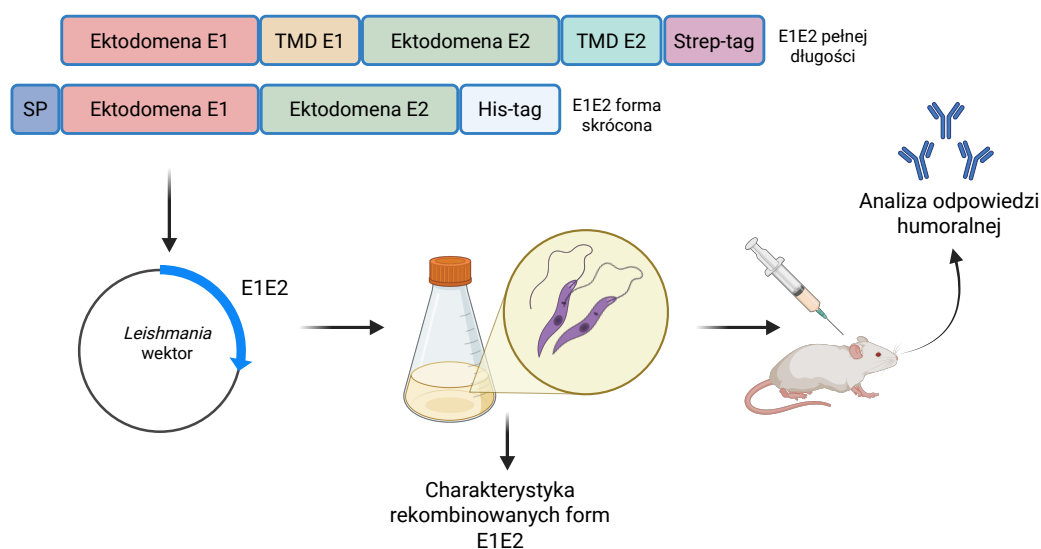
Glikoproteiny osłonkowe E1 i E2 wirusa HCV oddziałują z receptorami komórkowymi i odgrywają ważną rolę w wejściu wirusa do komórki gospodarza. Funkcjonalną formą glikoprotein jest ich kompleks w postaci silnie glikozylowanego niekowalencyjnego heterodimeru E1E2. Spośród dwóch glikoprotein osłonkowych kodowanych przez genom HCV, to glikoproteina E2 jest głównym celem dla przeciwciał neutralizujących wirusa. W związku z tym, wiele zespołów badawczych prowadzi prace nad szczepionkami opartymi wyłącznie na białku E2. Jednak wiele badań pokazuje, że heterodimer E1E2 wzbudza silniejszą ochronną odpowiedź immunologiczną ze względu na prezentowanie większej ilości zróżnicowanych epitopów odpowiedzialnych za neutralizację²⁹.

Wysokoskalowa produkcja heterodimeru E1E2 do celów szczepionkowych stanowi wyzwanie, ponieważ jego wewnątrzkomórkowa lokalizacja w transfekowanych komórkach ssaczych zwiększa cytotoksyczność, co wiąże się z niską wydajnością produkcji. Problemem jest również skomplikowana procedura oczyszczania rekombinowanego E1E2 ze złożonej mieszaniny komórkowej²⁹. Dodatkowo wykazano, że glikoproteina E2 zawiera aż 11 miejsc N-glikozylacji. Badania nad rolą N-glikanów wskazują na ich ważną funkcję w tworzeniu i utrzymaniu prawidłowej konformacji heterodimeru oraz wnikaniu wirusa do komórki^{30,31}. Do dziś trwają intensywne badania nad strategiami ułatwiającymi otrzymanie i oczyszczenie E1E2, zachowując przy tym natywną antygenową strukturę kompleksu będącą kluczem do wzbudzania przeciwciał o szerokim spektrum neutralizacji.

Badania rozpoczęłam od poszukiwania alternatywnego systemu ekspresji rekombinowanego heterodimeru E1E2, gdyż ekspresja w komórkach ssaczych jest mało wydajna i kosztowna, mimo tego iż pozwala na prawidłowe modyfikacje potranslacyjne białek. Niekonwencjonalny system ekspresji rekombinowanych białek w pierwotniaku *Leishmania tarentolae* wydawał się obiecującą platformą do otrzymywania białek wirusowych, która łączy homogeny, bardzo zbliżony do ssaków, proces N-glikozylacji z wysoką wydajnością otrzymywanych białek. Unikalną zaletą systemu jest to, że uzyskane w tym systemie białka cechuje N-glikozylacja typu złożonego a nie wysoko-mannozowa, jak w przypadku systemów wykorzystujących drożdże czy bakulowirusy³².

Ze względu na brak doniesień dotyczących ekspresji wirusowych glikoprotein E1 i E2 w systemie *Leishmania tarentolae* zadałam sobie pytanie czy rzeczywiście system ten mógłby stanowić alternatywną metodę uzyskania funkcjonalnego heterodimeru E1E2 do

celów szczepionkowych. Na badania te uzyskałam grant w ramach programu SONATA 3 z Narodowego Centrum Nauki. Moje plany badawcze objęły szczegółową charakterystykę biochemiczną oraz funkcjonalną otrzymanych białek. Szczególnie interesowała mnie specyfika wiązania do receptorów komórkowych oraz zdolność do wzbudzenia specyficznej przeciwwirusowej odpowiedzi immunologicznej. Wyniki z tej części badań zostały opublikowane w pierwszej publikacji wchodzącej w skład cyklu. Schemat badań przeprowadzonych w ramach publikacji 1 przedstawia Rycina 2.



Rycina 2: Schemat konstrukcji i produkcji rekombinowanych form E1E2 w komórkach *Leishmania tarentolae*. TMD – domena transmembranowa, SP – sekwencja sygnałowa pochodząca z *L. mexicana* ułatwiająca wyprowadzanie białka do pożywki. Utworzono za pomocą BioRender.com na podstawie publikacji Grzyb *i in.*, 2016.

Prace rozpoczęłam od zaprojektowania dwóch konstruktów, heterodimeru E1E2 o pełnej długości oraz heterodimeru E1E2 w formie skróconej pozbawionej domen transmembranowych (TMD). Usunięcie TMD oraz dołączenie sekwencji sygnałowej kierującej białko na szlak sekrecyjny pozwoliło na otrzymanie formy sekrecyjnej E1E2 oraz transport rekombinowanego białka do pożywki. Do ekspresji powyższych białek użyłam indukowalnego wektora, co pozwoliło na integrację sekwencji kodującej rekombinowane białka do genomu *Leishmanii* oraz indukowalną ekspresję transgenu pod kontrolą operatora tetracyklinowego. Do zaprojektowania antygenów zastosowałam sekwencję E1E2 pochodzącą z genotypu 1a (szczep H77). Następnie przeprowadziłam analizę biochemiczno-funkcjonalną, gdzie białka analizowałam poprzez immunofluorescencję oraz western-blot, używając specyficznych przeciwciał anty-E1 i anty-E2. Mikroskopia konfokalna potwierdziła ekspresję obu form kompleksu E1E2 w pierwotniaku. W komórkach ssaczy pełnej długości heterodimer jest cięty przez specyficzną proteazę komórkową na dwa oddzielne białka E1 i E2, które składają się ponownie w niekonwalencyjny heterodimer w retikulum endoplazmatycznym. W moich badaniach wykazałam, że heterodimer E1E2 pochodzący z systemu *Leishmania* nie jest cięty efektywnie przez proteazę, co sugerowało na brak specyficznej proteazy w komórkach *Leishmanii*. Mimo tego, oba warianty E1E2 charakteryzowały się poprawną funkcjonalnością. Po pierwsze, dzięki udostępnieniu panelu ludzkich monoklinalnych przeciwciał (CBH-7, CBH-4G, CBH-4B, HC-1, HC-11)

przez prof. Stevena Founa z Uniwersytetu Stanforda, w obu badanych formach E1E2 zlokalizowałam szereg konformacyjnych epitopów kluczowych w zachowaniu ich prawidłowej konformacji oraz odgrywających ważną rolę w neutralizacji wirusa. Po drugie, wykazałam także zdolność obu wariantów do oddziaływań z receptorem CD81 będącym głównym receptorem wejścia wirusa do komórki gospodarza. Oba warianty E1E2 zostały z powodzeniem oczyszczone przy użyciu chromatografii powinowactwa. Warto dodać, że dołączenie znacznika Strep-tag do pełnej długości formy E1E2 pozwoliło na bardzo efektywne, jedno-etapowe oczyszczenie rekombinowanego białka z ekstraktu komórkowego. Następnie oczyszczone formy E1E2 zostały podane myszom BALB/c w obecności adjuwantu Addavax. Wyniki immunizacji okazały się bardzo obiecujące, gdyż po trzecim podaniu antygenów otrzymałam bardzo wysokie miana specyficznych przeciwciał.

Najwyższa odpowiedź immunologiczna została odnotowana przeciwko genotypowi 1a, 1b, 5 i 6 analizując reakcje krzyżowe surowic z heterodimerami E1E2 pochodzącymi od różnych genotypów i subtypów wirusa za pomocą testu ELISA. Najniższą odpowiedź zaobserwowałam wobec genotypu 2a i 3a. Wnioski z przeprowadzonych badań pokrywają się z danymi literaturowymi, odnosząc się do profilu reaktywności przeciwciał po immunizacji E1E2 pochodzącego z genotypu 1a w stosunku do innych genotypów wirusa. Wcześniejsze badania pokazują, że w większości przypadków immunizacja E1E2 z genotypu 1a (szczep H77), który został wyprodukowany w komórkach ssaczych, pobudza odpowiedź przeciwciał o niskiej zdolności neutralizacji wobec genotypów 2 i 3^{21-23,29}. Uzyskane przez nas wyniki reaktywności krzyżowej są zgodne z tymi obserwacjami i potwierdzają ograniczoną reaktywność wobec genotypów 2a i 3a, w przeciwieństwie do genotypów 1a, 1b, 5 i 6. Niemniej jednak, pomimo ograniczonej reaktywności wobec E1E2 genotypu 2a w teście ELISA, obie grupy surowic były zdolne do neutralizacji HCV pochodzącego z genotypu 2a *in vitro* w hodowli komórkowej, a wysokie miana surowic uzyskanych w wyniku immunizacji dwoma różnymi formami E1E2 stanowią z pewnością obiecujący punkt wyjścia do dalszych prac badawczych.

Powyższe wyniki badań sugerują w przyszłości połączenie E1E2 z genotypu 1, 2 i 3 w jeden preparat szczepionkowy, który gwarantowałby uzyskanie pełnej i uniwersalnej odpowiedzi przeciwciał neutralizujących celującej we wszystkie genotypy wirusa. I rzeczywiście w późniejszych latach zaproponowano szczepionkę pięciowalentną składającą się z E1E2 pochodzącego z genotypu 1a, 1b, 2a, 3a i 6a, która efektywniej wzbudzała pan-genotypową odpowiedź przeciwciał w modelu mysim niż E1E2 w formie monowalentnej³³. Podsumowując, E1E2 wyprodukowany w komórkach pierwotniaka wydaje się ciekawą i tańszą opcją do produkcji antygeny szczepionkowego na wysoką skalę w obliczu trudności i kosztów związanych z produkcją E1E2 w komórkach ssaczych. Nasze badania oraz badania przeprowadzone przez inne grupy badawcze wskazują na opracowanie mieszaniny antygenów E1E2 pochodzących z różnych genotypów w celu zwiększenia zakresu krzyżowej neutralizacji co zwiększyłoby szansę opracowania skutecznej, uniwersalnej szczepionki przeciwko HCV.

4.3.3 Opracowanie chimerycznych cząstek wirusopodobnych HBV/HCV prezentujących konserwowane epitopy glikoproteiny E2 HCV

Duża zmienność i różnorodność genetyczna wirusa, obejmująca 8 głównych genotypów oraz ponad 100 podtypów, które mogą różnić się sekwencją nukleotydową nawet o 30-40% jest jedną z największych przeszkód w opracowaniu skutecznej szczepionki¹⁵. Dlatego obiecującym trendem w projektowaniu efektywnego preparatu szczepionkowego o szerokim spektrum neutralizacji jest ukierunkowanie na silnie konserwowane rejony w

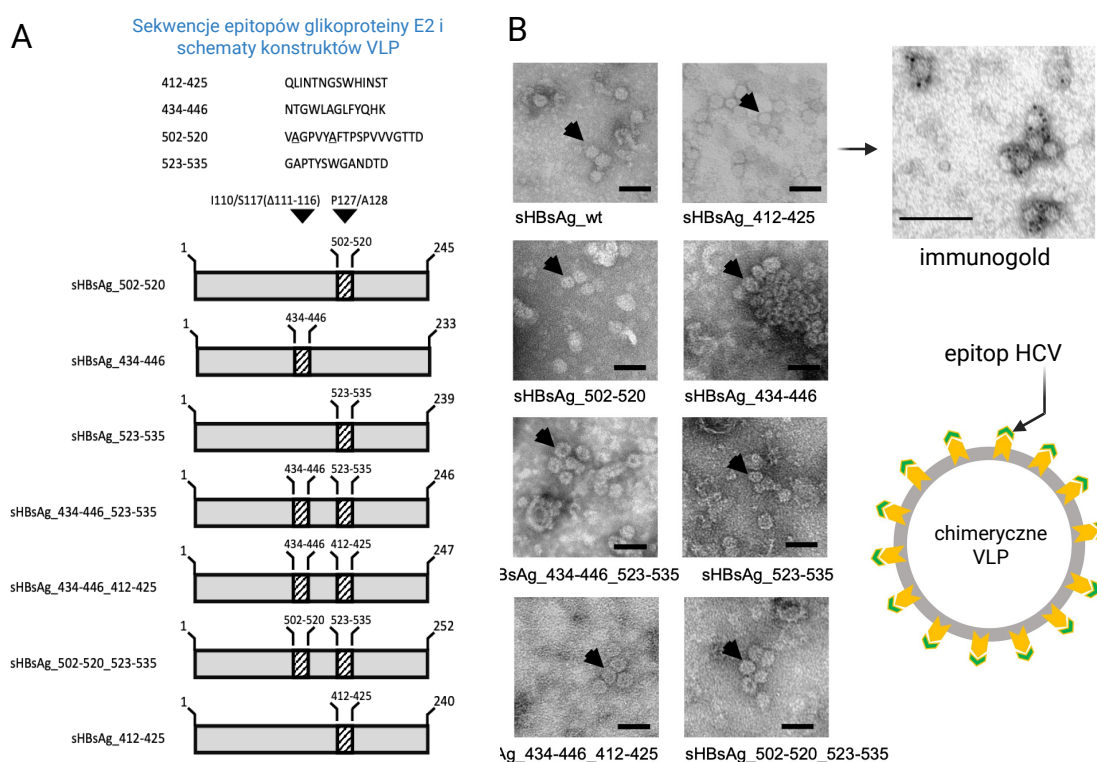
glikoproteinie E2, co może gwarantować uniwersalność szczepionki. Jednym z takich regionów jest epitop I, położony w pozycji 412-423 w glikoproteinie E2, który jest celem dla wielu przeciwciał neutralizujących, w tym także dla dobrze poznanego przeciwciała monoklonalnego AP33, charakteryzującego się szerokim spektrum neutralizacji wobec wirusów pochodzących z różnych genotypów^{34,35}. Aby wzbudzić skuteczną odpowiedź immunologiczną przeciwko epitopowi I postanowiłam zaprezentować go na małym białku powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B (sHBsAg), które samoistnie tworzy cząstki wirusopodobne VLP^{36,37}. VLP to struktury rekombinowanych białek morfologicznie bardzo podobne do naturalnych wirionów. Ze względu na strukturalne podobieństwo do naturalnie występujących wirionów i brak materiału genetycznego są bezpieczne i wysoce immunogenne. Dzięki multimerycznej i przestrzennej strukturze bardzo skutecznie aktywują odpowiedź humoralną oraz komórkową³⁸. Białko sHBsAg oprócz tego, że jest stosowane na całym świecie jako komercyjna szczepionka przeciwko wirusowi HBV może mieć również zastosowanie jako nośnik obcych antygenów ze względu na swój duży potencjał immunogeny³⁹. Na charakterystykę i zastosowanie chimerycznych VLP HBV/HCV prezentujących epitop I, jako potencjalnej biwalentnej szczepionki przeciwko dwóm poważnym wirusom hepatopowym otrzymałam finansowanie w ramach projektu LIDER z Narodowego Centrum Badań i Rozwoju w 2012 roku a opracowanie powyższych VLP było głównym zadaniem doktorantki Anny Czarnoty, której byłam promotorką pomocniczą - zatrudnionej początkowo w ramach projektu jako wykonawczyni.

W drugiej publikacji z cyklu po raz pierwszy opisaliśmy produkcję chimerycznych VLP HBV/HCV opartych na białku sHBsAg w systemie ekspresyjnym *Leishmania tarentolae*. Prawidłowe tworzenie się cząstek wirusopodobnych prezentujących epitop I na powierzchni potwierdziliśmy techniką immunobarwienia z użyciem transmisyjnego mikroskopu elektronowego, w której użyliśmy monoklonalnych przeciwciał AP33 wiążących się do epitopu I oraz przeciwciał drugorzędowych skoniugowanych z nanocząsteczkami złota (Rycina 3). Technika immunobarwienia udało nam się z sukcesem zastosować dzięki szkoleniu praktycznemu w Holandii w Wageningen, które odbyłam wraz z doktorantką w 2015 roku. W kolejnym etapie, przeprowadzone przez nas badania odpowiedzi immunologicznej w modelu mysim wykazały, że chimeryczne VLP są wysoce immunogenne wzbudzając zarówno odpowiedź komórkową przeciwko białku sHBsAg, jak i humoralną w postaci przeciwciał wiążących syntetyczny peptyd odpowiadający sekwencji obejmującej aminokwasy 412-425 w glikoproteinie E2 oraz białko nośnikowe sHBsAg pochodzenia drożdżowego. Wykazanie odpowiedzi przeciwko białku nośnikowemu sHBsAg było kluczowe w opracowaniu biwalentnej szczepionki profilaktycznej przeciwko dwóm wirusom HBV i HCV a także dowodem na to, że wstawienie sekwencji epitopu I HCV w hydrofilową immunogenną pętlę białka sHBsAg nie zaburzyło odpowiedzi przeciwciał skierowanych przeciwko HBV.

Najnowsze badania strukturalne heterodimeru E1E2 dostarczyły cennych informacji na temat mechanizmów wiązania wirusa z receptorami komórkowymi oraz interakcji z przeciwciałami. Umożliwiły również identyfikację kilku miejsc antygenowych w glikoproteinie E2, w tym regionów rozpoznawanych przez szeroko neutralizujące przeciwciała, które mogłyby odegrać kluczową rolę w racjonalnym projektowaniu szczepionek. W wyniku przeprowadzonych badań strukturalnych zaproponowano tzw. powierzchnię neutralizującą białka E2, obejmującą aminokwasy w pozycjach 412-446 oraz 525-535, która zawiera pętlę wiążącą receptor CD81 oraz kilka epitopów neutralizujących o charakterze liniowym i konformacyjnym⁴⁰⁻⁴².

Ze względu na wysoką immunogenność chimerycznych VLP HBV/HCV prezentują-

cych epitopów I postanowiliśmy zaprojektować kolejne VLP eksponujące inne silnie konserwowane epitopy w obrębie sekwencji glikoproteiny E2, aby zaproponować szczepionkę celującą w więcej niż jeden epitop wirusa HCV. Celowanie w bardziej konserwowane epitopy w obrębie glikoproteiny E2 uznaje się obecnie za najbardziej obiecujące podejście w opracowywaniu szczepionek ukierunkowanych na indukcję przeciwciał szeroko neutralizujących. Dlatego w koncepcji kolejnych badań uwzględniliśmy oprócz epitopu I 412-425 także rejony 434-446, 502-520 oraz 523-535 (Rycina 3A). Regiony te są silnie konserwowane w obrębie sekwencji glikoproteiny E2 i odgrywają kluczową rolę w oddziaływaniu E2 z receptorem wejścia CD81 zlokalizowanym na powierzchni komórki gospodarza. W związku z tym, mogą stanowić idealny cel dla przeciwciał neutralizujących a wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko wielu konserwowanym rejonom jest racjonalnym podejściem w uzyskaniu uniwersalnej szczepionki.



Rycina 3: Schemat konstrukcji chimerycznych VLP HBV/HCV. A – sekwencje epitopów z glikoproteiny E2 wirusa HCV oraz schemat konstrukcji przedstawiający insercję epitopów HCV w sekwencję hydrofilowej pętli małego białka powierzchniowego wirusa HBV (sHBsAg). Miejsce insercji oznaczone jest czarnymi strzałkami. B – schematyczne przedstawienie chimerycznej cząstki VLP eksponującej epitop HCV oraz zdjęcia cząstek wykonane podczas obserwacji z udziałem mikroskopu elektronowego. Dodatkowo po prawej potwierdzenie ekspozycji epitopu 412-425 na powierzchni sHBsAg przy użyciu techniki immunobarwienia z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z 6 nm cząsteczkami złota. Na podstawie publikacji Czarnota *i in.*, 2016 i 2020.

W trzeciej publikacji z cyklu, sekwencje kodujące powyższe rejony zostały wstawione pojedynczo lub w kombinacjach do sekwencji białka sHBsAg. Do produkcji VLP użyliśmy wcześniej opisanego systemu *L. tarentolae* a prawidłowe składanie się cząsteczek zostało

potwierdzone w transmisyjnym mikroskopie elektronowym (Rycina 3B). W celu zbadania immunogenności zaprojektowanych VLP zaszczepiliśmy osiem grup myszy BALB/c. Po przeprowadzeniu kompletnego cyklu immunizacji, we wszystkich surowicach badanych grup myszy potwierdziliśmy wysokie miana swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko peptydom odpowiadającym sekwencjom epitopów w obrębie glikoproteiny E2 prezentowanych na powierzchni poszczególnych chimerycznych VLP. Zaobserwowaliśmy jednak różnice w (1) reaktywności surowic z białkiem nośnikowym sHBsAg, (2) w profilu wiązania surowic z heterodimerami E1E2 pochodzącymi z różnych genotypów wirusa w warunkach redukująco-denaturujących i natywnych a także w (3) profilu neutralizacji. Główne wnioski płynące z przeprowadzonych badań wskazują na to, że VLP prezentujące na swojej powierzchni jeden epitop wirusa HCV wydajnie pobudzają odpowiedź przeciwciał przeciwko białku nośnikowemu sHBsAg z wyjątkiem epitopu 434-446, który możliwe, że zmienia nieznacznie strukturę pętli hydrofilowej białka sHBsAg i w konsekwencji VLP niosące ten epitop tracą zdolność do wzbudzania odpowiedzi przeciwo białku nośnikowemu, podobnie jak VLP prezentujące na swojej powierzchni podwójne epitopy. Natomiast testy ELISA wykazały, że do natywnych form E1E2 pochodzących z różnych genotypów wirusa były w stanie związać się przeciwciała wzbudzone tylko przez VLP prezentujące epitopy 412-425 i 523-535.

Będąc na konferencji w Dublinie nawiązałam współpracę z prof. Judith Gottwein z Uniwersytetu w Kopenhadze. Zespół prof. Gottwein dysponuje szerokim wachlarzem różnych genotypów wirusa oraz dużym doświadczeniem z zakresu przeprowadzania testów neutralizacji w badaniach nad szczepionką przeciwko HCV. W ramach współpracy postanowiliśmy zbadać zdolności neutralizujące przeciwciał wzbudzonych przez VLP prezentujące epitopy 412-425 oraz 523-535, gdyż tylko one wiązały się do natywnych form E1E2 pochodzących z różnych genotypów wirusa w teście ELISA. Bardzo dobrą neutralizację zaobserwowaliśmy jedynie w surowicach zwierząt immunizowanych VLP, które eksponowały epitop 412-425. Najsilniejszą skuteczność neutralizacji wykazaliśmy wobec wirusów z genotypów 1a, 1b, 4a oraz 5a. Z niższą skutecznością przeciwciała neutralizowały wirusy pochodzące z genotypów 2a i 2b. Natomiast w przypadku wirusów o genotypach 3a i 6a zaobserwowaliśmy mniej niż 50% neutralizacji przy najwyższym badanym stężeniu przeciwciał. Różnice w poziomach neutralizacji poszczególnych genotypów przez przeciwciała wzbudzone przez VLP sHBsAg_412-425 mimo podobnej sekwencji aminokwasowej rejonu 412-425 sugerują wpływ zjawiska przysłaniania epitopu, którego intensywność może się różnić w obrębie genotypów w zależności od różnic i zmian w sekwencji poza rejonem 412-425, które mogą wpływać na konformację całego heterodimeru E1E2. Może to mieć wpływ na dostępność poszczególnych epitopów dla przeciwciał neutralizujących w obrębie różnych genotypów wirusa. Dodatkowo, nasze wyniki podkreślają trudność w uzyskaniu uniwersalnego antygeny nawet przy strategii celującej w konserwowane rejony glikoproteiny E2, których dostępność może być różna w zależności od wariantu wirusa. Podsumowując, w prezentowanej pracy przeprowadzone badania w tym testy neutralizacji potwierdziły, że epitop I jest najbardziej obiecującym celem dla profilaktycznych szczepionek.

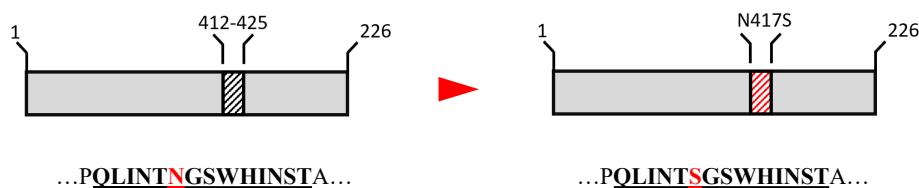
Wirus HCV znany jest z wielu mechanizmów unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dzięki tym zdolnościom jego infekcja może przechodzić w przewlekły stan choroby. Strategie ucieczki wirusa przed odpowiedzią immunologiczną niezwykle utrudniają projektowanie nowych kandydatów na szczepionki. Ponadto, HCV potrafi wyselekcjonować szereg wariantów, które są nierozpoznawane przez układ immunologiczny. Odpowiedzialne za to są głównie hiperzmiennie rejony w obrębie glikoproteiny E2, czę-

sto określane jako „immunologiczna przynęta”, które są głównym celem dla przeciwciał neutralizujących. Jednak przez to, że charakteryzują się wysoką zmiennością pozwalają wirusowi na skuteczną ucieczkę przed neutralizacją⁴³. Obie glikoproteiny wirusa, zarówno E1 jak i E2, są silnie glikozylowane. Wiele prac wykazało też związek N-glikozylacji heterodimeru E1E2 z ucieczką wirusa przed odpowiedzią humoralną gospodarza poprzez tworzenie tak zwanej „tarczy glikanowej”, która stanowi przeszkodę w wiązaniu przeciwciał neutralizujących w obrębie E1E2^{44,45}.

Istotna jest także inna forma ucieczki wirusa, związana z przesunięciem miejsc N-glikozylacji (z ang. *glycan shift*), która została opisana dla epitopu I (412-423). Epitop I, będący celem licznych przeciwciał neutralizujących, zawiera miejsce N-glikozylacji w pozycji N417. Substytucje N417S/T mogą przesunąć glikozylację z N417 na N415. Takie przesunięcie skutecznie maskuje rozpoznanie epitopu I przez przeciwciała neutralizujące skierowane przeciwko glikoproteinie E2. Chociaż warianty HCV zawierające mutacje przesunięcia glikanu (N417S/T) występują w populacji rzadko, ich obecność jest wyraźnie promowana w warunkach selekcyjnych, takich jak immunoterapia z użyciem silnie neutralizujących przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko epitopowi I^{42,46}. Dlatego w kontekście szczepionek ukierunkowanych na konserwowany epitop I istotne jest uwzględnienie obu wariantów glikozylacji oraz opracowanie antygenów zdolnych do zablokowania tej formy ucieczki wirusa.

W naszych dotychczasowych badaniach wykazaliśmy, że cząstki wirusopodobne oparte na sHBsAg, prezentujące epitop I glikoproteiny E2 HCV, są silnie immunogenne i indukują przeciwciała neutralizujące różne genotypy wirusa. W związku z tym, w czwartej pracy z cyklu postanowiliśmy zaproponować dodatkowy antygen także w postaci VLP, który wzbudzałby odpowiedź przeciwciał również przeciwko wariantom ucieczkowym związanym ze zjawiskiem przesunięcia glikanów. Epitop I posiada miejsce N-glikozylacji N417. Zmiana N417 na S417 lub T417 powoduje przesunięcie N-glikanu z pozycji N417 na pozycję N415. Konstrukt sHBsAg_N417S został zaprojektowany poprzez wprowadzenie zmiany N417S do sekwencji epitopu HCV w VLP sHBsAg_412-425 eksponujących epitop 412-425 typu dzikiego (Rycina 4). Cząstki wirusopodobne (VLP) zawierające epitop 412-425 typu dzikiego oraz z mutacją N417S zostały wyprodukowane w systemie *Leishmania tarentolae*. Do ich charakterystyki zastosowaliśmy przeciwciało AP33, rozpoznające epitop I typu dzikiego, charakteryzujące się szerokim spektrum neutralizacji. Wbrew wcześniejszym doniesieniom dotyczącym braku wiązania AP33 do kompleksu E1E2 z mutacją N417S, wykazaliśmy, że przeciwciało to wiąże skutecznie zarówno epitop 412-425:WT, jak i N417S prezentowany na powierzchni VLP, co najprawdopodobniej wynika z różnic konformacyjnych związanych z prezentacją epitopu w porównaniu do prezentacji tego epitopu w natywnym heterodimerze E1E2. Wynik ten został potwierdzony również w ssaczym systemie ekspresji białek (HEK293FreeStyle), wykluczając wpływ specyficznej dla *Leishmanii* N-glikozylacji.

Z kolei badania immunogenności przeprowadzone w modelu mysim BALB/c wykazały, że zarówno VLP sHBsAg_412-425, jak i sHBsAg_N417S są immunogenne i indukują przeciwciała rozpoznające sekwencje peptydów obejmujących epitop I niezależnie od obecności mutacji N417S. Istotne różnice zaobserwowaliśmy jednak w wiązaniu przeciwciał do glikoprotein E1E2 oraz w neutralizacji HCV pochodzącego z hodowli komórkowej (HCVcc) pomiędzy surowicami otrzymanymi po immunizacji VLP sHBsAg_412-425 i sHBsAg_N417S. Surowice sHBsAg_412-425 skutecznie wiązały E1E2:WT w formie natywnej, w przeciwieństwie do ich wariantu N417S. Z kolei surowice sHBsAg_N417S rozpoznawały jedynie wariant glikoprotein z mutacją E1E2:N417S. W testach neutralizacji



Rycina 4: Schemat tworzenia chimerycznego konstrukt sHBsAg_N417S poprzez wprowadzenie zmiany N417S do sekwencji epitetu 412-425 wirusa HCV. Na podstawie publikacji Czarnota *i in.*, 2023.

przeprowadzonych we współpracy z zespołem z Uniwersytetu w Kopenhadze przeciwciała wzbudzone przez VLP sHBsAg_412-425, podobnie jak przeciwciała AP33, skutecznie neutralizowały izolaty HCV genotypów 1a, 2a typu dzikiego, ale nie ich warianty z mutacją N417S. Natomiast przeciwciała wzbudzone przez VLP sHBsAg_N417S wykazywały bardzo ograniczoną aktywność neutralizującą, nawet wobec wirusów zawierających mutację ucieczkową, czyli izolat H77 z genotpu 1a zawierający mutację N417S a także izolat HK6a z genotypu 6a zawierający mutację N417T.

W prezentowanym badaniu zaobserwowaliśmy także uderzające podobieństwa w profilu wiązania glikoprotein E1E2 oraz skuteczności neutralizacji HCV pomiędzy surowicami sHBsAg_412-425 a przeciwciałem AP33, co sugeruje, że immunizacja myszy VLP sHBsAg_412-425 może prowadzić do powstania przeciwciał bardzo podobnych do AP33. Profil wiązania surowicy sHBsAg_412-425 był zbliżony do przeciwciała AP33 i wykazał zależność od aminokwasów L413, G418, W420 oraz N415 w obrębie epitetu. Powyższe badanie było możliwe dzięki współpracy z prof. Arvindem Patelem z Uniwersytetu w Glasgow, który udostępnił nam wektory wszystkich mutantów alaninowych obejmujących sekwencję epitetu I wprowadzonych do sekwencji heterodimeru E1E2 z genotypu 1a.

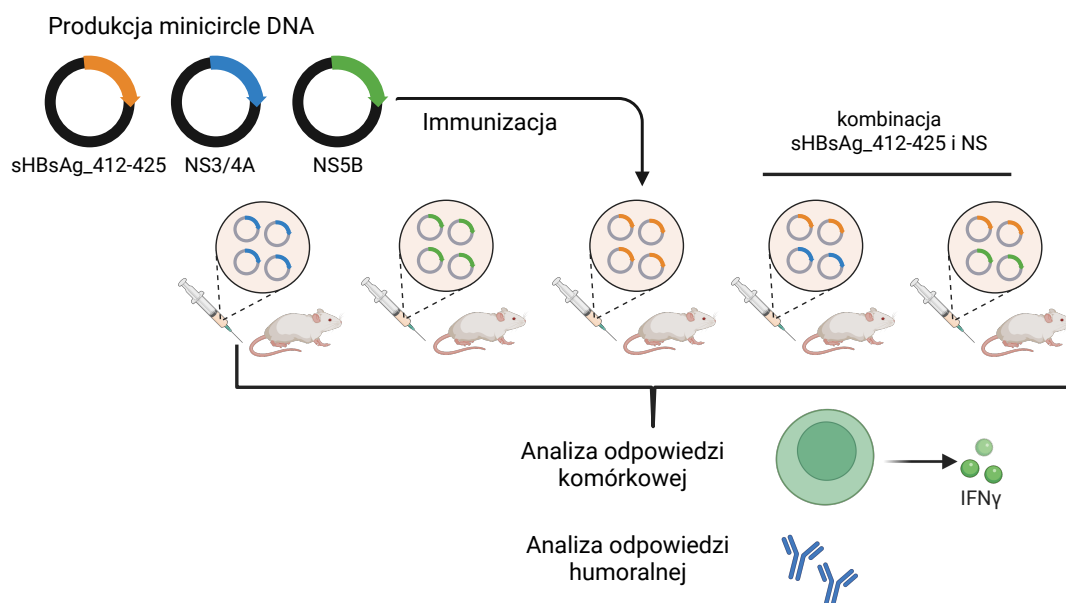
Mimo, że nie otrzymaliśmy skutecznej odpowiedzi przeciwciał przeciwko wariantowi N417S z mutacją ucieczkową, nasze wyniki wskazują na złożoną zależność pomiędzy przeciwciałami skierowanymi przeciwko epitetowi I, stanem glikozylacji E1E2 oraz konformacją lokalną epitetu i całej struktury E1E2. Powyższa praca podkreśla znaczenie przeciwciał skierowanych przeciwko epitetowi I i stanowi wstępny krok w kierunku badań nad zaprojektowaniem antygeny zdolnego do indukowania odpowiedzi immunologicznej przeciwko wariantom epitetu I uwzględniającym mutacje ucieczkowe związane z przesunięciem glikanu.

4.3.4 Opracowanie szczepionki DNA opartej na technologii „minicircle DNA”

We wcześniejszych badaniach, wraz z zespołem projektowym, wykazałam zdolność chimerycznych VLP sHBsAg_412-425 do wzbudzania przeciwciał o szerokim spektrum działania wobec różnych genotypów wirusa. Wyniki badań klinicznych, a także tych przeprowadzonych z udziałem szczurzego wirusa zapalenia wątroby (RHV) sugerują, że tylko równoczesne pobudzenie odpowiedzi humoralnej i komórkowej może być kluczem do skutecznego zwalczania wirusa⁴⁷. Dlatego celem kolejnego badania było opracowanie szczepionki angażującej obie gałęzie adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej, co gwarantowałyby silniejszą ochronę przed zakażeniem HCV. Na powyższe badania otrzymałam finansowanie w ramach projektu NCN OPUS 14, którego celem było zbadanie immunogenności konserwowanych epitetów rejonu NS w fuzji z wcześniej opisaną przez nas

chimeryczną cząstką sHBsAg_412-425. Założeniem projektu było zaprojektowanie jednej chimerycznej cząstki VLP wywołującej pełną odpowiedź immunologiczną w postaci przeciwciał oraz limfocytów T przeciwko wirusowi HCV. Mimo podjętych prób nie udało nam się uzyskać wydajnej ekspresji zaprojektowanych cząstek VLP, ale cel zaprojektowania szczepionki wzbudzającej pełną odpowiedź immunologiczną przeciwko HCV był inspiracją do dalszych badań. W związku z tym, w piątej publikacji z cyklu zaproponowaliśmy szczepionkę DNA opartą na technologii „minicircles” (MC) jako alternatywną metodę dostarczania antygeny w porównaniu do konwencjonalnych wektorów plazmidowych.

Szczepionki oparte na DNA wykazały do tej pory zdolność do wywoływania zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej przeciwko różnym patogenom, w tym także wirusowi HCV^{48,49}. Najnowsze badania wykorzystujące DNA kodujące heterodimer E1E2 lub białka niestrukturalne (NS) wirusa podkreślają potencjał tych rozwiązań w badaniach klinicznych^{50,51}. Choć szczepionki DNA pierwszej generacji cechowały się niską immunogennością u ludzi, postępy technologiczne znacząco zwiększyły ich skuteczność⁵². Ostatnio, szczególną uwagę zwraca technologia minicircle DNA (MC), uznawana za obiecującą metodę dostarczania genów. MC to małe wektory DNA pochodzące od plazmidów rodzicielskich (z ang. *parental plasmids*, PP), pozbawione bakteryjnych sekwencji, co zwiększa ich bezpieczeństwo i umożliwia wyższy poziom ekspresji antygeny. MC mogą być stosowane *in vivo* jak i *in vitro*, zapewniając długotrwałą ekspresję antygeny bez ryzyka wystąpienia reakcji immunologicznej, która może być wywołana przez część bakteryjną plazmidu obecną w tradycyjnych plazmidach stosowanych jako wektory we wielu terapiach genowych^{53,54}. Technologia MC znalazła do tej pory zastosowanie w niewielu dziedzinach, ale przyniosła obiecujące wyniki, dostarczając nowych informacji i rozwiązań w zakresie terapii genowej, w tym przeciwnowotworowej.⁵⁵⁻⁵⁹



Rycina 5: Schemat immunizacji plazmidami typu „minicircles” (MC) kodującymi chimeryczne VLP HBV/HCV (sHBsAg_412–425), NS3/4A oraz NS5B. Na podstawie publikacji Czarnota *i in.*, 2024. Utworzono za pomocą BioRender.com

W toku naszych prac byliśmy ciekawi czy zaproponowany konstrukt VLP sHBsAg_412–

425 były w stanie wzbudzić funkcjonalne przeciwciała wykorzystując platformę DNA oraz czy dodanie sekwencji białek wirusowych z rejonu niestrukturalnego NS pobudziłyby efektywnie drugą gałąź odpowiedzi immunologicznej w postaci limfocytów T. Dlatego w piątej publikacji z cyklu zaprojektowaliśmy trzy rodzaje MC kodujących chimeryczne VLP HBV/HCV, oraz dwa białka wirusowe z rejonu NS, wirusową proteazę NS3/4A oraz polimerazę NS5B HCV a ocenę ich immunogenności badaliśmy w modelu mysim (Rycina 5). W wyniku zastosowanej kombinacji szczepień MC kodujących sHBsAg_412–425 z MC kodującymi białka rejonu NS uzyskaliśmy pełną odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusowi HCV. Wyniki sugerują, że jednoczesne podanie MC kodujących sHBsAg_412–425 oraz białka NS indukowało silną odpowiedź komórkową, szczególnie wobec białka NS3, a także wysokie miana przeciwciał swoistych wobec glikoproteiny E2 HCV. Co więcej, uzyskane przeciwciała rozpoznawały natywne heterodimery E1E2 pochodzące z różnych genotypów wirusa oraz wykazywały profil wiązania do mutantów alaninowych E1E2 porównywalny do szeroko neutralizującego przeciwciała AP33.

Podsumowując, powyższe wyniki wskazują na to, że szczepionka DNA oparta na technologii MC, zawierająca sekwencje kodujące zarówno sHBsAg_412–425, jak i białka NS HCV, wzbudza silną odpowiedź komórkową oraz przeciwciała o właściwościach zbliżonych do neutralizującego przeciwciała AP33. Ze względu na trudność uzyskania szczepionki wzbudzającej skutecznie obie gałęzie odpowiedzi immunologicznej nasze badania podkreślają duży potencjał zastosowanej powyżej kombinacji antygenów jako profilaktycznej szczepionki o działaniu pan-genotypowym przeciwko HCV.

4.4 Podsumowanie najważniejszych osiągnięć wynikających z zaprezentowanego cyklu prac

Na podstawie zaprezentowanego cyklu pięciu prac można wyznaczyć następujące najważniejsze osiągnięcia:

- Zastosowanie po raz pierwszy systemu ekspresji opartego na pierwotniaku *Leishmania tarentolae* stanowiącego realną i bardziej ekonomiczną alternatywę dla komórek ssaczych do efektywnej produkcji antygenów szczepionkowych wzbudzających silną i specyficzną odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusowi HCV.
- Opracowanie funkcjonalnych form heterodimerów E1E2 wzbudzających specyficzną odpowiedź przeciwciał skierowanych przeciwko wirusowi HCV.
- Opracowanie poprawnie złożonych chimerycznych cząstek wirusopodobnych VLP HBV/HCV prezentujących na swojej powierzchni konserwowane epitopy glikoproteiny E2 HCV i zbadanie właściwości neutralizujących wzbudzonych przez nie przeciwciał w modelu mysim.
- Identyfikacja cząstki VLP prezentującej epitop I (sHBsAg_412-425), jako najbardziej obiecującego celu dla szczepionki profilaktycznej wzbudzającej przeciwciała o szerokim spektrum neutralizacji, która może stanowić podstawę biwalentnej szczepionki przeciwko dwóm hepatotropowym wirusom HCV i HBV lub służyć jako komponent preparatu szczepionkowego wzmacniający pan-genotypową humoralną odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusowi HCV.
- Zbadanie efektu przesunięcia glikanu z pozycji N417 na N415 w obrębie epitopu I glikoproteiny E2 HCV.

- Opracowanie szczepionki DNA łączącej antygeny strukturalne i niestrukturalne HCV opartej na niekonwencjonalnej technologii „minicircle DNA” (MC), zastosowanej po raz pierwszy do jednoczesnego pobudzenia odpowiedzi humoralnej i komórkowej przeciwko wirusowi HCV.

Pomimo intensywne badań prowadzonych na całym świecie, szczepionka przeciwko wirusowi HCV wciąż pozostaje niedostępna. Poszukiwanie nowych kandydatów szczepionkowych jest zatem niezwykle ważnym i aktualnym wyzwaniem. W ramach badań realizowanych przeze mnie oraz przez zespół, którym kieruję, zaproponowaliśmy i opracowaliśmy nowe koncepcje racjonalnie zaprojektowanej szczepionki przeciwko HCV.

Na szczególne podkreślenie zasługuje fakt, że w naszych pracach po raz pierwszy wykorzystaliśmy system ekspresyjny oparty na pierwotniaku *Leishmania tarentolae* do produkcji pełnej i skróconej formy heterodimeru E1E2 oraz cząstek wirusopodobnych VLP opartych na małym białku powierzchniowym wirusa HBV (sHBsAg). System ten umożliwił ich wydajną produkcję z zachowaniem istotnych modyfikacji potranslacyjnych, a szczególnie N-glikozylacji. Natomiast, zastosowana strategia prezentacji konserwowanego epitopu I glikoproteiny E2 HCV (aa412–425) na powierzchni cząstek sHBsAg tworzących VLP pozwoliła na uzyskanie silnej odpowiedzi humoralnej, w tym przeciwciał neutralizujących większość genotypów HCV, o profilu wiązania zbliżonym do dobrze scharakteryzowanego przeciwciała monoklonalnego AP33 o szerokim spektrum neutralizacji. Wykazaliśmy ponadto, że sHBsAg zastosowany jako nośnik epitopu I w chimerycznych cząstkach HBV/HCV zachowuje swoją immunogenność, wzbudzając zarówno swoistą odpowiedź humoralną, jak i komórkową. Wyniki te potwierdzają to, że chimeryczne cząstki VLP HBV/HCV (sHBsAg_412-425) mogą stanowić podstawę bivalentnej szczepionki przeciwko dwóm wirusom HBV i HCV. Natomiast zaobserwowane różnice w poziomie neutralizacji poszczególnych genotypów przez przeciwciała wzbudzone przez chimeryczne VLP sHBsAg_412–425 – mimo wysokiego podobieństwa sekwencji epitopu I pomiędzy analizowanymi genotypami – podkreślają także trudność w zaprojektowaniu uniwersalnego antygeny opartego na konserwowanych rejonach glikoproteiny E2, gdyż zmiany sekwencji poza epitopem I mogą wpływać na konformację całego heterodimeru E1E2 i dostępność epitopu dla przeciwciał neutralizujących. Dodatkowo, ze względu na występowanie glikowariantów epitopu I, zaprojektowanie cząstki VLP sHBsAg_N417S niosącej sekwencję regionu 412-425 E2 z mutacją ucieczkową N417S, pozwoliło na zbadanie właściwości wzbudzonych przez nią przeciwciał oraz efektu przesunięcia glikanu z pozycji N417 na N415. Badanie mechanizmów ucieczki wirusa przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza jest niezwykle ważne z punktu widzenia racjonalnie zaprojektowanych szczepionek, które zapobiegałyby tego typu strategiom wykorzystywanym przez wirusa.

Z kolei w naszych najnowszych badaniach postanowiliśmy po raz pierwszy zastosować technologię „minicircle DNA” (MC) jako platformę do zaprojektowania szczepionki przeciwko HCV bazującej na DNA. W celu zaangażowania obu gałęzi adaptacyjnej odpowiedzi immunologicznej przeciwko HCV, zaprojektowaliśmy szczepionkę zawierającą sekwencje kodujące zarówno chimeryczne VLP HBV/HCV (sHBsAg_412–425), jak i białka rejonu NS HCV. W wyniku zastosowanej kombinacji antygenów w jednym preparacie szczepionkowym otrzymaliśmy silną odpowiedź komórkową przeciwko białkom NS oraz humoralną w postaci przeciwciał skierowanych przeciwko epitopowi I o właściwościach zbliżonych do neutralizującego przeciwciała AP33.

Na powyższe badania pozyskałam finansowanie w ramach trzech grantów badawczych z NCN SONATA 3, NCN OPUS 14, NCBiR LIDER. W ramach realizowanych projektów

systematycznie poszerzałam również swoje kompetencje, uczestnicząc w licznych szkoleniach praktycznych i warsztatach. Należały do nich m.in. zaawansowany kurs ELISpot dotyczący analizy komórkowej odpowiedzi immunologicznej w Hamburgu, warsztaty z technik mikroskopii elektronowej w Wageningen w Holandii oraz warsztaty EURIPRED poświęcone zastosowaniu matryc peptydowych w immunologii i badaniach nad szczepionkami w Berlinie. Ukończyłam również certyfikowany kurs dla osób zaangażowanych w wykorzystanie zwierząt do celów naukowych i dydaktycznych.

Chciałabym podkreślić, że część opracowanych przez nas kandydatów na szczepionkę została objęta ochroną patentową – przyznano dwa patenty polskie i jeden europejski, na którego zgłoszenie otrzymałam także wsparcie finansowe z Centrum Transferu Technologii Uniwersytetu Gdańskiego. Dzięki realizowanym badaniom w ramach projektów wniosłam również cenny wkład w program badawczy całego Zakładu. Rozszerzyłam warsztat badań nad wirusem HCV, opracowałam szereg metod stosowanych w produkcji rekombinowanych białek, mikroskopii elektronowej oraz w badaniach odpowiedzi humoralnej i komórkowej. Wszystkie prace przedstawione w cyklu dotyczą badań na zwierzętach. W związku z tym, planowałam eksperymenty z udziałem zwierząt i przygotowałam szereg wniosków do Lokalnej Komisji Etycznej. Nawiązałam także współpracę z wiodącymi ośrodkami badań nad szczepionką HCV w Kopenhadze i Glasgow, która umożliwiła szczegółowe zbadanie właściwości przeciwciał wzbudzonych przez zaprojektowane przez nas chimeryczne cząstki VLP.

Przedstawiony cykl prac wyznacza nowe kierunki w racjonalnym projektowaniu szczepionki przeciwko HCV, łącząc innowacyjną platformę ekspresyjną, strategię prezentacji konserwowanych epitopów oraz technologię minicircle DNA w celu uzyskania skoordynowanej odpowiedzi humoralnej i komórkowej o potencjale pan-genotypowym.

4.5 Znaczenie uzyskanych wyników dla rozwoju dyscypliny biotechnologia

Badania, które zostały przeprowadzone w zaprezentowanym cyklu, mają istotne znaczenie dla rozwoju biotechnologii medycznej, szczególnie w obszarze projektowania nowej generacji szczepionek przeciwwirusowych. Wirus HCV pozostaje poważnym problemem zdrowia publicznego, dotyczącym blisko 50 milionów osób na całym świecie. Pomimo dostępności wysoce skutecznych leków o działaniu bezpośrednio przeciwwirusowym, brak efektywnej szczepionki przeciwko HCV utrudnia kontrolę i eliminację zakażeń, w wyniku czego liczba nowych przypadków wciąż rośnie. Rozwój szczepionki przeciwko HCV napotyka liczne wyzwania, takie jak duża różnorodność genetyczna wirusa czy brak odpowiednich modeli *in vivo* do testowania skuteczności szczepionek. Mimo tych przeszkód, badania nad szczepionką przeciwko HCV dynamicznie postępują. Innowacyjne strategie, obejmujące szczepionki podjednostkowe, cząstki wirusopodobne VLP, wektory wirusowe oraz szczepionki DNA i RNA, dostarczają wielu obiecujących wyników, a kontrolowany model zakażeń ludzi oferuje wyjątkową, choć etycznie złożoną, możliwość przyspieszenia prac nad szczepionką¹⁶.

Skuteczna szczepionka przeciwko HCV powinna równoważyć odpowiedź immunologiczną zależną od limfocytów B i T. Przeciwciała o szerokim spektrum neutralizacji mogą zapobiegać zakażeniu, natomiast swoista odpowiedź limfocytów T jest niezbędna do kontroli i eliminacji wirusa. Idealna szczepionka powinna łączyć antygeny strukturalne i niestrukturalne, aby wywołać zarówno silną odpowiedź przeciwciał, jak i wielofunkcyjną odpowiedź limfocytów T.

Ukierunkowanie szczepionek zarówno na białka strukturalne, jak i niestrukturalne HCV – poprzez różnorodne podejścia, które zastosowałam w naszych badaniach, od

rekombinowanej formy heterodimeru E1E2, poprzez chimeryczne VLP HBV/HCV, po platformę DNA opartą na technologii „minicircles DNA” – stwarza szansę na wzbudzenie długotrwałej i pan-genotypowej odpowiedzi immunologicznej. Na uwagę szczególnie zasługuje konstrukt sHBsAg_412-425, który może kandydować do biwalentnej szczepionki przeciwko dwóm hepatotropowym wirusom lub być wykorzystany jako komponent preparatu szczepionkowego wzmacniający pan-genotypową humoralną odpowiedź immunologiczną przeciwko wirusowi HCV zarówno w formie białkowej jak i DNA. Badania nad konserwowanymi epitopami oraz nad ich prezentacją wpisują się w kluczowe wyzwania współczesnej biotechnologii a uzyskanie uniwersalnej odporności pomimo dużej zmienności wirusa to obszar badań niezwykle ważny, zwłaszcza w kontekście przygotowania na przyszłe pandemie.

Przedstawione wyżej podejścia stanowią ważny wkład w rozwój bezpiecznych, skalowalnych technologii szczepionkowych oraz mają charakter uniwersalny, tzn. mogą być również wykorzystane do opracowania szczepionek przeciwko innym wirusom. Dzięki naszym badaniom a także badaniom prowadzonym przez różne zespoły na świecie eliminacja HCV za pomocą szczepień staje się realnym celem.

4.6 Dodatkowe osiągnięcia naukowe

Kandydat do stopnia doktora habilitowanego powinien wykazać się więcej niż jednym osiągnięciem naukowym, dlatego chciałabym przedstawić moje pozostałe osiągnięcia naukowe. Poniżej przedstawiam dwa dodatkowe osiągnięcia. Pierwsze z nich stanowią dwie publikacje wchodzące w skład mojej dodatkowej aktywności naukowej pochodzące z okresu mojego stażu podoktorskiego, który odbyłam we Włoszech. Wyniki, które uzyskałam, zostały opublikowane w dwóch czasopismach o wysokim IF: *Hepatology* i *Journal of Hepatology*. Obie publikacje są wynikiem współpracy wielu laboratoriów na świecie znanych z kluczowych badań i odkryć dotyczących wirusa HCV. Między innymi, jednym z współautorów jest prof. Charles Rice, który w 2020 roku zdobył nagrodę Nobla za odkrycie wirusa HCV.

Meuleman, P., Catanese, MT., Verhoye, L., Desombere, I., Farhoudi, A., Jones, CT., Sheahan, T., **Grzyb, K.**, Cortese, R., Rice, CM., Leroux-Roels, G., Nicosia, A. (2012). A human monoclonal antibody targeting SR-B1 precludes hepatitis C virus infection and viral spread *in vitro* and *in vivo*. *Hepatology*; 55, 364-72, doi:10.1002/hep.24692

IF₂₀₁₂ - 12,0; IF_{5-letni} - 14,5; MEiN₂₀₁₂ - 50; MEiN₂₀₂₅ - 200;
liczba cytowań - 113 (WoS)

Lacek, K., Vercauteren, K., **Grzyb, K.**, Naddeo, MR., Verhoye, L., Słowikowski, M., Fafi-Kremer, S., Patel, AH., Baumert, TF., Folgori, A., Leroux-Roels, G., Cortese, R., Meuleman, P., Nicosia, A. (2012). Novel human SR-B1 antibodies prevent infection and dissemination of HCV *in vitro* and in humanized mice. *Journal of Hepatology* 57, 17-23. doi:10.1016/j.jhep.2012.02.018

IF₂₀₁₂ - 9,85; IF_{5-letni} - 28,1; MEiN₂₀₁₂ - 45; MEiN₂₀₂₅ - 200;
liczba cytowań - 67 (WoS)

Głównym tematem moich badań podczas pobytu we Włoszech była charakterystyka nowych ludzkich monoklonalnych przeciwciał przeciwko receptorowi SR-B1 jako skutecz-

nych narzędzi immunoterapeutycznych np. w zapobieganiu reinfekcji przeszczepionej wątroby u pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV. Receptor SR-B1 podobnie jak receptor CD81 jest jednym z głównych receptorów komórkowych odpowiedzialnych za wejście wirusa do komórki, dlatego blokada tego receptora mogłaby skutecznie hamować wejście wirusa do komórki i uniemożliwić jego replikację⁶⁰.

Do zespołu prof. Alfredo Nicosia dołączyłam podczas prac nad charakterystyką przeciwciał przeciwko receptorowi SR-B1 o nazwie mAb16-71, o których mowa w publikacji opublikowanej w czasopiśmie *Hepatology*. W publikacji tej wykazaliśmy wysoką zdolność przeciwciał do zablokowania wejścia wirusa HCV do komórki *in vitro* z udziałem linii komórkowej Huh7.5 oraz z użyciem bardziej zbliżonego klinicznie modelu komórkowego, czyli spolaryzowanych pierwotnych hepatocytów, w których czynniki wnikania HCV lokalizują się w podobnych przedziałach komórkowych jak w naturalnych hepatocytach. Natomiast w modelu *in vivo* z udziałem modelu zwierzęcego w postaci chimerycznych myszy permissywnych dla wirusa HCV po wcześniej przeprowadzonej ksenotransplantacji ludzkich hepatocytów podanie przeciwciała mAb16-71 całkowicie chroniło zwierzęta przed zakażeniem HCV. W przeciwieństwie do zwierząt kontrolnych, u myszy, u których zastosowano terapię przeciwciałem mAb16-71 HCV RNA pozostawało niewykrywalne przez 12 tygodni obserwacji a terapia była dobrze tolerowana, bez istotnych zmian w parametrach biochemicznych w krwi badanych myszy. Podsumowując, w badaniach *in vivo* wykazano, że przeciwciała mAb16-71 całkowicie zapobiega zakażeniu hepatocytów. Dodatkowo, w doświadczeniu zastosowano trzy różne genotypy wirusa 1, 4 i 6 udowadniając uniwersalność potencjalnej immunoterapii skutecznej wobec różnych genotypów wirusa HCV.

Rozprzestrzenianie się HCV bezpośrednio z zakażonej komórki Huh-7.5 do sąsiednich, niezakażonych komórek (z ang. *cell-to-cell spread*), jest ważnym zagadnieniem ze względu na to, że umożliwia skuteczne namnażanie się wirusa pomijając jego ekspozycję na działanie układu immunologicznego gospodarza. W ramach badań objętych powyższą publikacją byliśmy ciekawi czy przeciwciała mAb16-71 jest w stanie zablokować również drogę transmisji wirusa *cell-to-cell*. Moja praca w ramach powyższej publikacji polegała głównie na badaniu transmisji wirusa z komórki do komórki. W poprzednich badaniach, z wykorzystaniem komórek docelowych Huh-7.5 EGFP-IPS/CD81⁻, w których selektywnie wyciszono ekspresję receptora CD81, wykazano, że rozprzestrzenianie HCV drogą komórka–komórka może zachodzić niezależnie od receptora CD81, który w dużej mierze odpowiedzialny jest za wnikanie wirusów w postaci wolnych cząstek. Ze względu na to, że komórki Huh 7.5 EGFP-IPS/CD81⁻ są niewrażliwe na infekcje HCV przenoszonym w postaci wolnej cząstki w eksperymencie badającym *cell-to-cell spread* użyto właśnie tej linii komórkowej jako komórek docelowych, aby sprawdzić, czy przeciwciała mAb16-71 jest zdolne do zablokowania alternatywnej drogi transmisji wirusa. W tym celu komórki Huh-7.5 zakażone wirusem HCVcc (genotyp 2a) zmieszano z niezakażonymi komórkami EGFP-IPS/CD81⁻ i hodowano w obecności rosnących stężeń przeciwciała mAb16-71. Zaobserwowano, zmniejszenie ilości zakażonych komórek EGFP-IPS/CD81⁻ w zależności od dawki przeciwciała, podczas gdy w obecności przeciwciała kontrolnego nie stwierdzono istotnych zmian w transmisji HCV.

Podsumowując, ostatecznie udało się udowodnić, że przeciwciała mAb16-71 skutecznie blokuje również mechanizm bezpośredniej transmisji wirusa z komórki do komórki, co jest niezwykle cenne z punktu widzenia późniejszej terapii związanej z zapobieganiem zakażenia nowo przeszczepionej wątroby u pacjentów z chronicznym przebiegiem choroby. Dodatkowo mAb16-71 skutecznie blokuje zakażenie HCV w postaci wolnych cząstek wi-

rusa a także może chronić przed zakażeniem *in vivo* w sposób niezależny od genotypu wirusa.

Równolegle pracowałam nad selekcją i charakterystyką nowych przeciwciał skierowanych przeciwko receptorowi SR-B1. Mój wkład w powstanie drugiej publikacji z okresu stypendium podoktorskiego opublikowanej w *Journal of Hepatology* dotyczy części eksperymentalnej związanej z selekcją i charakterystyką nowych przeciwciał mAb8, mAb15 i mAb151. W ramach publikacji przeprowadziłam szereg testów neutralizacji z użyciem systemu HCVcc w celu selekcji przeciwciał o najwyższym potencjale neutralizacji do testów *in vivo*.

System HCVcc to model eksperymentalny, który umożliwia hodowlę wirusa HCV w liniach komórkowych *in vitro* Huh7 pochodzących z ludzkiego raka wątrobowokomórkowego. System HCVcc opiera się głównie na zastosowaniu sekwencji z genotypu 2a wirusa (szczep JFH-1), co po raz pierwszy umożliwiło efektywną replikację i produkcję zakaźnych wirionów w hodowli komórkowej. Metoda polega na wprowadzeniu wirusowego RNA uzyskanego w wyniku transkrypcji *in vitro* do linii komórkowej Huh7. Obecnie, dzięki niemu można badać pełny cykl replikacyjny HCV, od wejścia wirusa do komórki, poprzez replikację, aż po produkcję nowych cząstek wirusowych. System HCVcc to przełomowe narzędzie, które znacznie przyczyniło się do postępów w badaniach nad wirusem HCV i rozwojem nowych terapii. Do czasu odkrycia tej metody badania nad wirusem były bardzo utrudnione, gdyż wirus pochodzący z surowicy pacjentów bardzo nieefektywnie namnażał się w hodowlach komórkowych.

Do ilościowej oceny zakażenia zastosowałam reporterową linię komórkową Huh7-J20 uzyskaną w laboratorium prof. Arvinda Patela, która po zakażeniu wirusem uwalnia do środowiska fosfatazę alkaliczną (SEAP). Podobnie jak w poprzedniej publikacji przeciwciała przetestowano również *in vivo* w modelu chimerycznych myszy a do infekcji oprócz wariantu H77C z genotypu 1a dodatkowo użyto wariantu mP05 z mutacją ucieczkową (genotyp 1b) wyizolowanego od pacjenta z chroniczną infekcją po przejściu przeszczepu wątroby. Mój wkład w powstanie tej publikacji oprócz części eksperymentalnej dotyczył dodatkowo selekcji i analizy danych, opracowania metodologii i przedstawienia graficznego danych eksperymentalnych. Brałam także udział w przygotowaniu oryginalnej wersji manuskryptu oraz jej edycji po uwagach recenzentów.

Podsumowując w obu pracach wykazano, że przeciwciała przeciwko receptorowi SR-B1 mogą stanowić nowe terapeutyczne narzędzie w zapobieganiu infekcji wirusem HCV nowo przeszczepionej wątroby u pacjentów z chronicznym przebiegiem choroby.

Jako drugi nurt badań niezwiązany z wirusem HCV, w których brałam udział to badania przeprowadzone nad potencjalnym zastosowaniem nanocząstek platyny w terapii przeciwnowotworowej w ramach współpracy z dr hab. Jackiem Piosikiem, prof. UG, kierownikiem Pracowni Biofizyki na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GU-Med. Mój wkład polegał przede wszystkim na ocenie biologicznego efektu nanocząstek platyny w kompleksie z lekami antracyklinowym – epirubicyną lub daunorubicyną – w ludzkich liniach komórkowych. Wyniki tych badań pozwoliły wykazać, że nanocząstki platyny modulują działanie leków, szczególnie epirubicyny, w sposób zależny od ich wielkości, nasilając jej cytotoksyczność w ludzkich komórkach nowotworowych (MelJuSo) i jednocześnie wykazując efekt ochronny w komórkach nienowotworowych (HaCaT). Stanowi to istotną przesłankę dla potencjalnego wykorzystania nanocząstek platyny w optymalizacji chemioterapii opartej na antracyklinach.

Nasza współpraca zaowocowała wartościowymi danymi naukowymi, które zostały opublikowane w dwóch czasopismach, a także stworzyła solidne podstawy do dalszych wspól-

nych działań. Mam nadzieję, że interdyscyplinarne podejście łączące biofizykę z wirusologią molekularną otworzy nowe możliwości w udoskonalaniu terapii przeciwnowotworowych i przeciwwirusowych.

Bełdzińska, P., Zakrzewski, M., **Grzyb, K.**, Hauer, A., Jamrógiewicz, M., Wyrzykowski, D., Bury, K., Gołuński, G., Piosik, J. (2025). Platinum nanoparticles interact with epirubicin in size dependent manner and affect its biological activity. *Eur J Pharm Biopharm.* Nov;216:114866. doi:10.1016/j.ejpb.2025.114866.

IF₂₀₂₅ – 4,3; IF_{5-letni} – 4,8; MEiN₂₀₂₅ – 100; liczba cytowań – 0 (WoS)

Zakrzewski, M., Bełdzińska, P., Gajdowska, F., Gołuński, G., Gackowska, K., Strankowska, J., Jamrógiewicz, M., Wyrzykowski, D., **Grzyb, K.**, Gutowska-Owsiak, D., Synak, A., Bojarski, P., Piosik, J. (2025). The effect of platinum nanoparticles on the physicochemical properties of daunorubicin. *RSC Adv.* Sep 25;15(42):35407-35420. doi:10.1039/d5ra02827b.

IF₂₀₂₅ – 4,6; IF_{5-letni} – 4,3; MEiN₂₀₂₅ – 100; liczba cytowań – 0 (WoS)

5 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

Moja dotychczasowa kariera naukowa charakteryzowała się dużym stopniem mobilności i różnorodnością podejmowanych zagadnień naukowych. Studia doktoranckie rozpoczęłam na Wydziale Biologii Geografii i Oceanologii Uniwersytetu Gdańskiego. Stopień naukowy doktora nauk biologicznych uzyskałam w 2007 roku. Pracę doktorską obroniłam z wyróżnieniem. W ramach doktoratu opublikowałam 4 oryginalne prace i uzyskałam szerokie doświadczenie w zakresie biologii morza oraz technik izolacji, oczyszczania i badania właściwości fizyko-chemicznych białek. Za osiągnięcia naukowe podczas realizacji pracy doktorskiej zostałam nagrodzona Nagrodą Rektora Uniwersytetu Gdańskiego w 2004 roku. Moje osiągnięcia doceniła także Fundacja Rozwoju Uniwersytetu Gdańskiego, która przyznała mi stypendium dla najlepszych młodych pracowników naukowych. Od zawsze uważałam, że staże w innych ośrodkach badawczych są ważnym elementem rozwoju i dlatego już podczas studiów doktoranckich aplikowałam o 3-miesięczne stypendium Marie-Curie na pobyt w Uniwersytecie w Trondheim w Norwegii (Norwegian University of Science and Technology (NTNU), Department of Biotechnology). Profil badań tego laboratorium koncentrował się głównie na środowisku morskim i charakterystyce białek i enzymów mięśniowych ryb, głównie łososi, których analiza jest ważnym elementem w kontroli ich jakości, co ma duże znaczenie w przetwórstwie i przemyśle rybnym. Pobyt w Norwegii był niezwykle cennym doświadczeniem związanym dodatkowo z tematyką mojego doktoratu. Po obronie doktoratu odbyłam krótki staż w Zakładzie Biologii Molekularnej Wirusów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG-GUMed (MWB UG-GUMed) pod kierownictwem prof. dr hab. Krystyny Bieńkowskiej-Szewczyk, który stał się inspiracją do zainteresowania się wirusologią i stworzył szansę aplikowania o stypendium Marie-Curie w ramach 6 PR UE w znakomitym zespole o międzynarodowej renomie kierowanym przez prof. Alfredo Nicosia w Neapolu.

Podczas 18-miesięcznego stażu podoktorskiego we Włoszech uczestniczyłam w bada-

niach w ramach projektu „*Entry inhibitors for the treatment of hepatitis C virus infection*”, którego celem było opracowanie innowacyjnych terapii przeciwwirusowych ukierunkowanych na proces wnikania HCV do komórki gospodarza, począwszy od badań podstawowych, po mające potencjalne zastosowania kliniczne. Proces wnikania HCV do komórki był wówczas słabo poznanym etapem z cyklu życiowego wirusa i stanowił obiecujący cel dla nowych strategii terapeutycznych. Projekt zakładał między innymi, identyfikację dodatkowych receptorów i czynników biorących udział we wnikaniu wirusa do komórki w tym także opracowanie i optymalizację ludzkich przeciwciał monoklonalnych blokujących skutecznie wejście HCV do komórki oraz ich produkcję w skali nadającej się do badań klinicznych. Dokładny opis mojej pracy w ramach stażu podoktorskiego w Neapolu znajduje się w podrozdziale 4.6. Firma Okairos (obecnie ReiThera), w której odbywałam staż podoktorski specjalizuje się również w opracowaniu szczepionek przeciw patogenom zakaźnym opartych na wektorach adenowirusowych a regularne uczestnictwo w spotkaniach i dyskusjach wzbogaciło moją wiedzę na temat problemów związanych z opracowaniem szczepionki przeciwko HCV.

Pobyt we Włoszech otworzył przede mną wiele drzwi, dając solidne podstawy do dalszego rozwoju naukowego. Po powrocie do kraju zdobyte we Włoszech doświadczenie w zakresie technik wirusologicznych i immunologicznych w połączeniu z szerokim doświadczeniem biochemicznym pozwoliło mi na aplikowanie o granty badawcze o charakterze podstawowym oraz aplikacyjnym, które były związane z nadekspresją i analizą rekombinowanych białek osłonki wirusa HCV oraz chimerycznych cząstek VLP do celów szczepionkowych. Od 2012 roku jestem związana z Zakładem Biologii Molekularnej Wirusów w MWB UG-GUMed, gdzie regularne aplikowanie o granty zapewniło mi nie tylko ciągłość zatrudnienia oraz zespołu, z którym pracowałam, ale przede wszystkim fundusze na realizację wszystkich badań wchodzących w skład głównego osiągnięcia habilitacyjnego. Dzięki uzyskaniu finansowania w ramach grantu NCN SONATA 3 miałam również szansę odbyć krótki staż w laboratorium prof. Arvinda Patela w Glasgow w 2013 roku (MRC-University of Glasgow, Centre for Virus Research). Celem mojego pobytu było doskonalenie umiejętności badawczych w zakresie badań nad wirusem HCV oraz poszerzenie zakresu zaplanowanych wówczas eksperymentów w ramach realizowanych przeze mnie projektów. Staż ten zaowocował długoletnią współpracą, w ramach której jesteśmy współautorami jednej z publikacji przedstawionej w cyklu (publikacja 4) opublikowanej w czasopiśmie *Microbiology Spectrum*.

Podsumowując, w mojej karierze naukowej podejmowałam różnorodną tematykę badań w różnych ośrodkach naukowych, co wiązało się ze zmianami modeli badawczych i opanowywaniem przeze mnie coraz to nowych umiejętności i technik eksperymentalnych. Po powrocie ze stażu podoktorskiego bardzo szybko wykazałam się niezależnością w prowadzeniu badań jako naukowczyni a także jako kierowniczka czterech znaczących grantów badawczych, w ramach których nie tylko przeprowadzałam eksperymenty, ale podejmowałam szereg inicjatyw i decyzji, nawiązałam współpracę międzynarodową, pozyskiwałam fundusze na dalsze badania, planowałam przyszłe badania, uczestniczyłam w opracowaniu nowych metod, dużo inwestowałam także w szkolenia i praktyczne warsztaty dla moich współpracowników. Dodatkowo jako mentorka starałam się i nadal staram dbać o rozwój naukowy całego zespołu, bez którego niemożliwe jest osiągnięcie znaczących odkryć naukowych.

6 Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Pomimo zatrudnienia na MWB na stanowisku badawczym finansowanym z moich projektów, starałam się angażować wielu studentów do realizacji zarówno prac magisterskich jak i licencjackich w ramach pozyskiwanych przez mnie projektów. Byłam promotorką lub bezpośrednią opiekunką 7 prac magisterskich i promotorką 4 prac licencjackich. Wśród moich wypromowanych magistrantek jest stypendystka programu BioLab a także zwyciężczyni nagrody w postaci rocznego stażu w firmie farmaceutycznej Adamed Pharma podczas czternastej edycji konferencji dla studentów kierunku Biotechnologia. Dodatkowo udało mi się zgromadzić dorobek obejmujący szeroki wachlarz zajęć ujętych w programie studiów na kierunku „Biotechnologia”. Prowadziłam zajęcia dla studentów w formie proseminariów z Metodyki Biologii Molekularnej i Inżynierii Genetycznej, ćwiczenia z Laboratorium z Wirusologii oraz ćwiczenia z organizmów modelowych i ich zastosowania w nauce – zakres: *Leishmania tarentolae*, bakulowirusy. Dodatkowo brałam czynny udział w organizacji ćwiczeń dla studentów z Laboratorium z Wirusologii będąc współautorką skryptu. Za duże osiągnięcie dydaktyczne uważam również doktorat obroniony z wyróżnieniem przez doktorantkę Annę Czarnotę, której byłam promotorką pomocniczą. Obecnie jestem promotorką pomocniczą doktorantki Aleksandry Sławińskiej, której doktorat pt.: „Uniwersalna szczepionka przeciwko wirusowi SARS-CoV-2” jest realizowany w ramach projektu NCN-OPUS 21, którego jestem kierowniczką. Mam na uwadze to, aby zajęcia dydaktyczne były prowadzone na wysokim poziomie, dlatego nadal podnoszę swoje kwalifikacje w tej dziedzinie poprzez uczestnictwo w szkoleniach w zakresie dydaktyki organizowanych przez Centrum Doskonalenia Dydaktycznego i Tutoringu UG dla pracowników naukowych, aby skutecznie aktywizować studentów podczas zajęć. Dodatkowo, jestem członkinią Polskiego i Europejskiego Towarzystwa Wirusologicznego oraz recenzentką manuskryptów wysyłanych do znanych czasopism takich jak np.: *npj Vaccines*, *Scientific Reports*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *International Journal of Biological Macromolecules*, *Journal of Virological Methods*, *Microbiology Spectrum*, *Pharmacological Reports*, *Virology Journal*.

Jako mama dziewięciolatka wiem, jak dzieci lubią eksperymentować a przy okazji można im przekazać wiele podstawowych i cennych wiadomości ze świata nauki. Dlatego w ramach popularyzacji nauki prowadziłam warsztaty dla najmłodszych podczas wydarzenia w ramach "Nocy Biologów" zatytułowanego „Eksplzja kolorów”. Pełniłam także rolę prowadzącej warsztaty z izolacji plazmidowego DNA dla uczniów szkół średnich w ramach wydarzenia Biotech-Week odbywającego się co roku we wrześniu na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG-GUMed. Obecnie biorę udział w przygotowaniu konkursu dla licealistów, który jest organizowany przez Wydział pod hasłem „Pandemie na przestrzeni wieków”.

Poniżej przedstawiam wykaz realizowanych pod moją opieką tematów prac doktorskich, magisterskich i licencjackich.

Promotorka pomocnicza w przewodach doktorskich:

- „Chimeryczne, wirusopodobne cząsteczki HBV-HCV jako potencjalna szczepionka przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu C” – obrona w 2023 roku
- „Uniwersalna szczepionka przeciwko wirusowi SARS-CoV-2” – w toku

Promotorka lub bezpośrednia opiekunka prac magisterskich:

- „Badanie właściwości biochemicznych glikoprotein ostonkowych wirusa HCV” – obrona w 2014 roku
- „Analiza reaktywności krzyżowej surowic myszy szczepionych glikoproteinami E1E2 wirusa zapalenia wątroby typu C” – obrona w 2015 roku
- „Ekspresja epitopów białka NS3 wirusa zapalenia wątroby typu C w fuzji z małym białkiem powierzchniowym wirusa zapalenia wątroby typu B” – obrona w 2019 roku
- „Charakterystyka cząstek wirusopodobnych sHBsAg eksponujących epitopy białka S wirusa SARS-CoV-2” – obrona w 2022 roku
- „Minicircles jako nowoczesna szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C” – obrona w 2022 roku
- „Analiza odpowiedzi humoralnej przeciwko wirusowi HCV wywołanej po immunizacji DNA” – obrona w 2023 roku
- „Analiza właściwości neutralizujących mysich surowic po immunizacji chimerycznymi cząsteczkami wirusopodobnymi HBV/SARS-CoV-2” – obrona w 2024

Promotorka prac licencjackich:

- „Chimeryczne cząstki wirusopodobne jako propozycja szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C” – obrona w 2018 roku
- „Kompleks E1E2 jako szczepionka przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C” – obrona w 2018 roku
- „Analiza odpowiedzi komórkowej u pacjentów zakażonych wirusem HCV” – obrona w 2020 roku
- „Szczepionka oparta na rekombinowanym białku czy DNA? Porównanie odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko wirusowi HCV” – obrona w 2023 roku

7 Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej

Obecnie jestem kierowniczką grantu NCN OPUS 21 dotyczącego badań nad uniwersalną szczepionką przeciwko wirusowi SARS-CoV-2, która byłaby skuteczna wobec różnych wariantów wirusa. Celem projektu jest poszukiwanie i ekspozycja konserwowanych rejonów w białku kolca S (z ang. *spike*) i zaproponowanie skutecznej szczepionki, która byłaby w stanie wywołać odpowiedź przeciwciał o szerokim spectrum neutralizacji. Bazując na naszych wcześniejszych badaniach, w planach jest zbadanie właściwości immunogennych wybranych konserwowanych rejonów zlokalizowanych w białku S wirusa SARS-CoV-2, które będą wyeksponowane na cząstkach wirusopodobnych sHBsAg. W planach badań jest także ocena zdolności zaprojektowanych cząstek do wywoływania odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko obecnie krążącym w populacji wariantom wirusa SARS-CoV-2.

W obliczu nowych wariantów wirusa opracowanie skutecznej szeroko stosowanej i uniwersalnej szczepionki jest nadal aktualnym tematem badań. Mam nadzieję, że nasze badania przyczynią się do zrozumienia odpowiedzi immunologicznej przeciwko potencjalnie konserwowanym rejonom zlokalizowanym w obrębie białka S i dostarczą nowych

informacji zmierzających do opracowania uniwersalnej szczepionki skierowanej przeciwko obecnym i nowopowstającym wariantom SARS-CoV-2.

Czas pandemii koronawirusa SARS-CoV-2 skłonił nas także do napisania artykułu przeglądowego dotyczącego wariantów wirusa i ważnej roli testów neutralizacji w badaniach nad COVID-19. Publikacja została opublikowana w czasopiśmie *npj Vaccines* i niespodziewanie spotkała się z bardzo dużym zainteresowaniem środowiska naukowego na całym świecie.

Chmielewska, A. M., Czarnota, A., Bieńkowska-Szewczyk, K., **Grzyb, K***. (2021). Immune response against SARS-CoV-2 variants: the role of neutralization assays. *npj Vaccines*, 6(1), 142. doi:10.1038/s41541-021-00404-6

*autor korespondujący

IF₂₀₂₁ - 9,39; IF_{5-letni} - 6,7; MEiN₂₀₂₁ - 100; liczba cytowań - 28 (WoS)

W kolejnych moich badaniach nad szczepionką przeciwko HCV mam w planach oszacowanie skuteczności działania szczepionki opartej na chimerycznych cząstkach VLP HBV/HCV *in vivo* metodą pasywnej immunizacji chimerycznych myszy posiadających wszczepione ludzkie hepatocyty. Takie myszy pozbawione są systemu swoistej odpowiedzi immunologicznej i w związku z tym, w toku badań konieczne jest podanie im przeciwciał pochodzących z immunokompetentnych zwierząt zaszczepionych chimerycznymi cząstkami VLP i zbadanie ich właściwości neutralizujących po zakażeniu HCV. Należy podkreślić, że w tym momencie jedynym immunokompetentnym modelem zakażeń wirusem HCV są ludzie, tak więc użycie chimerycznych myszy posiadających ludzkie hepatocyty jest jedyną możliwością na obserwację wpływu przeciwciał wzbudzonych przez chimeryczne cząstki HBV/HCV na dynamikę zakażenia wirusem HCV *in vivo*. Ze względu na trudności w otrzymaniu chimerycznych myszy, badania z ich udziałem są kosztowne i czasochłonne oraz wymagają pozyskania kolejnych grantów badawczych w celu ich realizacji.

Swoją dalszą działalność naukową wiązę z wirusologią i biotechnologią medyczną. Moim celem jest dalsze rozwijanie skutecznych rozwiązań w obszarze projektowania szczepionek oraz badań nad mechanizmami odporności przeciwwirusowej. Uzyskanie stopnia doktora habilitowanego umożliwi mi aktywne zacieśnianie współpracy w kraju i za granicą oraz pozwoli kształcić nowe pokolenia badaczy.

.....
(podpis wnioskodawcy)

Bibliografia

1. Houghton, M. The long and winding road leading to the identification of the hepatitis C virus. *Journal of Hepatology* **51**, 939–948 (2009).
2. Zibbell, J. E. *i in.* Increases in Acute Hepatitis C Virus Infection Related to a Growing Opioid Epidemic and Associated Injection Drug Use, United States, 2004 to 2014. *American Journal of Public Health* **108**, 175–181 (2018).
3. *Polaris Observatory* <https://cdafound.org/polaris/>.
4. Hartlage, A. S. & Kapoor, A. Hepatitis C Virus Vaccine Research: Time to Put Up or Shut Up. *Viruses* **13**, 1596 (2021).
5. World Health Organization. *Global hepatitis report 2024: action for access in low- and middle-income countries. 242* <https://www.who.int/publications/i/item/9789240091672>.
6. Bartosch, B., Dubuisson, J. & Cosset, F.-L. Infectious Hepatitis C Virus Pseudoparticles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *The Journal of Experimental Medicine* **197**, 633–642 (2003).
7. Khan, S., Soni, S. & Veerapu, N. S. HCV Replicon Systems: Workhorses of Drug Discovery and Resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **10** (2020).
8. Wakita, T. *i in.* Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Medicine* **11**, 791–796 (2005).
9. Spengler, U. Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacology & Therapeutics* **183**, 118–126 (2018).
10. Mesalam, A., Vercauteren, K. & Meuleman, P. Mouse Systems to Model Hepatitis C Virus Treatment and Associated Resistance. *Viruses* **8**, 176 (2016).
11. Dorner, M. *i in.* Completion of the entire hepatitis C virus life cycle in genetically humanized mice. *Nature* **501**, 237–241 (2013).
12. Wolfisberg, R. *i in.* Neutralization and receptor use of infectious culture-derived rat hepacivirus as a model for HCV. *Hepatology* **76**, 1506–1519 (2022).
13. Barnes, E., Cooke, G. S., Lauer, G. M. & Chung, R. T. Implementation of a controlled human infection model for evaluation of HCV vaccine candidates. *Hepatology* **77**, 1757–1772 (2023).
14. Liang, T. J., Feld, J. J., Cox, A. L. & Rice, C. M. Controlled Human Infection Model — Fast Track to HCV Vaccine? *New England Journal of Medicine* **385**, 1235–1240 (2021).
15. Vo-Quang, E. & Pawlotsky, J.-M. ‘Unusual’ HCV genotype subtypes: origin, distribution, sensitivity to direct-acting antiviral drugs and behaviour on antiviral treatment and retreatment. *Gut* **73**, 1570–1582 (2024).
16. Park, S. B., Zimmer-Harwood, P. & Liang, T. J. Targets of protective immunity and opportunities in hepatitis C virus vaccine development. *Nature Reviews Immunology* **26**, 112–128 (2026).
17. Pihl, A. F. *i in.* Inactivated whole hepatitis C virus vaccine employing a licensed adjuvant elicits cross-genotype neutralizing antibodies in mice. *Journal of Hepatology* **76**, 1051–1061 (2022).

18. Alzua, G. P. *i in.* Inactivated genotype 1a, 2a and 3a HCV vaccine candidates induced broadly neutralising antibodies in mice. *Gut* **72**, 560–572 (2023).
19. Offersgaard, A., Bukh, J. & Gottwein, J. M. Toward a vaccine against hepatitis C virus. *Science* **380**, 37–38 (2023).
20. Frey, S. E. *i in.* Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine* **28**, 6367–73 (2010).
21. A. J.-X. Wong, J. *i in.* Recombinant Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Vaccine Elicits Antibodies Targeting Multiple Epitopes on the Envelope Glycoproteins Associated with Broad Cross-Neutralization. *Journal of Virology* **88**, 14278–14288 (2014).
22. Law, J. L. M. *i in.* A Hepatitis C Virus (HCV) Vaccine Comprising Envelope Glycoproteins gpE1/gpE2 Derived from a Single Isolate Elicits Broad Cross-Genotype Neutralizing Antibodies in Humans. *PLoS ONE* **8**, e59776 (2013).
23. Meunier, J.-C. *i in.* Vaccine-induced cross-genotype reactive neutralizing antibodies against hepatitis C virus. *The Journal of infectious diseases* **204**, 1186–90 (2011).
24. Shoukry, N. H. Hepatitis C Vaccines, Antibodies, and T Cells. *Frontiers in Immunology* **9** (2018).
25. Thimme, R. T cell immunity to hepatitis C virus: Lessons for a prophylactic vaccine. *Journal of Hepatology* **74**, 220–229 (2021).
26. Page, K. *i in.* Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *New England Journal of Medicine* **384**, 541–549 (2021).
27. Jacobson, J. M. *i in.* Phase I Trial of a Therapeutic DNA Vaccine for Preventing Hepatocellular Carcinoma from Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection. *Cancer Prevention Research* **16**, 163–173 (2023).
28. Aloia, A. L., Locarnini, S. & Beard, M. R. Antiviral resistance and direct-acting antiviral agents for HCV. *Antiviral Therapy* **17**, 1147–1162 (2012).
29. Kundu, J. *i in.* Recombinant H77C gpE1/gpE2 heterodimer elicits superior HCV cross-neutralisation than H77C gpE2 alone. *Journal of Hepatology* **81**, 941–948 (2024).
30. Goffard, A. *i in.* Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Glycoproteins. *Journal of Virology* **79**, 8400–8409 (2005).
31. Helle, F. *i in.* The Neutralizing Activity of Anti-Hepatitis C Virus Antibodies Is Modulated by Specific Glycans on the E2 Envelope Protein. *Journal of Virology* **81**, 8101–8111 (2007).
32. Breitling, R. *i in.* Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. *Protein expression and purification* **25**, 209–18 (2002).
33. Lin, T. *i in.* Recombinant Full-Length Hepatitis C Virus E1E2 Dimer Elicits Pan-genotypic Neutralizing Antibodies. *Frontiers in Immunology* **13** (2022).
34. Desombere, I. *i in.* Monoclonal anti-envelope antibody AP33 protects humanized mice against a patient-derived hepatitis C virus challenge sprawozdanie techniczne (2016).

35. Owsianka, A. *i in.* Monoclonal Antibody AP33 Defines a Broadly Neutralizing Epitope on the Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Journal of Virology* **79**, 11095–11104 (2005).
36. Owsianka, A. M. *i in.* Broadly neutralizing human monoclonal antibodies to the hepatitis C virus E2 glycoprotein. *The Journal of general virology* **89**, 653–9 (2008).
37. Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. & Hall, B. D. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**, 347–350 (1982).
38. Kushnir, N., Streatfield, S. J. & Yusibov, V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine* **31**, 58–83 (2012).
39. Zhao, H., Zhou, X. & Zhou, Y.-H. Hepatitis B vaccine development and implementation. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **16**, 1533–1544 (2020).
40. Tzarum, N., Wilson, I. A. & Law, M. The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Frontiers in Immunology* **9** (2018).
41. Ströh, L. J., Nagarathinam, K. & Krey, T. Conformational Flexibility in the CD81-Binding Site of the Hepatitis C Virus Glycoprotein E2. *Frontiers in Immunology* **9** (2018).
42. Kong, L. *i in.* Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science (New York, N.Y.)* **342**, 1090–4 (2013).
43. Prentoe, J., Velázquez-Moctezuma, R., Fong, S. K., Law, M. & Bukh, J. Hypervariable region 1 shielding of hepatitis C virus is a main contributor to genotypic differences in neutralization sensitivity. *Hepatology* **64**, 1881–1892 (2016).
44. The hepatitis C virus glycan shield and evasion of the humoral immune response. *Viruses* **3**, 1909–32 (2011).
45. Skinner, N. E. Broadly Neutralizing Antibody Characteristics in Hepatitis C Virus Infection and Implications for Vaccine Design. *Vaccines* **13**, 612 (2025).
46. Pantua, H. *i in.* Glycan Shifting on Hepatitis C Virus (HCV) E2 Glycoprotein Is a Mechanism for Escape from Broadly Neutralizing Antibodies. *Journal of Molecular Biology* **425**, 1899–1914 (2013).
47. Gridley, J. *i in.* Concerted synergy between viral-specific IgG and CD8+ T cells is critical for clearance of an HCV-related rodent hepacivirus. *Hepatology* **80**, 937–950 (2024).
48. Shafaati, M. *i in.* A brief review on DNA vaccines in the era of COVID-19. *Future Virology* **17**, 49–66 (2022).
49. Shayeghpour, A. *i in.* Hepatitis C virus DNA vaccines: a systematic review. *Virology Journal* **18**, 248 (2021).
50. Gummow, J. *i in.* Safety Profile of a Multi-Antigenic DNA Vaccine Against Hepatitis C Virus. *Vaccines* **8**, 53 (2020).
51. Masavuli, M. G. *i in.* A Hepatitis C Virus DNA Vaccine Encoding a Secreted, Oligomerized Form of Envelope Proteins Is Highly Immunogenic and Elicits Neutralizing Antibodies in Vaccinated Mice. *Frontiers in Immunology* **10** (2019).

52. Kutzler, M. A. & Weiner, D. B. DNA vaccines: ready for prime time? *Nature Reviews Genetics* **9**, 776–788 (2008).
53. Almeida, A. M., Queiroz, J. A., Sousa, F. & Sousa, Â. Minicircle DNA: The Future for DNA-Based Vectors? *Trends in Biotechnology* **38**, 1047–1051 (2020).
54. Arévalo-Soliz, L. M. *i in*. Improving therapeutic potential of non-viral minimized DNA vectors. *Cell and Gene Therapy Insights* **6**, 1489–1505 (2020).
55. Pang, X. *i in*. Anticancer effects of a single intramuscular dose of a minicircle DNA vector expressing anti-CD3/CD20 in a xenograft mouse model. *Molecular Therapy - Oncolytics* **24**, 788–798 (2022).
56. Liu, Y. *i in*. Patient derived cancer organoids model the response to HER2-CD3 bi-specific antibody (BsAbHER2) generated from hydroxyapatite gene delivery system. *Cancer Letters* **597**, 217043 (2024).
57. Jiang, Y., Yang, G. & Wang, C. w: *DNA Vaccines: Methods and Protocols* (red. Sousa, Â.) 3–12 (Springer US, New York, NY, 2021).
58. Rim, Y. A., Nam, Y., Park, N. & Ju, J. H. Minicircles for Investigating and Treating Arthritic Diseases. *Pharmaceutics* **13**, 736 (2021).
59. Eusébio, D. *i in*. The Performance of Minicircle DNA Versus Parental Plasmid in p53 Gene Delivery Into HPV-18-Infected Cervical Cancer Cells. *Nucleic Acid Therapeutics* **31**, 82–91 (2021).
60. Zeisel, M. B., Fofana, I., Fafi-Kremer, S. & Baumert, T. F. Hepatitis C virus entry into hepatocytes: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapies. *Journal of Hepatology* **54**, 566–576 (2011).