

Załącznik nr 2

Autoreferat w języku polskim

Ewelina Król

AUTOREFERAT

**Opracowanie innowacyjnych strategii zwalczania
infekcji wirusowych u ludzi poprzez zastosowanie
chemicznie zsyntetyzowanych inhibitorów**

Dr Ewelina Król

Zakład Szczepionek Rekombinowanych
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu
Medycznego

Gdańsk 2019

1. Imię i Nazwisko: Ewelina Król

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

2011 doktor nauk biologicznych w zakresie biochemii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, tytuł rozprawy doktorskiej: „Zastosowanie wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV) jako modelu do badania aktywności nowych inhibitorów rozwoju wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV)”. Promotor: prof. dr hab. Bogusław Szewczyk.

Rozprawa została wyróżniona przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

2004 magister biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, tytuł pracy magisterskiej: „Klonowanie i ekspresja skróconej formy genu glikoproteiny E2 wirusa HCV w systemie bakulowirusowym”. Promotor: prof. dr hab. Bogusław Szewczyk.

Publiczna prezentacja wyników pracy magisterskiej została wyróżniona przez Radę Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

od 01.03.2012 Adiunkt, Zakład Szczepionek Rekombinowanych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego (urlop macierzyński - 30.06.2014-28.06.2015)

2009 –2012 Starszy referent techniczny, Zakład Szczepionek Rekombinowanych, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zatrudnienie w ramach projektu naukowego: POIG.01.01.02-14-007/08-00, „INNOWACYJNA GOSPODARKA”, „Centrum Biotechnologii produktów leczniczych. Pakiet innowacyjnych biofarmaceutyków dla terapii i profilaktyki ludzi i zwierząt”, projekt finansowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Priorytet 1

2004- 2011 Słuchaczka studium doktoranckiego Chemii i Biochemii przy Wydziale Chemii UG

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r poz.1789):

A) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego

Opracowanie innowacyjnych strategii zwalczania infekcji wirusowych u ludzi poprzez zastosowanie chemicznie zsyntetyzowanych inhibitorów.

B) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki stanowi cykl 7 powiązanych tematycznie publikacji (6 prac oryginalnych oraz 1 praca przeglądowa). **We wszystkich pracach składających się na osiągnięcie naukowe jestem autorem korespondencyjnym.**

IF – współczynnik oddziaływania z roku opublikowania pracy, w przypadku braku IF dla danego roku, podano wartość IF z roku poprzedniego; IF_{5-letni} – 5-letni współczynnik oddziaływania; MNiSW – punktacja czasopism wg Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; Lc – Liczba cytowań (Web of Science (WoS); Google Scholar).

1. **Król, E.***, Wandzik, I., Gromadzka, B., Nidzworski, D., Rychłowska, M., Matlach, M., Tyborowska, J., Szewczyk, B. (2013). Anti-influenza A virus activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars. *Antiviral Research*, 100, 90-97.
IF = 3,434; IF_{5-letni} = 4,185; MNiSW = 35 pkt; Lc = WoS: 6, Google Scholar: 9
2. **Król, E. ***, Rychłowska, M., Szewczyk, B. (2014). Antivirals - current trends in fighting influenza. *Acta Biochimica Polonica* 61, 495–504.
IF = 1,153; IF_{5-letni} = 1,541; MNiSW = 15 pkt; Lc = WoS: 28, Google Scholar: 38
3. **Król, E.***, Wandzik, I., Krejmer-Rabalska, M., Szewczyk, B. (2017). Biological evaluation of uridine derivatives of 2-deoxy sugars as potential antiviral compounds against influenza A virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1700.
IF = 3,687; IF_{5-letni} = 3,878; MNiSW = 30 pkt; Lc = WoS: 2, Google Scholar: 4
4. **Król, E.***, Wandzik, I., Pastuch-Gawolek, G., Szewczyk, B. (2018). Anti-hepatitis C virus activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars. *Molecules*, 23(7). pii: E1547
IF = 3,098; IF_{5-letni} = 3,268; MNiSW = 30 pkt; Lc = WoS:0, Google Scholar: 1
5. **Król, E.***, Wandzik, I., Brzuska, G., Eyer, L., Růžek, D., Szewczyk, B. (2019). Antiviral activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars against tick-borne encephalitis virus. *Molecules*, 24(6). pii: E1129
IF = 3,098; IF_{5-letni} = 3,268; MNiSW = 30 pkt; Lc = WoS: 0, Google Scholar: 0
6. Pastuch-Gawolek, G., Chaubey, B., Szewczyk, B., **Król, E***. (2017). Novel thioglycosyl analogs of glycosyltransferase substrates as antiviral compounds against classical swine fever virus and hepatitis C virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 247-262. **IF = 4,816; IF_{5-letni} = 4,527; MNiSW = 40 pkt; Lc = WoS: 6, Google Scholar: 6**

7. **Krol, E.***, Pastuch-Gawolek, G., Chaubey, B., Brzuska, G., Erfurt, K., Szewczyk, B. (2018). Novel uridine glycoconjugates, derivatives of 4-aminophenyl 1-thioglycosides, as potential antiviral compounds. *Molecules*, 23(6). pii: E1435.

IF = 3,098; IF_{5-letni} = 3,268; MNiSW = 30 pkt; Lc = WoS: 0, Google Scholar: 0

Sumaryczny IF publikacji wchodzących w skład cyklu = 22,384

Sumaryczny IF_{5-letni} publikacji wchodzących w skład cyklu = 23,935

Sumaryczna ilość punktów MNiSW publikacji wchodzących w skład cyklu = 210

W pracach zawarto wyniki uzyskane podczas realizacji 4 projektów badawczych, w których pełniłam rolę **kierownika projektu**:

1. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Iuventus Plus nr IP2010 020870, „Inhibitory glikozylacji jako nowe potencjalne leki antywirusowe przeciwko różnym szczepom wirusa grypy typu A”.
2. Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego – Iuventus Plus IP2011 027271, „Analogi i mimetyki tunikamycyny jako nowe potencjalne leki przeciwko różnym szczepom wirusa grypy typu A”.
3. Narodowe Centrum Nauki – Preludium UMO-2011/03/N/NZ6/00059, „Wpływ analogów i mimetyków tunikamycyny na namnażanie wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV)”.
4. Narodowe Centrum Nauki – Sonata UMO-2015/19/D/NZ6/01717, „Wirus kleszczowego zapalenia mózgu - poznanie mechanizmów użytecznych w leczeniu i profilaktyce”.

C) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp:

Epidemie i pandemie chorób zakaźnych mają od wieków istotny wpływ na rozwój ludzkości. Na przełomie ostatnich lat, niemal co roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO) wydaje oświadczenia o patogenach wirusowych stanowiących zagrożenie dla zdrowia publicznego. Pojawiające się epidemie sprawiają, że konieczne jest opracowanie efektywnych metod zwalczania i zapobiegania infekcjom wirusowym. Jednym z najważniejszych elementów zwalczania chorób zakaźnych jest immunoprofilaktyka swoista przy użyciu szczepień. Istnieją jednak wirusy, dla których wciąż nie ma na rynku skutecznych szczepionek. Wówczas stosowanie leków antywirusowych jest jedyną możliwą drogą zwalczania infekcji oraz przeciwdziałaniu epidemii. Zaistniała sytuacja wymusza powstawanie kierunków badań skupiających się wokół poszukiwania nowych metod leczenia infekcji wirusowych.

Wiele wirusów zawiera osłonkę lipidową, w której zakotwiczone są białka wirusowe. Glikoproteiny wirusowe jako najbardziej eksponowane elementy strukturalne wirionów, odgrywają kluczową rolę w cyklu życiowym wirusów. Uczestniczą w procesie rozpoznawania i infekowania komórek poprzez wiązanie do specyficznych receptorów obecnych na powierzchni komórek docelowych i indukowanie fuzji pomiędzy osłonką wirusową a błoną komórkową. Ze względu na istotną rolę w cyklu życiowym wirusów glikoproteiny stanowią atrakcyjny cel terapii antywirusowych. Powierzchniowe białka wirusowe są silnie

modyfikowane przez dołączanie łańcuchów cukrowych. Za biosyntezę glikoprotein i innych glikokoniugatów w komórkach eukariotycznych odpowiada cała gama enzymów z grupy glikozylotransferaz (GTs) (Breton et al., 2012). GTs są enzymami katalizującymi przeniesienie reszt cukrowych z aktywowanych donorów reszt cukrowych (najczęściej nukleotydów) na akceptor, którym może być np. cukier, lipid lub białko i obecne są zarówno w retikulum endoplazmatycznym jak i aparacie Golgiego. Wiele danych literaturowych pokazuje kluczową rolę *N*-glikozylacji w procesie dojrzewania osłonkowych glikoprotein wirusowych. Zaburzenia w prawidłowym przebiegu glikozylacji białek wirusowych istotnie wpływają na ich fałdowanie, aktywną konformację czy oddziaływanie z komórką gospodarza (von Messling and Cattaneo, 2003; Shi and Elliott, 2004). Z danych literaturowych wynika, że zastosowanie inhibitorów glikozylacji bardzo często prowadzi do agregacji nieprawidłowo zmodyfikowanych form białek wirusowych i ich akumulacji w retikulum endoplazmatycznym, które następnie skierowane są na tzw. drogę degradacji ERAD (ang. „ER-associated degradation”) (Brodsky and McCracken, 1999; Parodi, 2000; Trombetta and Parodi, 2003). W konsekwencji zahamowanie procesu glikozylacji znacząco wpływa na składanie i sekrecję cząsteczek wirusowych z zakażonych komórek. Zaobserwowano również znaczący spadek infekcyjności potomnych cząsteczek wirusowych spowodowany wbudowywaniem do wirionów niekompletnie glikozylowanych glikoprotein.

Z uwagi na fakt, iż GTs uczestniczą w procesie glikozylacji białek, modulacja ich aktywności może być wykorzystana podczas projektowania nowych leków antywirusowych. W ostatnich latach przeprowadzono liczne badania mające na celu uzyskanie skutecznych i selektywnych inhibitorów GTs, które imitują naturalne substraty GTs (Gloster, 2012; Kajimoto and Node, 2009; Wang et al., 2003). Prace nad identyfikacją potencjalnych inhibitorów glikozylotransferaz jako nowych leków rozpoczęły się bardzo intensywnie po tym, jak określono strukturę 3D wielu enzymów należących do tej grupy (Breton et al., 2006; Kikuchi and Narimatsu, 2006; Unligil and Rini, 2000). Zaprojektowane inhibitory możemy podzielić na analogi donorów (źródło przenoszonej reszty cukrowej), akceptora (miejsce docelowe przenoszonej reszty cukrowej) lub kompleksu pośredniego enzym-substrat (Compain and Martin, 2001; Zou, 2005). Chociaż wiele związków zostało zaprojektowanych i zsyntetyzowanych, zaledwie kilka z nich wykazywało znaczącą aktywność hamującą w stosunku do GTs.

Jednym z najbardziej znanych, naturalnych inhibitorów glikozylotransferaz jest tunikamycyna produkowana przez bakterie *Streptomyces lysosuperficus* (Duksin and Mahoney, 1982; Elbein, 1987; Lehle and Tanner, 1976). Związek ten należy do grupy analogów donora, a biorąc pod uwagę budowę chemiczną można go zaklasyfikować jako antybiotyk będący analogiem nukleozydów. Działanie antywirusowe tunikamycyny zostało potwierdzone wobec wielu wirusów osłonkowych (Nakamura and Compans, 1978; Pizer et al., 1980; Saito and Yamaguchi, 2000; Schwarz et al., 1976). Pomimo szerokiego spektrum działania, zastosowanie terapeutyczne tunikamycyny jest jednak bardzo ograniczone z powodu wysokiej toksyczności *in vivo* (Bourke and Carrigan, 1993; Kohsaka et al., 1985).

Dzięki nawiązaniu współpracy naukowej z Politechniką Śląską w Gliwicach oraz Instytutem Farmaceutycznym w Warszawie uzyskałam panel kilkudziesięciu zsyntetyzowanych związków projektowanych jako potencjalne inhibitory enzymów z grupy GTs. Zaprojektowane związki należały do analogów donora, którym jest UDP-cukier. Wspólnym motywem strukturalnym wszystkich związków był fragment urydynowy, który odpowiada za wiązanie w miejscu aktywnym enzymu. Najważniejszym odkryciem wynikającym z badań przeprowadzonych w ramach mojej pracy doktorskiej było wykazanie, że urydynowe pochodne 2-deoksy cukrów (seria IW), posiadają znaczącą aktywność antywirusową wobec wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV, ang. classical swine fever

virus”), który jest patogenem wywołującym groźną i ważną ekonomicznie chorobę świń i dzików (Krol et al., 2010). Związki te można traktować jako analogi tunikamycyny, gdyż podobnie jak ona zawierają jednostki glikozyłowe jako substytut grupy difosforanowej. Wstępne badania potwierdziły również skuteczność tych związków wobec wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. hepatitis C virus). Wykazano, że działanie antywirusowe dwóch najbardziej aktywnych związków (IW3 i IW7) opiera się na hamowaniu późnych etapów procesu glikozylacji białek strukturalnych patogenu. Z wyników badań przeprowadzonych w trakcie pracy doktorskiej wynikało, że hamowanie procesu glikozylacji białek powierzchniowych mogłoby być podstawą innowacyjnych opcji terapeutycznych w leczeniu zakażeń wirusowych. Większość testowanych obecnie substancji antywirusowych to inhibitory specyficznych enzymów biorących udział w różnych etapach cyklu życiowego wirusa, co prowadzi do powstawania szczepów lekoopornych w dość krótkim czasie. Stosowanie inhibitorów glikozylacji, które wpływają na procesy komórkowe powinno w dużej mierze eliminować problem lekooporności.

Ze względu na bardzo obiecujące wyniki wstępne, w pracach przedstawionych jako osiągnięcie naukowe, pragnęłam **kontynuować badania nad hamowaniem procesu glikozylacji białek jako nowej opcji terapeutycznej w leczeniu zakażeń wirusowych**. Jako modele do badań zastosowałam ludzkie wirusy osłonkowe, zawierające glikozylowane białka powierzchniowe, dla których brak jest terapii antywirusowych, albo konieczne jest poszukiwanie nowych leków antywirusowych ze względu na znaczący problem lekooporności. Modelami były: wirus grypy, wirus zapalenia wątroby typu C oraz wirus kleszczowego zapalenia mózgu.

Wirus grypy, należący do rodziny *Orthomyxoviridae*, powoduje ostrą, zakaźną chorobę górnych dróg oddechowych. Szacuje się, że na ciężką postać grypy rokrocznie na świecie choruje od 3 do 5 milionów ludzi, z czego 10% kończy się śmiercią (Fiore et al., 2008; Russell et al., 2008). Obok grypy ludzkiej należy pamiętać także o grypie ptasiej, która w przypadku wybuchu epidemii wywołuje ogromne straty ekonomiczne, gdyż w przeciągu 72 h śmiertelność w stadzie wynosi 100%. Obecnie istnieją dwie metody leczenia i zapobiegania infekcjom wywołanym przez wirusa grypy: profilaktyczne szczepienia ochronne oraz leki antywirusowe. Chociaż jest oczywiste, że szczepienia ochronne są najlepszą metodą zapobiegania infekcji, to w przypadku wirusa grypy nie zawsze mamy do czynienia ze 100% skuteczną szczepionką sezonową. Jest to związane z niezwykle zmiennością genetyczną wirusa grypy, która spowodowana jest między innymi nagromadzeniem się mutacji punktowych w RNA (tzw. „zmienność antygenowa”), a także zjawiskiem reasortacji (tzw. „skok antygenowy”), którego konsekwencją jest powstawanie nowego podtypu wirusa (Nichol and Treanor, 2006).

Na rynku dostępne są dwa rodzaje leków przeciwwirusowych stosowane w terapii infekcji wirusem grypy: inhibitory białka M2 (amantadyna i rymantadyna) (Hayden, 1997) oraz nowsza generacja inhibitorów neuraminidazy (oseltamiwir i zanamiwir) (Monto et al., 1999; Nicholson et al., 2000). Wykazano jednak, że niektóre dostępne leki antywirusowe są nieskuteczne wobec określonych szczepów wirusowych, jak na przykład inhibitory białka M2 nie hamują namnażania szczepu H5N1 (Li et al., 2004). Co więcej, powszechne stosowanie leków przeciwwirusowych związane jest z pojawianiem się w dość krótkim czasie wirusów lekoopornych. Jednym z przykładów jest podtyp H1N1, który w minionych latach stał się całkowicie oporny na oseltamiwir (z 0,5% w 2006-2007, 13% w 2007-2008, do 99% w 2008-2009) (Hurt et al., 2011). Dodatkowo udowodniono występowanie szczepów wirusa grypy całkowicie opornych na wszystkie dostępne leki antywirusowe (Gubareva, 2004). Powyższe fakty skłaniają do poszukiwania nowych terapeutyków, które mogłyby działać na innych etapach cyklu życiowego wirusa, co zwiększałoby ich skuteczność wobec szczepów opornych.

Glikoproteiny hemaglutynina (HA) i neuraminidaza (NA), które stanowią główny składnik cząstek wirusa grypy są białkami silnie glikozylovanymi. Glikoproteina NA w rejonie główki posiada 4 miejsca *N*-glikozylacji, natomiast glikoproteina HA zawiera od 3 do 9 potencjalnych miejsc *N*-glikozylacji (Schulze, 1997; Ward et al., 1983). Ilość i rodzaj przyłączonych *N*-glikanów w dużej mierze zależy od szczepu i podtypu wirusa grypy (Inkster et al., 1993). Wiadomo, że oligosacharydy dołączone do główki HA cechują się znaczną różnorodnością, natomiast te dołączone do trzonu białka są silnie konserwowane, co sugeruje, że odgrywają istotną rolę w procesie fałdowania oraz stabilizowania struktury homotrimerycznej glikoproteiny (Wagner et al., 2000). Co więcej, badania wykazały, że brak *N*-glikanów dołączonych do HA hamuje replikację wirusa w hodowli komórkowej *in vitro* (Wagner et al., 2002).

Wirus zapalenia wątroby typu C został zidentyfikowany w 1989 r. jako czynnik etiologiczny wywołujący wirusowe zapalenie wątroby typu C. Według szacunków WHO z 2016 r. liczba osób zakażonych na świecie wynosi około 180 mln, co stanowi prawie 2% populacji. HCV powoduje często przewlekłą infekcję, która w 20-30% zainfekowanych osób prowadzi do marskości oraz nowotworu wątroby; w wielu przypadkach jedyną efektywną kuracją jest przeszczep (Lavanchy, 2011).

Z uwagi na brak szczepionki, do 2011 roku jedyna możliwa terapia antywirusowa opierała się na podawaniu pegylowanego interferonu alfa i rybawiryny (Fried et al., 2002). Skuteczność tej terapii była jednakże stosunkowo niska. W zależności od genotypu wirusa 40-80% pacjentów wykazywała trwałą odpowiedź na leczenie antywirusowe (SVR, ang. „sustained virological response”). W kolejnych latach pojawiały się na rynku leki przeciwwirusowe należące do tzw. „direct-acting antivirals (DAAs)”, które hamują aktywność białek wirusowych (proteazy NS3/4A, polimerazy NS5A czy NS5B). Były to m.in. telaprewir, boceprewir, deklataswir, simeprewir, ledipaswir czy sofosbuwir. Stosowanie tych leków w monoterapii wiązało się jednak z rozwojem szczepów lekoopornych (Barth, 2015; Pawlotsky, 2013). Obecnie stosowane terapie oparte są na kombinacji różnych leków należących do DAAs. Terapia skojarzona ma, w porównaniu z monoterapią, wyższą skuteczność, ale wiąże się z dodatkowymi działaniami niepożądanymi, możliwymi interakcjami między lekami oraz dużo wyższymi kosztami. Oczywiście jest, że należy poszukiwać nowych terapeutyków, które działają w odmienny sposób od obecnie stosowanych.

Wirus HCV zawiera na swojej powierzchni dwie silnie glikozylowane glikoproteiny osłonkowe (E1 i E2) tworzące heterodimer odgrywający istotną rolę w pierwszych etapach cyklu życiowego wirusa (Lindenbach and Rice, 2013). Białko E1 posiada 5-6, a białko E2 9-11 miejsc *N*-glikozylacji zależnie od szczepu. Tak jak w przypadku wirusa grypy, w wielu przeprowadzonych badaniach pokazano istotną rolę *N*-glikanów w dojrzewaniu białek wirusa HCV oraz ich wpływ na pełnione funkcje w cyklu życiowym (Helle et al., 2010; Lavie et al., 2006; Meunier et al., 1999).

Wirus kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV, z ang. „tick-borne encephalitis virus”), należący do rodziny *Flaviviridae*, jest czynnikiem etiologicznym groźnego schorzenia ośrodkowego układu nerwowego przenoszonego przez kleszcze, zwanego kleszczowym zapaleniem mózgu (KZM). Infekcja TBEV może prowadzić u ludzi do zapalenia opon mózgowych, zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych, a nawet do śmierci (Dumpis et al., 1999). Kleszczowe zapalenie mózgu rozpoznano po raz pierwszy w 1937 roku w Rosji (Silber and Soloviev, 1946). Obecnie TBEV występuje w 28 krajach Europy Środkowej i Wschodniej, Skandynawii oraz w wielu rejonach Azji (Donoso Mantke et al., 2011).

Na przełomie ostatnich 20 lat obserwuje się znaczący wzrost (około 400%) przypadków kleszczowego zapalenia mózgu (Donoso Mantke et al., 2011). Częstość występowania KZM

wzrasta nie tylko w krajach, w których TBEV występuje powszechnie, ale wirus rozprzestrzenia się na nowe obszary, gdzie nie był wcześniej rejestrowany, prawdopodobnie z powodu zmian klimatycznych (Steffen, 2016). Pomimo tego, że na rynku dostępne są szczepionki oparte na inaktywowanym wirusie TBEV, szczepienia nie są obowiązkowe, a jedynie rekomendowane dla osób z grup wysokiego ryzyka (leśnicy) oraz podróżujących w rejony endemiczne. Z tego powodu, co roku rejestrowanych jest ponad 12 000 przypadków infekcji wywołanych przez TBEV na świecie (Ruzek et al., 2019). Podane dane są szacunkowe i mogą stanowić jedynie 30% wszystkich zakażeń TBEV, gdyż dotyczą tylko rejestrowanych = hospitalizowanych przypadków. Do tej pory nie ma na rynku leku, który wykazywałby skuteczność przeciwko KZM. Stosuje się wspomagające leczenie objawowe, np. podaje się leki przeciwzapalne oraz leki zmniejszające ciśnienie śródczaszkowe. W obliczu przedstawionych danych wydaje się całkowicie uzasadnione, iż badania naukowe mające na celu poszukiwanie nowych związków anti-TBEV są traktowane priorytetowo zarówno w Europie jak i na świecie.

TBEV zawiera dwa białka powierzchniowe, które odgrywają istotną rolę w wejściu wirusa do komórek gospodarza: glikoproteina E oraz białko prM/M. Oba białka posiadają przynajmniej jedno silnie konserwowane miejsce N-glikozylacji (Rey et al., 1995). Ostatnie badania wskazują, że brak N-glikanów przyłączonych do glikoproteiny E wpływają na zmianę konformacji białka tym samym obniżając infekcyjność wirionów (Yoshii et al., 2013). W badaniach *in vivo* udowodniono, że mutanty wirusowe zbudowane z nieglikozylowanego białka E nie były infekcyjne w modelu mysim, potwierdzając, że hamowanie glikozylacji może być nowym celem dla związków anti-TBEV.

Głównym celem prac przedstawionych jako osiągnięcie naukowe było wykazanie, że hamowanie procesu glikozylacji białek przy użyciu zaprojektowanych potencjalnych inhibitorów GTs może stanowić nowatorskie podejście pozwalające na skuteczne zwalczanie infekcji wirusowych. W momencie rozpoczęcia badań niewiele było doniesień literaturowych opisujących syntezę i aktywność związków należących do inhibitorów glikozylacji. Większość publikowanych prac dotyczyła aktywności inhibitorów hamujących funkcje białek wirusowych m.in. proteazy czy polimerazy jako potencjalnych leków antywirusowych. Na początku do badań wykorzystałam związki IW3 i IW7, należące do inhibitorów późnych etapów procesu glikozylacji białek. Modelem do badań był wirus grypy, dla którego wciąż poszukuje się nowych leków, które mogłyby stanowić alternatywną metodę leczenia infekcji [Publikacja 1]. Informacje na temat wszystkich dostępnych na rynku leków antywirusowych wobec wirusa grypy jak i przegląd wszystkich związków znajdujących się w różnych fazach badań (od przedklinicznych do zaawansowanych badań klinicznych) zawarłam w pracy przeglądowej [Publikacja 2]. W kolejnej części osiągnięcia naukowego przeprowadziłam szeroko pojętą analizę aktywności antywirusowej nowych, zsyntetyzowanych pochodnych związków IW3 i IW7. Przeprowadzone badania ukierunkowane były na wyselekcjonowanie związków o znaczącej aktywności antywirusowej wobec wirusa grypy, wirusa zapalenia wątroby typu C jak i wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Ta część mojego osiągnięcia opisana jest w Publikacjach 3, 4 i 5.

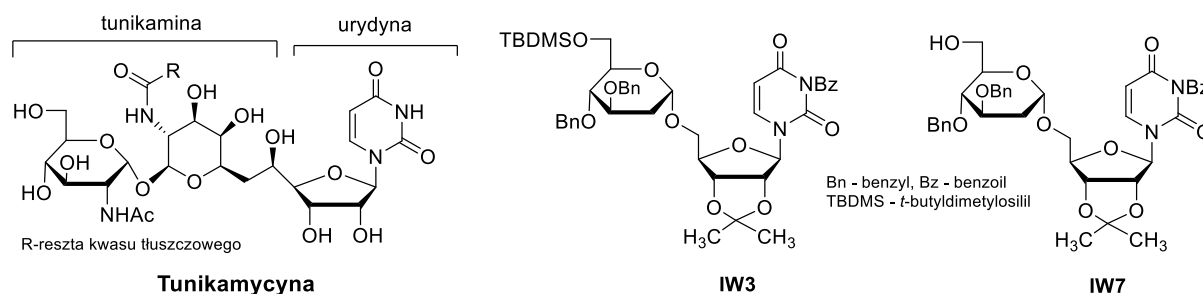
Równoległe podjęłam próbę identyfikacji nowych związków antywirusowych należących do glikokoniugatów urydynowych oraz wykazania ich aktywności przeciwwirusowej w stosunku do wirusów z rodziny *Flaviviridae* [Publikacje 6 i 7].

Omówienie szczegółowe prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego:

P.1. Krol, E.*, Wandzik, I., Gromadzka, B., Nidzworski, D., Rychłowska, M., Matlach, M., Tyborowska, J., Szewczyk, B. (2013). Anti-influenza A virus activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars. *Antiviral Research*, 100, 90-97.

Cel naukowy pracy:

Głównym celem pracy było zbadanie aktywności antywirusowej wyselekcjonowanych w poprzednich badaniach związków IW3 i IW7 należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów wobec wirusa grypy. Związki te posiadają urydynę i jednostkę 2-deoksy-*O*-glikozydową (Schemat 1). Naśladują one fragment urydynodifosforanu, który jest częścią naturalnych substratów GTs typu donora. Ich mechanizm antywirusowy wobec wirusa klasycznego pomoru świń polegał na hamowaniu późnych etapów procesu glikozylacji białek. Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie czy działanie antywirusowe związków IW3 i IW7 polegające na inhibicji procesu glikozylacji białek jest uniwersalne. W ramach tej pracy chciałam również sprawdzić konsekwencje zahamowania procesu glikozylacji na namnażanie wirusa grypy w hodowli komórkowej *in vitro*.



Schemat 1. Wzory chemiczne tunikamycyny oraz jej analogów z grupy urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (IW3 i IW7).

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

W celu badania aktywności związków wprowadziłam do laboratorium metodę namnażania wirusa grypy z użyciem linii komórek nerki psa (MDCK, ang. „Madin Darby canine kidney cells”) (Tree et al., 2001). Klasyczną metodą namnażania wirusa grypy jest hodowla wirusa w wolnych od patogenów zarodkach kurzych. Technika ta ma jednak poważne wady. Jedną z nich jest niska wydajność namnażania ludzkich szczepów wirusa grypy oraz co bardziej istotne, wirusy uzyskane w zapłodnionych jajach kurzych różnią się od oryginalnych izolatów klinicznych profilem glikozylacji białek, co powoduje, że nie są odpowiednim modelem do badania inhibitorów glikozylacji (Meyer et al., 1993).

Wykorzystując dwa szczepy wirusa grypy: ludzki pandemiczny szczep A/H1N1 oraz ptasi szczep H5N2 (A/ostrich/Denmark/725/96) przebadłam aktywność związków IW3 i IW7 w hodowli komórkowej *in vitro*. Takie podejście eksperymentalne zastosowano ze względu na to, że wirus grypy cechuje się ogromną zmiennością genetyczną, a ilość i rodzaj przyłączonych *N*-glikanów do białek osłonkowych HA i NA jest różna dla różnych szczepów i podtypów wirusa. Wirus grypy jest wirusem cytopatycznym, który powoduje zmiany morfologiczne i degeneracyjne w komórkach, w których się replikuje, w związku z tym do badań aktywności związków wykorzystano test redukcji łyseinek wirusowych oraz test zahamowania efektu

cytopatycznego. Uzyskane wyniki wykazały, że związki IW3 i IW7 posiadają aktywność przeciwwirusową wobec wirusa grypy, gdyż znacząco hamowały efekt cytopatyczny oraz powodowały dawko-zależną redukcję ilości i wielkości łysinek wirusowych w hodowli komórkowej. Ponieważ hamowanie procesu glikozylacji ma bezpośredni wpływ na dojrzewanie białek wirusowych, w kolejnym etapie prezentowanej pracy sprawdziłam wpływ inhibitorów IW3 i IW7 na poziom syntezy białek wirusa grypy. Przeprowadzona analiza wykazała, że związki należące te redukują w sposób dawko-zależny poziom syntezy białek strukturalnych wirusa. Ciekawa okazała się obserwacja, że przy zastosowaniu najwyższych dawek badanych związków poziom syntezy zmienionych form glikoprotein był poniżej poziomu wykrywalności. Nie obserwowano powstawania form nieglikozylowanych lub nie w pełni glikozylowanych glikoprotein. Dane literaturowe wskazują, iż tunikamycyna jest aktywatorem stresu występującego w ER, który spowodowany jest nagromadzeniem źle sfałdowanych białek (Schröder, 2008). Testowane inhibitory, które są strukturalnie bardzo zbliżone do tunikamycyny posiadają podobny mechanizm działania, co powoduje, że prawdopodobnie hamując proces glikozylacji powodują powstawanie zmienionych form glikoprotein, które ulegają natychmiastowej degradacji.

W celu potwierdzenia mechanizmu działania związków w stosunku do wirusa grypy oceniłam wpływ związków IW3 i IW7 na poziom syntezy wirusowego RNA 8, 24 i 48 h po infekcji. W badaniach wykorzystano dwuetapową metodę „real-time PCR” z wykorzystaniem fluorescencyjnego barwnika interkalującego SYBR Green I. Zastosowanie opisanego wyżej podejścia umożliwiło wykazanie, że poziom syntezy wirusowego RNA po 1 cyklu życiowym wirusa grypy (8 h) nie ulega zmianie w zainfekowanych komórkach, co potwierdziło, że aktywność antywirusowa związków nie jest związana z hamowaniem procesu replikacji. Ponadto, analiza poziomu RNA z pożywki znad infekowanych komórek 8 h po infekcji wykazała istotny wpływ związków na sekrecję cząstek wirusowych do pożywki. Wyniki tego doświadczenia zostały również potwierdzone przy zastosowaniu miareczkowania lizatów wirusowych produkowanych pod wpływem badanych inhibitorów, gdzie obserwowano znaczącą redukcję ich miana. Wyniki analizy „real-time PCR” przeprowadzonej 24 i 48 h po infekcji potwierdziły hipotezę badawczą, iż badane inhibitory hamując proces glikozylacji białek powierzchniowych zaburzają składanie cząsteczek wirusowych lub powodują powstawanie cząsteczek wirusowych o znacznie obniżonej infekcyjności, jak zostało to pokazane dla tunikamycyny (Nakamura and Compans, 1978; Schwarz et al., 1976).

Znaczenie uzyskanych wyników:

Powyższa publikacja jest pierwszą pracą opisującą aktywność antywirusową związków IW3 i IW7 należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (analogów tunikamycyny), które hamują proces glikozylacji białek w stosunku do wirusa grypy. Zaledwie kilka publikacji dostępnych w międzynarodowych bazach danych opisywało wpływ tunikamycyny oraz castanosperminy na powstawanie białek tego wirusa (Elbein et al., 1984; Pan et al., 1987; Saito and Yamaguchi, 2000). W ramach przeprowadzonych badań wykazałam, że związki IW3 i IW7 hamując proces glikozylacji białek zakłócają składanie i/lub sekrecję wirusów potomnych po pierwszym cyklu życiowym wirusa, co bezpośrednio wpływa na obniżenie miana wirusa produkowanego w kolejnych cyklach życiowych. Wyniki badań zawartych w pracy potwierdziły naszą koncepcję, że hamowanie procesu glikozylacji wirusowych białek powierzchniowych może stanowić obiecującą opcję terapeutyczną w leczeniu zakażeń wirusowych. Z przeprowadzonych badań istotny był jednak fakt, iż związki pomimo swojej aktywności antywirusowej i dużo mniejszej toksyczności niż tunikamycyna, nie charakteryzowały się wysokimi indeksami selektywności. Indeks selektywności (S.I., ang. „selectivity index”) informuje o skuteczności potencjalnego leku i jest stosunkiem dawki

związku wywołującej objawy cytotoksyczne do dawki związku potrzebnej do wywołania efektu przeciwwirusowego (CC₅₀/IC₅₀). S.I. dla związku IW3 wynosił 8,83, a dla IW7 zaledwie 1,96. Niemniej jednak wiedza uzyskana w trakcie realizacji powyższych doświadczeń posłużyła do syntezy kolejnych związków, których aktywność antywirusowa opisana jest w kolejnych pracach [Publikacja 3, 4 i 5].

P. 2. Król, E.*, Rychłowska, M., Szewczyk, B. (2014). Antivirals - current trends in fighting influenza. *Acta Biochimica Polonica* 61, 495–504.

Cel naukowy pracy:

Celem pracy było zebranie i omówienie aktualnego stanu wiedzy na temat dostępnych na rynku terapii przeciwko wirusowi grypy jak i przegląd literatury dotyczącej aktywności związków antywirusowych posiadających różne mechanizmy działania w stosunku do tego patogenu będących w różnych fazach badań (od przedklinicznych do zaawansowanych badań klinicznych).

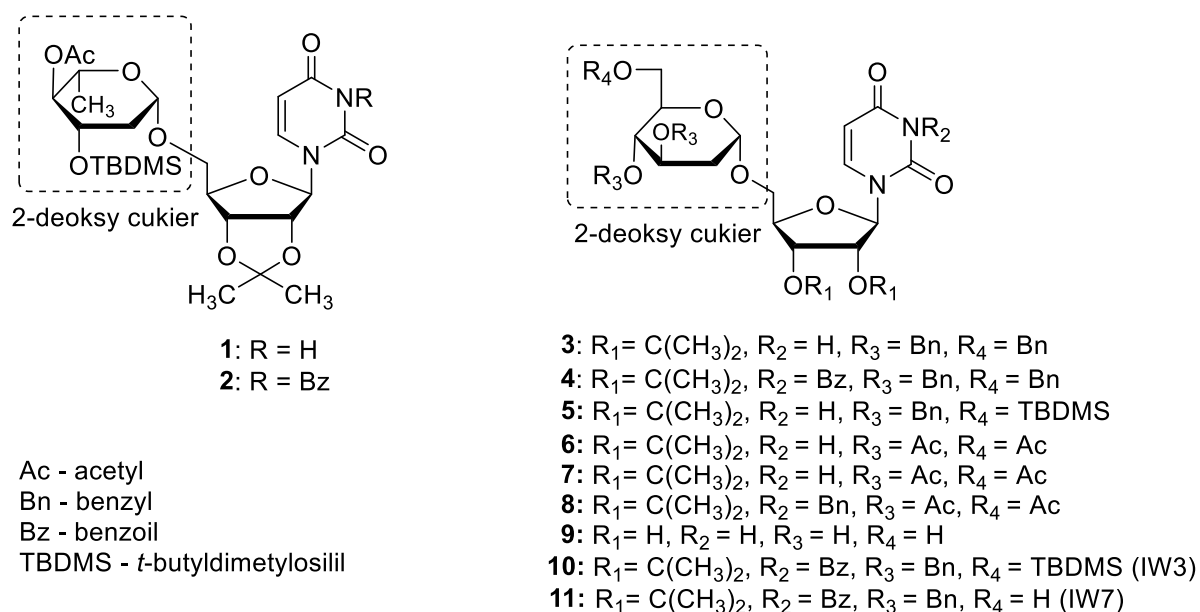
Syntetyczny opis pracy:

Praca przeglądowa, która powstała na specjalne zaproszenie Edytora *Acta Biochimica Polonica*, obejmowała zagadnienia dotyczące dostępnych jak i możliwych terapii antywirusowych wobec wirusa grypy. W pracy przedstawiłam strategie antywirusowe oparte na dwóch rodzajach leków antywirusowych: inhibitorach białka M2 (amantadyna (Symmetrel®) i rymantadyna (Flumadine®) oraz inhibitorach neuraminidazy (NA) (oseltamiwir (Tamiflu®) i zanamiwir (Relenza®). Omówiłam dokładny mechanizm działania związków, ich brak aktywności wobec niektórych szczepów wirusa grypy oraz wpływ tych leków na powstawanie szczepów lekoopornych, co spowodowane jest mutacjami w obrębie genów białek M2 i NA wirusa grypy. W dalszej części pracy przedstawiłam alternatywne metody leczenia wirusa grypy. Zebrałam oraz usystematyzowałam wiedzę na temat związków będących w różnych fazach badań. Szczegółowo omówiłam związki ze względu na ich mechanizm działania, który związany jest z hamowaniem aktywności enzymatycznej białek wirusowych lub interakcji wirus/komórka gospodarza. Przedstawiłam wszystkie dostępne badania naukowe dotyczące inhibitorów białek wirusowych: białka powierzchniowego hemaglutyniny, białka tworzącego kanał jonowy M2, neuraminidazy oraz nukleoproteiny. Publikacja przeglądowa przedstawia ponadto zebrane przeze mnie oraz usystematyzowane informacje o możliwych strategiach antywirusowych opartych na hamowaniu aktywności białek gospodarza: hamowanie etapu przyłączania wirusa grypy do komórek gospodarza czy hamowanie endocytozy lub fuzji błon. Co więcej, zostały omówione badania dotyczące terapii skojarzonej obejmującej połączenie kilku leków posiadających odmienne mechanizmy działania w celu uzyskania skutecznej terapii bez wywoływania lekooporności.

P.3. Krol, E.*, Wandzik, I., Krejmer-Rabalska, M., Szewczyk, B. (2017). Biological evaluation of uridine derivatives of 2-deoxy sugars as potential antiviral compounds against influenza A virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1700.

Cel naukowy pracy:

Dzięki kontynuowaniu współpracy naukowej z dr hab. Iloną Wandzik, prof. Pol. Śl. z Katedry Chemii Organicznej, Bioorganicznej i Biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Śląskiej w Gliwicach w ramach niniejszej pracy kontynuowałam badanie aktywności antywirusowej grupy urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów. Opierając się na pozytywnych wynikach z użyciem inhibitorów IW3 i IW7 zespół dr. Wandzik zsyntetyzował kilka nowych związków chemicznych, które zawierały różne modyfikacje strukturalne albo w części 2-deoksy cukru albo w części urydynowej (Schemat 2).



Schemat 2. Schemat przedstawiający strukturę zsyntetyzowanych związków.

Celem pracy było sprawdzenie aktywności antywirusowej związków wobec wirusa grypy. Przeprowadziłam także analizę wpływu wprowadzonych modyfikacji na aktywność przeciwwirusową związków. Modyfikacje miały na celu poprawę indeksów selektywności badanych związków w stosunku do związków wyjściowych IW3 i IW7. Do badań uzyskałam związki, które posiadały zróżnicowane pod względem lipofilowości zabezpieczenia grup hydroksylowych obecnych zarówno w części 2-deoksy cukru jak i w części rybozy. Ponadto, modyfikacjami objęty został azot uracylowy (N³). Dla porównania uzyskałam także całkowicie odbezpieczone pochodne niezawierające grup ochronnych. Pojęcie odbezpieczonych i zabezpieczonych odnosi się do obecności lub braku ochronnych grup funkcyjnych i będzie stosowane w dalszej części tekstu.

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

Mając na uwadze fakt, iż glikoproteiny powierzchniowe różnych szczepów wirusa grypy różnią się ilością potencjalnych miejsc *N*-glikozylacji w badaniach zastosowałam dwa różne szczepy wirusa grypy: ludzi szczep pandemiczny H1N1 oraz ptasi szczep H5N2. Przeprowadzone doświadczenia z wykorzystaniem testu redukcji łąsinek wirusowych oraz testu zahamowania efektu cytopatycznego wykazały, że trzy spośród testowanych związków (2, 3 i 4) posiadają znaczącą aktywność przeciwwirusową wobec obu testowanych szczepów wirusa grypy. Związki te w sposób dawko-zależny hamowały namnażanie wirusa grypy w hodowli komórkowej *in vitro*, co obserwowano jako znaczącą redukcję ilości i wielkości łąsinek wirusowych po traktowaniu badanymi związkami. Wartości IC_{50} (ang. „*inhibitory concentration 50%*”), wynosiły między 82 a 100 μM . Pozostałe związki nie wykazały znaczącej aktywności wirusowej.

Opierając się na analizie porównawczej struktury związków wykazano, że obecność niektórych grup hydrofobowych: grupy benzoilowej, benzylowej, *tert*-butylodimetylosililowej (TBDMS) lub izopropylidenowej jest istotna do zwiększenia aktywności antywirusowej związków. Można przypuszczać, że etapem limitującym aktywność jest zdolność do przenikania przez błony biologiczne. Stwierdzono, że związki 2, 3, 4 charakteryzowały się największą hydrofobowością i były najbardziej aktywne z całej serii (IC_{50} w zakresie 82-100 μM). Związki te posiadały różne fragmenty 2-deoksy cukrów, w przypadku związku 2 była to 2-deoksy-ramnopiranoza, a w pozostałych dwóch 2-deoksy-glukopiranoza. Jednak wszystkie wspomniane związki posiadały całkowicie zabezpieczone grupy hydroksylowe w części 2-deoksy cukru za pomocą różnej kombinacji grup benzylowych, TBDMS lub acetylowych. Związek 5 charakteryzował się zdecydowanie wyższą toksycznością od pozostałych. Związki 7, 8 i 9, które zawierały wolne grupy hydroksylowe w części 2-deoksy cukru charakteryzowały się zdecydowanie niższą aktywnością (IC_{50} w zakresie 346-721 μM). Podobnie niską aktywność miał związek 6 (IC_{50} 575 μM), który zawierał zabezpieczone grupy hydroksylowe w części 2-deoksy-glukopiranozy w postaci estrów acetylowych, jednakże hydrofobowość tego związku była zbyt niska i prawdopodobnie to wpłynęło na słabą aktywność.

W dalszym etapie pracy sprawdziłam wpływ inhibitorów na etap cyklu życiowego jak i kinetykę wzrostu wirusa grypy zarówno po jednym jak i kilku cyklach replikacyjnych. Wykazałam, że tak jak w przypadku inhibitorów IW3 jak i IW7 aktywność antywirusowa związków jest związana jest z hamowaniem późnych etapów cyklu życiowego wirusa. Przeprowadzona analiza wpływu zsyntetyzowanych związków na syntezę glikoprotein wirusowych potwierdziła, że związki w sposób dawko-zależny redukują poziom syntezy białek strukturalnych wirusa w zainfekowanych komórkach MDCK przy niezmienionej ilości referencyjnych białek komórkowych. Tak jak w przypadku związków wyjściowych (IW3 i IW7) nie obserwowano powstawania nieglikozylowanych lub nie w pełni glikozylowanych form białek, co świadczyło o szybkiej degradacji nie w pełni dojrzałych form białek wirusa.

Znaczenie uzyskanych wyników:

Przeprowadzone badania wykazały, że trzy nowo zsyntetyzowane związki (2, 3 i 4) należące do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (analogi związków IW3 i IW7) posiadają aktywność antywirusową w stosunku do dwóch szczepów wirusa grypy. W prezentowanej pracy wykazałam, że związki te mogą stanowić obiecujące podejście terapeutyczne w stosunku do wirusa grypy, inne niż stosowane obecnie metody leczenia. Ponadto, w ramach przeprowadzonych badań udowodniłam, że niektóre modyfikacje strukturalne związków mogą znacząco poprawić ich aktywność przeciwwirusową bez zwiększania cytotoksyczności, przyczyniając się do poprawy indeksu selektywności. Związki

2, 3 i 4 posiadały wyższy SI od wyjściowego IW7. Potwierdzenie aktywności urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów pozwala na rozpoczęcie prac nad projektowaniem kolejnych związków w oparciu o nowe modyfikacje strukturalne w celu uzyskania jeszcze bardziej aktywnych inhibitorów infekcji grypowych.

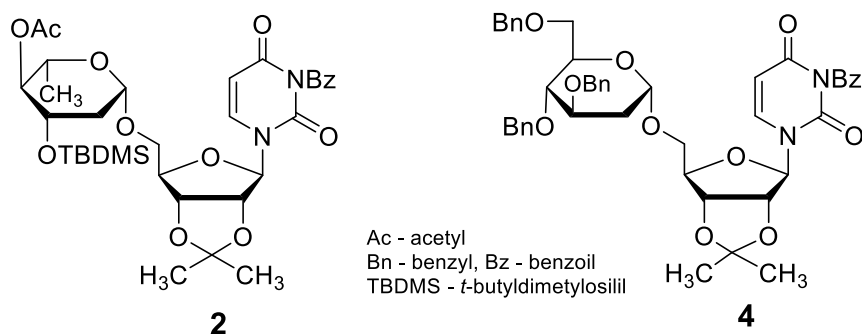
P.4. Krol, E.*, Wandzik, I., Pastuch-Gawolek, G., Szewczyk, B. (2018). Anti-hepatitis C virus activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars. *Molecules*, 23(7). pii: E1547

Cel naukowy pracy:

Terapia wobec wirusa zapalenia wątroby typu C opiera się w głównej mierze na stosowaniu leczenia skojarzonego składającego się z połączenia kilku dostępnych leków ze względu na ogromny problem lekooporności w przypadku stosowania monoterapii. Chociaż obecne kombinacje leków są dobrze tolerowane, ich stosowanie jest ograniczone przez niezwykle wysokie koszty ograniczające dostęp do terapii w skali globalnej (Barth, 2015; Rosenthal and Graham, 2016). W momencie rozpoczęcia badań zaledwie jeden zespół zajmował się badaniem aktywności pochodnych deoksynoijirimycyny (DNJ), które należą do inhibitorów α -glukozydaz I i II obecnych w retikulum endoplazmatycznym jako związków o potencjalnym zastosowaniu wobec wirusa HCV (Chapel et al., 2006, 2007). Jako cel pracy przyjąłam sprawdzenie, czy wyselekcjonowane w poprzedniej pracy związki (2, 3 i 4) należące do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów cechują się aktywnością antywirusową również wobec wirusa zapalenia wątroby typu C. Pragnęłam określić dokładny mechanizm działania związków stosując wszystkie dostępne obecnie systemy eksperymentalne służące do badania cyklu życiowego wirusa HCV *in vitro* (m.in. system bakulowirusowy, replikonowy, rekombinowanych cząsteczek retrowirusowych pseudotypowanych glikoproteinami wirusa HCV (HCVpp) jak i infekcyjnego wirusa HCV w hodowlach komórkowych (HCVcc)).

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

Badanie właściwości antywirusowych całej serii związków należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów przeprowadziłam z użyciem infekcyjnego wirusa HCV *in vitro* (HCVcc) w zmodyfikowanej linii komórek hepatoma Huh7.5 (Lindenbach et al., 2005; Wakita et al., 2005). Ze względu na to, iż wirus HCV nie należy do wirusów cytopatycznych do analizy wykorzystałam test redukcji pseudołyseinek wirusowych. Uzyskane wyniki potwierdziły wcześniejsze badania wskazujące na aktywność antywirusową związków 2 i 4 (Schemat 3). Związek 3 aktywny w badaniach z użyciem wirusa grypy, nie wykazał aktywności z użyciem wirusa HCV. Dzięki współpracy z Prof. Arvindem Patel z University of Glasgow Centre for Virus Research ze Szkocji przeprowadziłam eksperymenty z użyciem ludzkiej linii pochodzącej z komórek nowotworowych wątroby Huh7-J20, która służy do bezpośredniego ilościowego badania poziomu infekcji wirusa HCV przez pomiar wydzielniczej fosfatazy alkalicznej (SEAP) (Iro et al., 2009). Doświadczenia te pozwoliły na określenie dokładnych wartości IC_{50} dla badanych związków, które w przypadku najbardziej aktywnych związków 2 i 4 wynosiły odpowiednio 8,9 and 2,1 μ M. Oba związki cechowały się dosyć niską cytotoksycznością, co pozwoliło na uzyskanie indeksów selektywności odpowiednio 12,7 i 67,6. W badaniach jako kontrolę wykorzystano także Sofosbuvir, który jest zaakceptowanym przez FDA lekiem przeciwwirusowym wobec HCV, będącym inhibitorem wirusowej NS5B RNA-zależnej polimerazy (Lam et al., 2012; Sofia et al., 2010). Wartość SI dla Sofosbuviru wynosiła 120.



Schemat 3. Wzory chemiczne urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (2 i 4).

Wykorzystując uzyskane od Prof. Patel komórki Huh7-J17, które zawierają monocistronowy replikon wirusa HCV kodujący białka niestrukturalne, strukturalne białko rdzenia oraz lucyferazę świetlika, której poziom bezpośrednio koreluje z replikacją RNA wirusa (Angus et al., 2012) udowodniłam, że badane związki nie mają bezpośredniego wpływu na replikację HCV. Wyniki dla inhibitora replikacji Sofosbuviru potwierdziły natomiast użyteczność zastosowanej linii stabilnej w przeprowadzonych badaniach.

Kolejnym krokiem do potwierdzenia mechanizmu działania związków 2 i 4 były doświadczenia z wykorzystaniem systemu rekombinowanych cząsteczek retrowirusowych pseudotypowanych glikoproteinami wirusa HCV nazwanych pseudocząsteczkami HCV (HCVpp) (Bartosch et al., 2003; Hsu et al., 2003). Z przeprowadzonych analiz wynikało, że traktowanie komórek produkujących HCVpp badanymi związkami nie wpływa na ilość produkowanych HCVpp, lecz powoduje powstawanie pseudocząsteczek o znacznie obniżonej infekcyjności. Dostatecznie zaskakującym wynikiem było udowodnienie, że badane związki nie wpływały bezpośrednio na poziom syntetyzowanych białek powierzchniowych wirusa HCV produkowanych w tym systemie jak i na ilość białek wbudowanych do HCVpp. Obniżenie infekcyjności związane było z wbudowywaniem zmienionych form glikoprotein do pseudocząsteczek. Wyniki te były spójne z wynikami uzyskanymi w tym samym systemie z użyciem inhibitorów glikozydaz obecnych w ER (Chapel et al., 2007). W przeprowadzonych badaniach jako kontrolę zastosowano także tuniikamycynę. Jednakże w przypadku tego związku udowodniono, że mechanizm jego działania związany jest z hamowaniem wbudowywania zmienionych form glikoprotein do HCVpp, co bezpośrednio wpływa na obniżenie ich infekcyjności.

Szeroko pojęta analiza aktywności związków pozwoliła na dostarczenie niezbitych dowodów potwierdzających brak przydatności systemu HCVpp jako modelu do badania aktywności związków zaburzających dojrzewanie białek wirusowych. Wcześniejsze doniesienia pokazywały różnice w profilu glikozylacji białek HCV produkowanych w systemie HCVpp i HCVcc (Vieyres et al., 2010). Może to być związane z faktem, iż składanie cząsteczek infekcyjnych w systemie HCVcc występuje w ER, natomiast HCVpp w przedziałach post-Golgi (Gastaminza et al., 2008; Huang et al., 2007; Sandrin et al., 2005). W związku z tym glikoproteiny wirusowe produkowane w systemie HCVcc ulegają innym modyfikacjom post-translacyjnym niż te w systemie pseudocząsteczek HCVpp.

Znaczenie uzyskanych wyników:

Uzyskane wyniki potwierdziły znaczącą aktywność urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (związków 2 i 4) wobec wirusa zapalenia wątroby typu C. SI dla najbardziej

aktywnego związku 4 wynosił 67,6. SI dla Sofosbuviru wynosił 120. W przeprowadzonych badaniach wykazałam, że hamowanie procesu glikozylacji może stanowić nowe podejście antywirusowe, w leczeniu infekcji wywołanych przez tego wirusa. Związki hamujące proces glikozylacji białek mogłyby być stosowane w przyszłej terapii skojarzonej. Zaprezentowane wyniki sugerują potencjalnie szerokie spektrum działania związków 2 i 4, gdyż wykazały one aktywność przeciwko dwóm niespokrewnionym wirusom, HCV i wirusowi grypy. Ponadto, wykazałam, że system rekombinowanych cząsteczek retrowirusowych pseudotypowanych glikoproteinami wirusa HCV nazwanych pseudocząsteczkami HCV nie nadaje się do badania aktywności związków, których mechanizm działania związany jest z dojrzewaniem powierzchniowych glikoprotein wirusowych.

P.5. Krol, E.*, Wandzik, I., Brzuska, G., Eyer, L., Růžek, D., Szewczyk, B. (2019).
Antiviral activity of uridine derivatives of 2-deoxy sugars against tick-borne encephalitis virus. *Molecules*, 24(6). pii: E1129

Cel naukowy pracy:

Celem pracy było ostateczne potwierdzenie hipotezy dotyczącej hamowania procesu glikozylacji białek przy użyciu inhibitorów GTs jako innowacyjnej, potencjalnej metody terapeutycznej w leczeniu zakażeń wirusowych. Doświadczenia były prowadzone z wykorzystaniem wirusa kleszczowego zapalenia mózgu, dla którego do chwili obecnej nie ma na rynku dostępnych leków antywirusowych. Do badań wykorzystałam całą grupę związków należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów (związki 1-9 oraz IW3 i IW7).

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

Na wstępie wprowadziłam do laboratorium metodę namnażania wirusa TBEV z użyciem komórek nowotworowych płuc A549. W pracy zastosowałam dwa szczepy wirusa TBEV; mniej infekcyjny szczep Neudoerfl oraz bardziej infekcyjny szczep Hypr. Wirus TBEV podobnie jak wirus grypy należy do wirusów cytopatycznych. Przy zastosowaniu testu redukcji łysek wirusowych oraz testu zahamowania efektu cytopatycznego wykazałam, że z pośród wszystkich testowanych związków związki 2, 4, IW3 (10) i IW7 (11) posiadały największą aktywność, prawie całkowicie hamując propagację wirusa w komórkach. Wszystkie aktywne związki w znaczący sposób redukowały miano dwóch testowanych szczepów wirusa TBEV. Związek 4 podobnie jak w przypadku badań z wykorzystaniem HCV był najbardziej aktywnym z badanych inhibitorów, zmniejszając obecność wirusa poniżej progu wykrywalności. Ponadto, przeprowadziłam szczegółową analizę wpływu związków na miano wirusów produkowanych w komórkach traktowanych związkami w szerokim zakresie stężeń w różnym czasie po infekcji. Zaobserwowałam, że związki 2, 4, IW3 i IW7 istotnie zmniejszały miano wirusa w sposób zależny od dawki, w każdym z trzech testowanych dni po infekcji, co potwierdzało stabilność związków w hodowli komórkowej. Wyniki potwierdziły najwyższą aktywność w przypadku związku 4, dla którego w trzecim dniu po infekcji przy najwyższych testowanych stężeniach miano wirusa zredukowane było do 0. Wartość IC_{50} dla tego związku wynosiła 1,4 μ M, co pozwalało na uzyskanie bardzo wysokiego indeksu selektywności o wartości 85. Wartości SI dla pozostałych związków 2, IW3 i IW7 wynosiły odpowiednio 26,6, 18,6 i 13,8. Analiza wpływu związków na produkcję białek wirusowych wykazała, że tak jak w przypadku wcześniej zaprezentowanych prac, obserwowano zależne od dawki zahamowanie syntezy białek wirusowych. Tak jak poprzednio nie obserwowano powstawania nieglikozylowanych

form białek TBEV, co potwierdzało tylko przypuszczenie, że niedojrzałe formy białek są bardzo szybko skierowane na drogę degradacji.

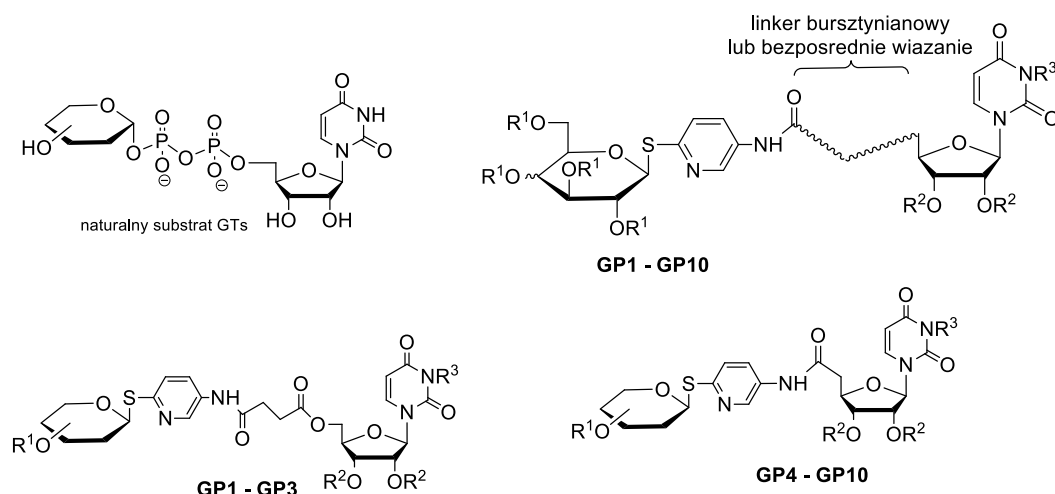
Znaczenie uzyskanych wyników:

W publikacji przedstawiono wyniki badań, które doprowadziły do wykazania, że hamowanie procesu glikozylacji białek może być podstawą innowacyjnej terapii antywirusowej wobec wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Ponadto, uzyskane wyniki potwierdziły, że wyselekcjonowany związek 4 posiada bardzo duży potencjał aplikacyjny, gdyż w przedstawionych badaniach wykazał się wysokim indeksem selektywności wynoszącym 85. Po raz kolejny przeprowadzone doświadczenia potwierdziły również szerokie spektrum działania badanych związków należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów, potwierdzając ich potencjał.

P.6. Pastuch-Gawolek, G., Chaubey, B., Szewczyk, B., **Król, E***. (2017). Novel thioglycosyl analogs of glycosyltransferase substrates as antiviral compounds against classical swine fever virus and hepatitis C virus. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 247-262.

Cel naukowy pracy:

W ramach współpracy z dr hab. inż. Gabriellą Pastuch-Gawolek z Politechniki Śląskiej w Gliwicach uzyskałam do badań nową grupę inhibitorów GTs - glikokoniugatów zawierających fragment urydynowy (związkom tym nadano numery od GP1-10 zgodnie z kolejnością ich syntezy) (Schemat 4). W tych związkach (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydy są połączone bezpośrednio z pochodną urydyny lub też z wykorzystaniem łącznika. Modyfikacja naturalnego łącznika difosforanowego, który obecny jest w strukturze UDP-cukru miała na celu zmianę jego anionowego charakteru i ułatwienie wnikania do komórek przez błony biologiczne.



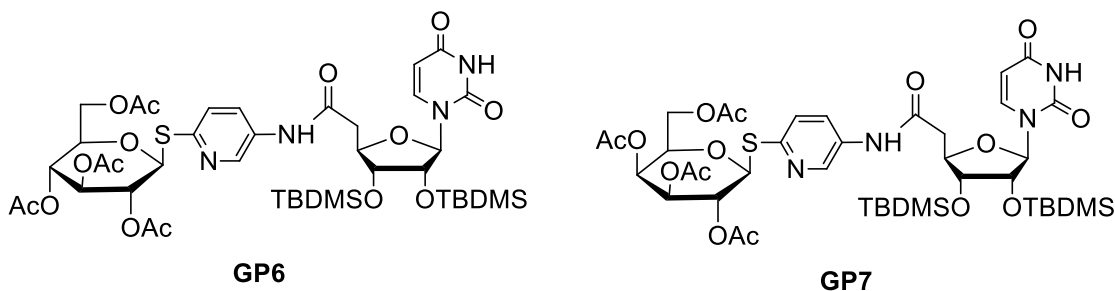
R¹: acetyl, benzoil, TBDMS lub H, R²: izopropyliden, TBDMS lub H, R³: H lub benzoil

Schemat 4. Schemat przedstawiający naturalny substrat GTs oraz struktury zsyntetyzowanych związków.

W otrzymanych związkach GP1-3 ugrupowanie difosforanowe zostało zastąpione linkerem zawierającym pierścień pirydylowy połączony z kwasem bursztynowym przyłączonym w pozycji C-5' urydyny. W związkach GP4-10 ugrupowanie difosforanowe zastąpiono linkerem zawierającym pierścień pirydylowy połączony bezpośrednio z utlenioną w pozycji C-5' pochodną urydyny. Dla poprawy stabilności tych glikokoniugatów wobec enzymów z grupy glikozylohydrolaz, w obu grupach związków tlen przy węglu anomerycznym jednostki cukrowej (D-glukozy lub D-galaktozy) został zastąpiony atomem siarki. Tak dobrane struktury glikokoniugatów miały pozwolić na stwierdzenie, czy zastosowany fragment kwasu bursztynowego w istotny sposób wpływa na aktywność przeciwwirusową projektowanych związków. Celem pracy była analiza aktywności przeciwwirusowej serii otrzymanych związków przy zastosowaniu modelu ludzkiego wirusa zapalenia wątroby typu C. Badanie aktywności przeprowadziłam również w stosunku do zwierzęcego wirusa klasycznego pomoru świń, aby sprawdzić czy analizowane związki cechują się aktywnością wobec różnych wirusów należących do rodziny *Flaviviridae*. Przeprowadziłam także analizę wpływu wprowadzonych modyfikacji na aktywność związków. Analizowałam wpływ obecności i rodzaju grup zabezpieczających w obu częściach glikokoniugatu: w pierścieniu cukrowym i w ugrupowaniu urydyny. Do badań wykorzystałam związki które posiadały jako grupy zabezpieczające w pierścieniu cukrowym grupy acetylowe, benzoilowe i TBDMS. Grupy te miały zwiększyć hydrofobowość glikokoniugatów i ułatwić im wnikanie do komórki. Z kolei grupy zabezpieczające w części urydyny (izopropylidenowa lub TBDMS) wybrane zostały w celu poprawy hydrofobowości i stabilności związków w komórce.

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

W pierwszym etapie pracy badałam aktywność antywirusową związków wobec wirusa klasycznego pomoru świń, który jest groźnym patogenem wywołującym zakaźną chorobę trzody chlewnej (Artois et al., 2002; Laddomada, 2000). Wirus zakaża głównie świnie, ale zaobserwowano także zakażenia wśród dzików, które stanowią naturalny rezerwuuar wirusa. Klasyczny pomór świń jest jedną z najgroźniejszych chorób trzody chlewnej powodującą ogromne straty ekonomiczne nie tylko w Europie, ale także na całym świecie (Edwards et al., 2000). Po określeniu cytotoksyczności związków wobec komórek nerki świńskiej (SK6, ang. „swine kidney cells”) przebadalam aktywność antywirusową serii związków z użyciem opracowanego wcześniej testu redukcji wielkości pseudołysinek wirusowych. Wirus klasycznego pomoru świń nie wywołuje efektu cytopatycznego, więc przy zakażeniu CSFV nie jest możliwa bezpośrednia obserwacja łysinek jak to ma miejsce dla wirusów cytopatycznych takich jak wirus grypy czy TBEV (Laude, 1987). Zaobserwowałam, że z pośród testowanych związków zaledwie kilka wykazywało aktywność wobec wirusa CSFV. Związki te posiadały wartości IC_{50} poniżej $50 \mu M$ i z powodu niskiej toksyczności tych związków charakteryzowały się one indeksami selektywności od 3,5 do 28,7. Dwa związki (GP6 i GP7) (Schemat 5), które zawierały w swojej budowie fragment acetylowanego (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydu połączony bezpośrednim wiązaniem z zabezpieczonymi grupami TBDMS kwasem urydyno-5'-karboksylowym okazały się być najskuteczniejszymi z badanej serii. Związki te były aktywne przy bardzo niskich stężeniach; IC_{50} wynosiło odpowiednio 3 i $6 \mu M$ i właśnie dla tych związków wartości SI były najwyższe i wynosiły odpowiednio 28,7 i 25,2.



Schemat 5. Wzory chemiczne glikokoniugatów (GP6 i GP7).

W kolejnym etapie pracy przetestowałam związki wobec wirusa zapalenia wątroby typu C stosując zoptymalizowany opisany wcześniej protokół namnażania wirusa w hodowli komórkowej *in vitro* (HCVcc). W badaniach porównawczych zastosowałam również Sofosbuvir, który jest dostępnym na rynku lekiem stosowanym w infekcji HCV. Analiza antywirusowa aktywności związków wykazała, że tak jak w przypadku CSFV, dwa związki (GP6 i GP7) cechowały się najwyższą aktywnością antywirusową wobec HCV. Wartości IC_{50} wynosiły 7 μM , co przy niskiej cytotoksyczności określonej z użyciem testu MTS, prowadziło na uzyskanie wartości SI odpowiednio 19,3 i 24,7.

Przeprowadzona analiza porównawcza wykazała, że rodzaj cukru występującego w zsyntetyzowanych glikokoniugatach (D-glukoza lub D-galaktoza) nie ma znaczącego wpływu na ich aktywność przeciwwirusową. Ponadto, pominięcie łącznika bursztynowego i bezpośrednie połączenie acetylowanych (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydów i kwasu 2',3'-di-*O*-tert-butylodimetylosililourydyno-5'-karboksylowego poprawiło aktywność biologiczną otrzymanych związków, o czym świadczą wyniki uzyskane dla związków GP6 i GP7. Analiza struktury wykazała również istotną rolę grup zabezpieczających obecnych w zsyntetyzowanych glikokoniugatach. Grupami zabezpieczającymi w przypadku dwóch aktywnych związków były: acetylowe grupy we fragmencie cukrowym i grupy TBDMS we fragmencie urydynowym. Zmiana grup zabezpieczających w obu częściach glikokoniugatów zdecydowanie obniżyła aktywność związków wobec dwóch testowanych wirusów. Ponadto, związki częściowo lub w pełni odblokowane nie wykazywały aktywności *in vitro*.

Mechanizm działania zsyntetyzowanych związków nie był znany. Związki te zostały otrzymane jako potencjalne inhibitory glikozylotransferaz, w związku z tym, aby lepiej poznać mechanizm działania przeanalizowałam ich wpływ na syntezę białek HCV i CSFV. Wykazałam, że związki w sposób zależny od dawki hamowały syntezę białek powierzchniowych obu wirusów. Wykorzystując opisaną wcześniej linię stabilną Huh7-J20, przeprowadziłam także doświadczenia mające na celu dokładne określenie wpływu związków na etap cyklu życiowego. Zaprojektowane doświadczenie umożliwiło postawienie hipotezy, że mogą one wpływać na replikację lub składanie wirusa HCV w komórkach gospodarza, co było dosyć niespodziewanym wynikiem. Hipoteza ta została poparta wynikami uzyskanymi dla Sofosbuviru, który jest lekiem hamującym replikację. Aby zweryfikować zaproponowaną hipotezę, zastosowałam linię Huh7-J17, która służy do badania aktywności związków na etapie replikacji, gdyż zawiera subgenomowy RNA wirusa HCV. Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdziły, że oba wyselekcjonowane związki hamują replikację wirusowego RNA nawet przy bardzo niskich stężeniach. Wartość IC_{50} dla związków GP6 i GP7 wynosiły odpowiednio 4.005 μM i 3.741 μM .

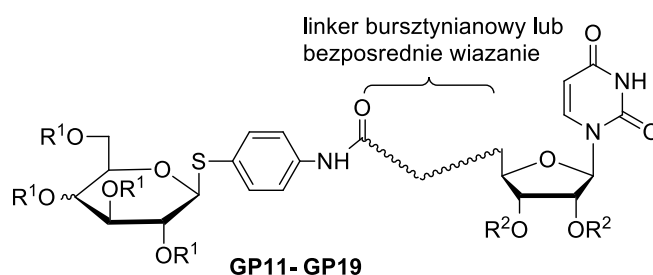
Znaczenie uzyskanych wyników:

Zaprezentowane wyniki po raz pierwszy pokazują, że związki należące do urydynowych glikokoniugatów zawierających w strukturze linkera pierścieni pirydylowy i ugrupowanie amidowe wykazują znaczącą aktywność antywirusową, która prawdopodobnie związana jest z hamowaniem procesu replikacji RNA wirusowego. Wyselekcjonowałam dwa związki o silnych aktywnościach przeciwwirusowych wobec wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa klasycznego pomoru świń. Określiłam, które modyfikacje mają istotny wpływ na aktywność antywirusową związków i powinny być brane pod uwagę przy syntezie nowych, potencjalnie bardziej aktywnych pochodnych. Zaskakujący, ale z drugiej strony niezwykle interesujący jest fakt, iż związki zostały zsyntetyzowane jako potencjalne inhibitory glikozylotransferaz uczestniczących w procesie glikozylacji białek. Wstępna analiza wykorzystująca modelowanie molekularne wykazała, że związki te są zbyt duże, aby mogły wiązać się w miejscu aktywnym tych enzymów. Prawdopodobne jest więc przypuszczenie, że związki te działają na zasadzie inhibitorów niekompetycyjnych. Obecnie kontynuujemy badania w celu potwierdzenia dokładnego mechanizmu działania tych związków.

P.7. Krol, E.*, Pastuch-Gawolek, G., Chaubey, B., Brzuska, G., Erfurt, K., Szewczyk, B. (2018). Novel uridine glycoconjugates, derivatives of 4-aminophenyl 1-thioglycosides, as potential antiviral compounds. *Molecules*, 23(6). pii: E1435.

Cel naukowy pracy:

Ze względu na interesujące wyniki uzyskane dla związków będących pochodnymi (5-amino-2-pirydylo) 1-tioglikozydów i selektywnie zabezpieczonej urydyny kontynuując współpracę z dr hab. inż. Gabriellą Pastuch-Gawolek uzyskałam do badań kolejną grupę związków należących do nowych tioglikozydowych analogów substratów glikozylotransferaz, w których zmodyfikowano strukturę linkera poprzez zastąpienie aromatycznego atomu azotu w pierścieniu pirydylowym atomem węgla (związki GP11-19) (Schemat 6). Za cel naukowy pracy przyjąłm szczegółową charakterystykę aktywności antywirusowej nowych związków wobec wirusa klasycznego pomoru świń oraz wirusa zapalenia wątroby typu C oraz określenie mechanizmu działania aktywnych związków.



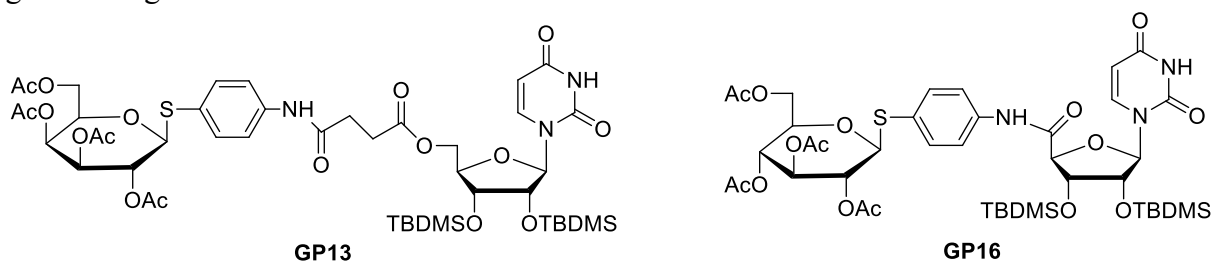
R¹: acetyl lub H, R²: izopropyliden, TBDMS lub H

Schemat 6. Schemat przedstawiający struktury testowanych związków.

Syntetyczny opis uzyskanych wyników:

Po określeniu cytotoksyczności związków przeprowadziłam wstępną analizę aktywności związków wobec wirusa klasycznego pomoru świń przy wykorzystaniu testu redukcji pseudołysinek wirusowych. Uzyskane w ramach przedstawionej pracy wyniki

wskazywały, że dwa z spośród zsyntetyzowanych związków (GP13 i GP16) posiadają znaczącą aktywność anty-CSFV (Schemat 7). Wyniki te zostały potwierdzone z użyciem wirusa HCV przy zastosowaniu infekcyjnego wirusa w systemie HCVcc stosując jako kontrolę Sofosbuvir. Wartości IC_{50} dla wyselekcjonowanych związków wynosiły odpowiednio 4,9 i 13,5 μM . Oba związki charakteryzowały się indeksami selektywności określonymi jako 52,4 i 20. Przeprowadzona analiza strukturalna całej serii związków wykazała, że podstawienie aromatycznego atomu azotu w linkerze przez atom węgla niekorzystnie wpływa na aktywność przeciwwirusową. Związki zawierające węgiel w pierścieniu aromatycznym były mniej aktywne i bardziej toksyczne. Ponadto, linker bursztynianowy wydaje się być w tym przypadku ugrupowaniem wpływającym na aktywność związków. Prawdopodobnie, w przypadku nieobecności aromatycznego atomu azotu w strukturze linkera, to właśnie fragment pochodzący od kwasu bursztynowego jest odpowiedzialny za wzrost aktywności antywirusowej. W przypadku badań aktywności anty-HCV, związek GP13 zawierający linker bursztynianowy był najbardziej aktywny spośród wszystkich dotychczas przetestowanych glikokoniugatów.



Schemat 7. Schemat przedstawiający struktury aktywnych związków.

W dalszej części pracy skupiłam się na analizie mechanizmu działania związków GP13 i GP16, które wykazały znaczącą aktywność antywirusową w badaniach wstępnych. W celu scharakteryzowania mechanizmu wykorzystałam opisaną wcześniej linię stabilną Huh7-J20 i udowodniłam, że tak jak w przypadku poprzedniej serii glikokoniugatów również w przypadku tych związków ich mechanizm antywirusowy prawdopodobnie związany jest z hamowaniem procesu replikacji. Nie obserwowano wpływu związków na wczesne etapy cyklu życiowego wirusa HCV. Zaproponowaną hipotezę badawczą potwierdziłam z wykorzystaniem linii stabilnej Huh7-J17 zawierającej niepełny genom wirusa HCV. Z przeprowadzonej analizy jednoznacznie wynikało, że testowane związki pomimo tego, że były zaprojektowane jako potencjalne inhibitory glikozylotransferaz, to hamują aktywność enzymów uczestniczących w cyklu replikacyjnym wirusa.

Znaczenie uzyskanych wyników:

Uzyskane wyniki potwierdziły, że urydynowe glikokoniugaty zawierające w strukturze linkera fragment amidofenyłowy posiadają znaczącą aktywność antywirusową wobec ludzkiego HCV jak i zwierzęcego CSFV. W ramach przeprowadzonych badań wyselekcjonowałam kolejne dwa związki (GP13 i GP16) o silnych aktywnościach przeciwwirusowych. Modyfikacje wprowadzone do poprzednio wyselekcjonowanych związków pozwoliły na uzyskanie związku, który posiadał zdecydowanie wyższy indeks selektywności. Poprzednio SI dla najbardziej aktywnego związku GP7 wynosił 24,7. Wprowadzone modyfikacje pozwoliły na uzyskanie związku GP13 o SI dwukrotnie wyższym, wynoszącym 52,4. Wartość SI dla Sofosbuviru stosowanego obecnie jako składnik terapii anty-HCV wynosi około 120. Związek GP13 cechował się także ponad 8-krotnie niższą cytotoksycznością niż Sofosbuvir. Analiza strukturalna może zostać wykorzystana do

zaprojektowania nowych, pilnie potrzebnych inhibitorów o wysokiej wartości indeksów selektywności.

Podsumowanie najważniejszych osiągnięć przedstawianego cyklu badań

Do najważniejszych osiągnięć zaprezentowanego cyklu monotematycznego zaliczam:

1. Opracowanie innowacyjnej strategii zwalczania infekcji wirusowych u ludzi opartej na zastosowaniu zsyntetyzowanych chemicznie inhibitorów procesu glikozylacji białek.

W ramach badań wykazałam znaczącą aktywność antywirusową inhibitorów glikozylacji należących do urydynowych pochodnych 2-deoksy cukrów wobec wirusa grypy, wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa kleszczowego zapalenia mózgu. Przeprowadzona analiza struktury i aktywności antywirusowej umożliwiła wytypowanie grup zabezpieczających które istotnie wpływają na aktywność związków. Wyselekcjonowałam związki cechujące się znaczącymi indeksami terapeutycznymi, które mogą mieć potencjalne zastosowanie jako składniki monoterapii lub terapii skojarzonej w przyszłości. Potwierdziłam szerokie spektrum działania związków co wskazuje, że mogą one stanowić skuteczną opcję terapeutyczną również wobec innych wirusów osłonkowych. Badania te mogą być podstawą do rozpoczęcia dalszych badań klinicznych.

2. Opracowanie nowej strategii antywirusowej wobec wirusa zapalenia wątroby typu C przy zastosowaniu glikokoniugatów urydynowych hamujących proces replikacji RNA.

W ramach osiągnięcia habilitacyjnego udało się wyselekcjonować związki należące do glikokoniugatów urydynowych, posiadające inny mechanizm działania niż hamowanie procesu glikozylacji białek. Znacząca aktywność antywirusowa glikokoniugatów urydynowych wobec wirusa zapalenia wątroby typu C związana jest z hamowaniem procesu replikacji RNA wirusowego. Obecnie trwają prace nad potwierdzeniem ich dokładnego mechanizmu przeciwwirusowego. Wyselekcjonowane związki charakteryzowały się dość wysokimi wartościami indeksu terapeutycznego, co wskazuje na ich wysoki potencjał aplikacyjny. Wiedza uzyskana w ramach analizy struktury i aktywności może zostać wykorzystana do zaprojektowania nowych, potencjalnie bardziej aktywnych związków przeciwwirusowych.

3. Wprowadzenie nowej tematyki badawczej oraz nowego warsztatu naukowego do Zakładu Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Prace prowadzone w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych dotyczyły głównie opracowania skutecznych szczepionek rekombinowanych wobec patogenów wirusowych. Jako pierwsza wprowadziłam do Zakładu tematykę badawczą związaną z badaniem aktywności antywirusowej związków. Dzięki nawiązaniu współpracy naukowej z licznymi ośrodkami krajowymi i zagranicznymi wprowadziłam wiele nowych metod badawczych do Zakładu Szczepionek Rekombinowanych. Zoptymalizowany przeze mnie warsztat naukowy otwiera również perspektywy dla nowych badań dotyczących infekcji wywołanych przez badane patogeny wirusowe.

Plany naukowe:

W 2016 roku zostałam laureatką projektu SONATA Narodowego Centrum Nauki uzyskując dofinansowanie na realizację projektu pt. „Wirus kleszczowego zapalenia mózgu - poznanie mechanizmów użytecznych w leczeniu i profilaktyce”. W ramach tego projektu udało się wyselekcjonować związki o silnych właściwościach antywirusowych wobec TBEV, które zostały opisane w osiągnięciu naukowym [P.5]. Ze względu na obiecujące wyniki, kontynuując współpracę z dr hab. Iloną Wandzik oraz dr hab. Gabriellą Pastuch-Gawołek z Politechniki Śląskiej w Gliwicach, planuję badanie aktywności kolejnych związków m.in. glikokoniugatów urydyny zawierających w strukturze linkera pierścieni 1,2,3-triazolowy wobec wirusa TBEV. Ponadto, w ramach tej współpracy planuję złożyć wspólny projekt badawczy w ramach konkursu OPUS NCN na syntezę oraz badanie aktywności nowych, zaprojektowanych i zsyntetyzowanych związków wobec TBEV.

Kontynuując tematykę badań związaną z wirusem kleszczowego zapalenia mózgu nawiązałam także współpracę z prof. Theodore Hupp z Experimental Cancer Research w Edynburgu, który obecnie jest kierownikiem Międzynarodowego Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi które powstało na Uniwersytecie Gdańskim w ramach programu Międzynarodowe Agendy Badawcze. Współpraca ta ma na celu poznanie roli białek transbłonowych indukowanych przez interferon 1, 2 i 3 (ang. interferon-induced transmembrane protein) w przebiegu infekcji wirusa kleszczowego zapalenia mózgu.

Kontynuując moje zainteresowania odnośnie poszukiwania nowych, innowacyjnych metod zapobiegania i zwalczania niebezpiecznych chorób wirusowych, w tym TBEV, a także dysponując warsztatem naukowym związanym z tym wirusem pod koniec 2019 roku planuję złożyć do Narodowego Centrum Nauki kolejny projekt związany z wirusem TBEV w ramach konkursu DAINA na polsko-litewskie projekty badawcze. Z uwagi na fakt, iż inną możliwą drogą zakażenia TBEV u ludzi jest spożycie niepasteryzowanego mleka lub produktów mlecznych od zainfekowanych kóz, owiec i krów celem projektu będzie próba opracowania potencjalnej szczepionki dla zwierząt opartej na cząstkach wirusopodobnych TBEV. W ramach tej inicjatywy rozpocząłam współpracę z grupą badawczą Prof. Arunasa Stankeviciusa z Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Litwa. W projekcie będzie uczestniczyć również grupa badawcza Dr Daniela Ružek z Veterinary Research Institute, Brno, Czechy.

Od 2017 roku realizuję także projekt w ramach projektu LIDER Narodowego Centrum Badań i Rozwoju zatytułowany „Szczepionka przeciwko wirusowi Zika – innowacyjne otrzymywanie antygenów podjednostkowych”. Badania realizowane w tym projekcie mają na celu opracowanie potencjalnej szczepionki przeciwko wirusowi Zika opartej na cząstkach wirusopodobnych. Ze względu na wprowadzony do laboratorium warsztat badawczy w ramach realizacji tego grantu, pragnę kontynuować tematykę badawczą związaną z wirusem Zika. Z ostatnich doniesień literaturowych wynika, że w przypadku infekcji wirusem Zika, wcześniejsza infekcja innym flawiwirusem, w szczególności wirusem Dengue, może powodować wzmocnienie infekcji, co związane jest z obecnością w organizmie przeciwciał krzyżowo-reaktywnych, które skierowane są przeciwko wysoce konserwowanej pętli fuzyjnej w flawiwirusowym białku osłonki – E. W związku z tym konieczne jest wyprodukowanie cząstek wirusopodobnych ze zmodyfikowanymi właściwościami antygenowymi, co prawdopodobnie może ograniczać produkcję przeciwciał krzyżowo-reaktywnych. W ramach realizacji tego zagadnienia podjęłam współpracę z Dr Simone Fonseca z Laboratory of Immunoregulation, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goias, Goiania-Goias-Brazil, Brazylia jak i z Dr Daniel Ružek z Veterinary Research Institute, Brno, Czechy. Projekt w ramach konkursu Sonata Bis Narodowego Centrum Nauki pt: „Poznanie mechanizmu wzmocnienia infekcji wirusowej zależnej od przeciwciał (ADE) u

pokrewnych, silnie patogennych flawiwirusów w celu opracowania nowych metod diagnostyki i prewencji” jest już przygotowany i zostanie złożony w połowie 2019 roku.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

(Szczegółowy wykaz wszystkich moich publikacji (IF, Punkty MNiSW, cytowania), znajduje się w Załączniku 4 razem z opisem moich innych osiągnięć)

Osiągnięcia naukowo-badawcze przed uzyskaniem stopnia doktora.

Moja praca naukowo-badawcza rozpoczęła się, kiedy po ukończeniu z wyróżnieniem klasy uniwersyteckiej o profilu biologiczno-chemicznym w I Akademickim Liceum Ogólnokształcącym w Gdyni uzyskałam indeks uprawniający do rozpoczęcia studiów magisterskich na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii UG i GUMed bez egzaminów wstępnych. Będąc na drugim roku studiów dołączyłam do grupy Prof. dr hab. Bogusława Szewczyka w Katedrze Wirusologii Molekularnej. Rozpoczęłam wtedy zajęcia indywidualne w pracowni wirusologicznej zajmując się klonowaniem genów wirusa zapalenia wątroby typu C do wirusa owadziego Baculovirus AcNPV jako uczestnik projektu „Structural and functional studies of hepatitis C virus glycoproteins: identification of targets for antiviral therapy; European Network for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein Research (ENHCV)” w ramach 5 Programu Ramowego Unii Europejskiej. Tematyka związana z białkami strukturalnymi wirusa zapalenia wątroby typu C była również podstawą mojej pracy magisterskiej. Moja praca magisterska została wysoko oceniona i uzyskała nagrodę na konferencji 12th International Students’ Scientific Conference for Students and Young Doctors. Ponadto była cennym materiałem do dalszych badań nad glikoproteinami E2 i E1 wirusa zapalenia wątroby typu C.

Po ukończeniu pracy magisterskiej w 2004 rozpoczęłam realizację kolejnego projektu naukowego w ramach Studium Doktoranckiego na Wydziale Chemii Uniwersytetu Gdańskiego. Praca doktorska wykonywana była pod opieką Prof. dr hab. Bogusława Szewczyka. Badania przeprowadzone były w ramach realizacji grantu badawczego KBN 2 P04B 012 26 (2004-2007) finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego, który realizowany był we współpracy z Prof. dr hab. Grzegorzem Gryniewiczem z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie oraz Prof. dr hab. Wiesławem Szeją z Politechniki Śląskiej w Gliwicach. W ramach pracy doktorskiej koncentrowałam się na poszukiwaniu związków o potencjalnej aktywności antywirusowej wobec wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV), który przez wiele lat stanowił model zastępczy do badań nad wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), ze względu na brak modelu do namnażania wirusa HCV w hodowli komórkowej *in vitro*. Badania te stanowiły podstawę mojej pracy doktorskiej, którą obroniłam w grudniu 2011 roku z wyróżnieniem. Najważniejszym osiągnięciem pracy doktorskiej była charakterystyka mechanizmu działania różnych zaprojektowanych i zsyntetyzowanych w Polsce analogów i mimetyków tunikamycyny (inhibitora *N*-glikozylacji białek) w stosunku do dwóch ważnych i groźnych patogenów wirusowych z rodziny *Flaviviridae*; wirusa zapalenia wątroby typu C oraz wirusa klasycznego pomoru świń. Warte podkreślenia jest to, iż eksperymenty z użyciem systemu infekcyjnego wirusa HCV były pionierskimi badaniami w kraju. Zaprojektowane i przetestowane w ramach pracy doktorskiej związki były podstawą dwóch patentów złożonych do Urzędu Patentowego RP (PL211936-B1 oraz PL212067-B1), których jestem współautorem. Ponadto, uzyskane wyniki zostały opublikowane w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym (Krol et al., 2010; Reszka et al., 2010) oraz prezentowane na kilkunastu konferencjach zagranicznych i krajowych, na

które bardzo często uzyskiwałam dofinansowanie od organizatorów. Za pracę doktorską zostałam uhonorowana w 2012 roku nagrodą Gdańskiego Towarzystwa Naukowego i Prezydenta Miasta Gdańska. Po wstąpieniu w 2012 roku do Gdańskiego Towarzystwa Naukowego w 2015 roku zostałam także członkiem Klubu Młodych Naukowców działającego w ramach GTN, w którym do dnia dzisiejszego pełnię rolę Vice-przewodniczącego. Celem działalności Klubu jest m.in. integracja i organizowanie współpracy młodych naukowców gdańskich uczelni. Przy wsparciu Władz GTN opracowano projekt „Gdańska Młoda Nauka” i obecnie w fazie przygotowania jest platforma internetowa mająca na celu zintegrowanie środowiska młodych naukowców.

Osiągnięcia naukowo-badawcze po uzyskaniu stopnia doktora.

Niezależnie od projektu pracy doktorskiej byłam zaangażowana w inne prace badawcze Zespołu, które miały na celu opracowanie jak i przygotowanie do wdrożenia szczepionek przeciwko różnym ważnym patogenom wirusowym. M.in. byłam wykonawcą projektu w projekcie finansowanym w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka Priorytet 1 - POIG.01.01.02-14-007/08-00, „INNOWACYJNA GOSPODARKA”, „Centrum Biotechnologii produktów leczniczych. Pakiet innowacyjnych biofarmaceutyków dla terapii i profilaktyki ludzi i zwierząt” realizowanym w latach 2008-2015 przy współpracy z Instytutem Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Instytutem Biotechnologii i Antybiotyków, Instytutem Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności Polskiej Akademii Nauk jak i Zakładem Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego z Puław. Celem tego projektu było opracowanie skutecznej szczepionki DNA przeciwko grypie ptasiej, która jest poważnym problemem w przemyśle drobiarskim, gdyż powodując dużą śmiertelność wśród drobiu, powoduje ogromne straty ekonomiczne. Wysoka skuteczność *in vivo* opracowanej szczepionki daje nadzieję na jej komercyjne zastosowanie w niedalekiej przyszłości (Stachyra et al., 2014, Szewczyk et al., 2014).

Pragnąc kontynuować niezwykle interesującą tematykę rozpoczętą w ramach pracy doktorskiej, ale jednocześnie połączyć doświadczenie uzyskane w ramach uczestnictwa w projekcie POIG związanego z wirusem grypy złożyłam w 2010 roku do Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego projekt w ramach projektu Iuventus Plus. W 2011 zostałam laureatką tego konkursu uzyskując jako kierownik projektu fundusze na własne badania. Już po obronie pracy doktorskiej w 2012 roku zostałam laureatką drugiej edycji programu MNiSW uzyskując finansowanie dalszej części projektu. Prace opublikowane w ramach tych dwóch grantów są podstawą mojego osiągnięcia naukowego opisanego powyżej, jednak warsztat wprowadzony przeze mnie do laboratorium Zakładu Szczepionek Rekombinowanych m.in. opracowanie metody hodowli wirusa grypy w kulturach *in vitro* pozwolił mi uczestniczyć w innym projektach badawczych. W badaniach nad poszukiwaniem nowych związków, które mogłyby udoskonalic strategie terapeutyczne wobec wirusa grypy kontynuowałam współpracę naukową z Prof. Gryniewiczem z Instytutu Farmaceutycznego w Warszawie. Celem tej współpracy było poszukiwanie bardziej skutecznych pochodnych leków przeciwwirusowych stosowanych obecnie w terapii infekcji wirusem grypy; głównie inhibitora neuraminidazy (oseltamiwiru) (Adamska et al., 2012). Ponadto, namnożyłam wirusy wykorzystywane do analizy skuteczności uniwersalnego immunosensora do wykrywania wirusa grypy w wymazach z ludzkiego gardła, który wykonywany był w ramach projektu VENTURES finansowanego przez Fundację na rzecz Nauki Polskiej kierowanego przez dr Dawida Nidzworskiego. Efekty tej współpracy zawarte są w publikacji Nidzworski et al., 2014 opublikowanej w prestiżowym czasopiśmie Biosensors and Bioelectronics.

Opublikowane prace stanowiące moje osiągnięcie naukowe jak również te przedstawione powyżej zostały wyróżnione w 2015 roku nagrodą zespołową Rektora Uniwersytetu Gdańskiego.

W 2012 roku mój kolejny projekt został zakwalifikowany do finansowania w ramach konkursu PRELUDIUM 2 Narodowego Centrum Nauki. Głównym celem projektu było poszukiwanie nowych związków o silnych aktywnościach antywirusowych wobec wirusa zapalenia wątroby typu C przy użyciu wszystkich dostępnych obecnie systemów eksperymentalnych służących do badania cyklu życiowego wirusa HCV *in vitro*, co złożyło się na moje osiągnięcie naukowe. W tym celu nawiązałam współpracę naukową z Prof. Arvindem Patel z University of Glasgow Centre for Virus Research ze Szkocji. Efektem realizacji tego grantu były oprócz publikacji naukowych stanowiących osiągnięcie naukowe dwie inne prace, w których jestem autorem: praca eksperymentalna (Krol et. al., 2014) oraz praca przeglądowa (Chmielewska et al., 2015).

Warto nadmienić, że opublikowane prace stanowiące osiągnięcie naukowe oraz wymienione dodatkowe prace związane z wirusem grypy oraz wirusem zapalenia wątroby typu C zostały również wyróżnione w latach 2013 i 2018 nagrodami indywidualnymi Rektora Uniwersytetu Gdańskiego oraz w 2013 rocznym Stypendium Naukowym dla Młodych Doktorów Uniwersytetu Gdańskiego.

Ze względu na to, iż projekty badawcze realizowane przeze mnie są projektami aplikacyjnymi o dużym potencjale komercyjnym w 2012 zostałam laureatką prestiżowego programu szkoleniowego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego „TOP500 Innovators: Science-Management-Commercialization”, w ramach którego odbyłam ponad 2 miesięczny staż na Stanford University w Dolinie Krzemowej w USA, gdzie szkoliłam się z zakresu współpracy nauki z biznesem, zarządzania badaniami naukowymi oraz komercjalizacji wyników badań naukowych. Miałam także możliwość poznania tematyki badań realizowanej na tym jednym z najlepszych uniwersytetów na świecie. Odbywałam tam praktyki w laboratoriach naukowych. Od 2013 roku jestem także członkiem Stowarzyszenia TOP500 Innovators, które zostało powołane z inicjatywy Absolwentów Programu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Top 500 Innovators: Science - Management – Commercialization w celu stworzenia interdyscyplinarnej platformy współpracy pomiędzy przedstawicielami środowisk naukowych i przedstawicielami centrów transferu technologii w Polsce, wykorzystując doświadczenie zdobyte na najlepszych uczelniach na świecie, m.in. w Stanford University czy University of California, Berkeley.

Kontynuując tematykę badań aktywności antywirusowej związków nawiązałam współpracę naukową z dr Danielem Růžek z Veterinary Research Institute z Czech. Ta współpraca przyczyniła się do aplikowania o kolejny grant Narodowego Centrum Nauki w ramach konkursu Sonata. W 2016 roku uzyskałam jako kierownik finansowanie na realizację projektu związanego z poszukiwaniem nowych metod leczenia i zapobiegania zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu. W 2016 roku odbyłam staż naukowy w laboratorium dr Růžek, gdzie poznałam techniki pracy z wirusem kleszczowego zapalenia mózgu, który należy do patogenów III klasy bezpieczeństwa biologicznego. Efektem tej współpracy jest jedna opublikowana praca wchodząca w skład osiągnięcia naukowego oraz planowane są dwa kolejne manuskrypty.

W latach 2012-2016 brałam również udział w realizacji dwóch projektów badawczych finansowanych w ramach Programu Badań Stosowanych Narodowego Centrum Badań i

Rozwoju, projektu PBS1/B8/2/2012 zatytułowanego „Opracowanie i wdrożenie technologii produkcji szczepionki wektorowej przeciwko chorobie Newcastle u kur” oraz projektu PBS2/A7/14/2014, którego celem było innowacyjne otrzymanie antygenów podjednostkowych jako bezpiecznych szczepionek przeciwko grypie. Wykorzystując cenne doświadczenie zdobyte podczas realizacji tych grantów kontynuowałam tematykę badań naukowych związaną z opracowaniem innowacyjnych metod zapobiegania infekcjom wirusowym w ramach uzyskanego w 2016 grantu LIDER VII Narodowego Centrum Badań i Rozwoju. Projekt ma na celu opracowanie potencjalnej szczepionki przeciwko wirusowi Zika opartej na cząstkach wirusopodobnych. O ważności tematyki badań związanej z próbą opracowania szczepionek opartych na cząstkach wirusopodobnych przeciwko patogenom wirusowym przenoszonym przez komary m.in. wirusowi Zika świadczy opublikowanie przeze mnie publikacji przeglądowej w prestiżowym czasopiśmie Trends in Biotechnology (IF 13,578) (Krol et al., 2019). Ze względu na uzyskanie bardzo zadawalających wyników *in vivo* na modelu mysim z użyciem opracowanej przez nas szczepionki, proponowane rozwiązanie zostanie w najbliższym czasie zgłoszone celem ochrony do Urzędu Patentowego RP, a następnie przygotowane zostanie zgłoszenie patentowe w procedurze PCT. Ponadto, dwie prace opisujące uzyskane wyniki są w przygotowaniu i zostaną wysłane do recenzji.

Dorobek naukowy – podsumowanie:

- **Łączna liczba publikacji: 19** (przed doktoratem 4, po doktoracie 15; w tym pierwszy autor w 9 artykułach, autor korespondencyjny w 9 artykułach)
- **Cykl habilitacyjny to 7 publikacji** (w tym pierwszy autor w 6 pracach, autor korespondencyjny w 7 pracach) o IF = **22,384**; IF_{5-letni} = **23,935**; MNiSW = **210**
- **Łączna liczba prac z wyłączeniem cyklu habilitacyjnego: 12** (w tym pierwszy autor w 3 pracach, autor korespondencyjny w 2 pracach) IF = **35,291**; IF_{5-letni} = **38,617**; MNiSW = **255**
 - przed doktoratem: 4 publikacje o IF = 5,673; IF_{5-letni} = 5,726; MNiSW = 50
 - po doktoracie: 8 publikacji o IF = 29,618; IF_{5-letni} = 32,891; MNiSW = 205
- **Sumaryczny współczynnik oddziaływania czasopism**, zgodnie z rokiem opublikowania: IF= **57,675**; IF_{5-letni} = **62,552** (prace przed doktoratem: IF = 5,673; prace po doktoracie: IF = 52,002).
- **Sumaryczna liczba punktów MNiSW: 465** (prace przed doktoratem: MNiSW = 50; prace po doktoracie: MNiSW = 415).
- **Liczba cytowań wg bazy Web of Science: 130; wg Google Scholar: 249**
- **Indeks Hirscha wg bazy Web of Science: 6; wg Google Scholar: 7**
- **Łączna liczba streszczeń zjazdowych: 30** (17 przed uzyskaniem stopnia doktora, 13 po uzyskaniu stopnia doktora), 21 na konferencjach zagranicznych, 9 na konferencjach krajowych).
- **Liczba udzielonych patentów: 2**

Równoległe z działalnością naukową prowadzę również działalność dydaktyczną, komplementarną z moim profilem badawczym. Prowadzę zajęcia w formie wykładów i ćwiczeń laboratoryjnych dla studentów Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i

GUMed (szczegółowa lista w **załączniku nr 4**). Jestem obecnie promotorem 4 prac magisterskich, 2 projektów badawczych (licencjackich) oraz promotorem pomocniczym w 2 przewodach doktorskich (**załącznik nr 4**). Angażuję się także w działania promujące Wydział i wspierające jego rozwój. Jestem Przewodniczącą Zespołu ds. organizacji imprez promocyjnych i edukacyjnych na Wydziale Biotechnologii. Jestem także członkiem Senatu Uniwersytetu Gdańskiego oraz Rady Wydziału Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii UG i GUMed.

Literatura:

1. Angus, A.G.N., Loquet, A., Stack, S.J., Dalrymple, D., Gatherer, D., Penin, F., and Patel, A.H. (2012). Conserved Glycine 33 Residue in Flexible Domain I of Hepatitis C Virus Core Protein Is Critical for Virus Infectivity. *J Virol* 86, 679–690.
2. Artois, M., Depner, K.R., Guberti, V., Hars, J., Rossi, S., and Rutili, D. (2002). Classical swine fever (hog cholera) in wild boar in Europe. *Rev. - Off. Int. Epizoot.* 21, 287–303.
3. Barth, H. (2015). Hepatitis C virus: Is it time to say goodbye yet? Perspectives and challenges for the next decade. *World J Hepatol* 7, 725–737.
4. Bartosch, B., Dubuisson, J., and Cosset, F.-L. (2003). Infectious Hepatitis C Virus Pseudoparticles Containing Functional E1–E2 Envelope Protein Complexes. *J Exp Med* 197, 633–642.
5. Bourke, C.A., and Carrigan, M.J. (1993). Experimental tunicamycin toxicity in cattle, sheep and pigs. *Aust. Vet. J.* 70, 188–189.
6. Breton, C., Snajdrová, L., Jeanneau, C., Koca, J., and Imberty, A. (2006). Structures and mechanisms of glycosyltransferases. *Glycobiology* 16, 29R–37R.
7. Breton, C., Fournel-Gigleux, S., and Palcic, M.M. (2012). Recent structures, evolution and mechanisms of glycosyltransferases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 22, 540–549.
8. Brodsky, J.L., and McCracken, A.A. (1999). ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10, 507–513.
9. Chapel, C., Garcia, C., Roingeard, P., Zitzmann, N., Dubuisson, J., Dwek, R.A., Trépo, C., Zoulim, F., and Durantel, D. (2006). Antiviral effect of alpha-glucosidase inhibitors on viral morphogenesis and binding properties of hepatitis C virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 87, 861–871.
10. Chapel, C., Garcia, C., Bartosch, B., Roingeard, P., Zitzmann, N., Cosset, F.-L., Dubuisson, J., Dwek, R.A., Trépo, C., Zoulim, F., et al. (2007). Reduction of the infectivity of hepatitis C virus pseudoparticles by incorporation of misfolded glycoproteins induced by glucosidase inhibitors. *Journal of General Virology* 88, 1133–1143.
11. Compain, P., and Martin, O.R. (2001). Carbohydrate mimetics-based glycosyltransferase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 3077–3092.
12. Donoso Mantke, O., Escadafal, C., Niedrig, M., Pfeffer, M., and Working Group For Tick-Borne Encephalitis Virus, C. (2011). Tick-borne encephalitis in Europe, 2007 to 2009. *Euro Surveill.* 16.
13. Duksin, D., and Mahoney, W.C. (1982). Relationship of the structure and biological activity of the natural homologues of tunicamycin. *J. Biol. Chem.* 257, 3105–3109.
14. Dumpis, U., Crook, D., and Oksi, J. (1999). Tick-borne encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 28, 882–890.
15. Edwards, S., Fukusho, A., Lefèvre, P.C., Lipowski, A., Pejsak, Z., Roehle, P., and Westergaard, J. (2000). Classical swine fever: the global situation. *Vet. Microbiol.* 73, 103–119.
16. Elbein, A.D. (1987). Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosaccharide chains. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 497–534.
17. Elbein, A.D., Legler, G., Tlustý, A., McDowell, W., and Schwarz, R. (1984). The effect of

- deoxymannojirimycin on the processing of the influenza viral glycoproteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 235, 579–588.
18. Fiore, A.E., Shay, D.K., Broder, K., Iskander, J.K., Uyeki, T.M., Mootrey, G., Bresee, J.S., Cox, N.S., Centers for Disease Control and Prevention (CDC), and Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) (2008). Prevention and control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2008. *MMWR Recomm Rep* 57, 1–60.
 19. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Gonçalves, F.L., Häussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., et al. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 347, 975–982.
 20. Gastaminza, P., Cheng, G., Wieland, S., Zhong, J., Liao, W., and Chisari, F.V. (2008). Cellular Determinants of Hepatitis C Virus Assembly, Maturation, Degradation, and Secretion. *J Virol* 82, 2120–2129.
 21. Gloster, T.M. (2012). Development of inhibitors as research tools for carbohydrate-processing enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* 40, 913–928.
 22. Gubareva, L.V. (2004). Molecular mechanisms of influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Virus Res.* 103, 199–203.
 23. Hayden, F.G. (1997). Antivirals for pandemic influenza. *J. Infect. Dis.* 176 *Suppl 1*, S56–61.
 24. Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G., and Dubuisson, J. (2010). Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Incorporated into Infectious Virions. *J Virol* 84, 11905–11915.
 25. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., and McKeating, J.A. (2003). Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7271–7276.
 26. Huang, H., Sun, F., Owen, D.M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., and Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5848–5853.
 27. Hurt, A.C., Deng, Y.M., Ernest, J., Caldwell, N., Leang, L., Iannello, P., Komadina, N., Shaw, R., Smith, D., Dwyer, D.E., et al. (2011). Oseltamivir-resistant influenza viruses circulating during the first year of the influenza A(H1N1) 2009 pandemic in the Asia-Pacific region, March 2009 to March 2010. *Euro Surveill.* 16.
 28. Inkster, M.D., Hinshaw, V.S., and Schulze, I.T. (1993). The hemagglutinins of duck and human H1 influenza viruses differ in sequence conservation and in glycosylation. *J. Virol.* 67, 7436–7443.
 29. Iro, M., Witteveldt, J., Angus, A.G.N., Woerz, I., Kaul, A., Bartenschlager, R., and Patel, A.H. (2009). A reporter cell line for rapid and sensitive evaluation of hepatitis C virus infectivity and replication. *Antiviral Research* 83, 148–155.
 30. Kajimoto, T., and Node, M. (2009). Synthesis of Glycosyltransferase Inhibitors. *Synthesis* 2009, 3179–3210.
 31. Kikuchi, N., and Narimatsu, H. (2006). Bioinformatics for comprehensive finding and analysis of glycosyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1760, 578–583.
 32. Kohsaka, S., Mita, K., Matsuyama, M., Mizuno, M., and Tsukada, Y. (1985). Impaired development of rat cerebellum induced by neonatal injection of the glycoprotein synthesis inhibitor, tunicamycin. *J. Neurochem.* 44, 406–410.
 33. Krol, E., Wandzik, I., Szeja, W., Gryniewicz, G., and Szewczyk, B. (2010). In vitro antiviral activity of some uridine derivatives of 2-deoxy sugars against classical swine fever virus. *Antiviral Research* 86, 154–162.
 34. Laddomada, A. (2000). Incidence and control of CSF in wild boar in Europe. *Vet.*

Microbiol. 73, 121–130.

35. Lam, A.M., Espiritu, C., Bansal, S., Micolochick Steuer, H.M., Niu, C., Zennou, V., Keilman, M., Zhu, Y., Lan, S., Otto, M.J., et al. (2012). Genotype and Subtype Profiling of PSI-7977 as a Nucleotide Inhibitor of Hepatitis C Virus. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 3359–3368.

36. Laude, H. (1987). Hog cholera virus: art and facts. *Ann. Rech. Vet.* 18, 127–138.

Lavanchy, D. (2011). Evolving epidemiology of hepatitis C virus. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 107–115.

37. Lavie, M., Goffard, A., and Dubuisson, J. (2006). HCV Glycoproteins: Assembly of a Functional E1–E2 Heterodimer. In *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*, S.-L. Tan, ed. (Norfolk (UK): Horizon Bioscience), p.

38. Lehle, L., and Tanner, W. (1976). The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Lett.* 72, 167–170.

39. Li, K.S., Guan, Y., Wang, J., Smith, G.J.D., Xu, K.M., Duan, L., Rahardjo, A.P., Puthavathana, P., Buranathai, C., Nguyen, T.D., et al. (2004). Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature* 430, 209–213.

40. Lindenbach, B.D., and Rice, C.M. (2013). The ins and outs of hepatitis C virus entry and assembly. *Nat Rev Microbiol* 11, 688–700.

41. Lindenbach, B.D., Evans, M.J., Syder, A.J., Wölk, B., Tellinghuisen, T.L., Liu, C.C., Maruyama, T., Hynes, R.O., Burton, D.R., McKeating, J.A., et al. (2005). Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture. *Science* 309, 623–626.

42. Matrosovich, M., Zhou, N., Kawaoka, Y., and Webster, R. (1999). The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J. Virol.* 73, 1146–1155.

43. Memoli, M.J., Davis, A.S., Proudfoot, K., Chertow, D.S., Hrabal, R.J., Bristol, T., and Taubenberger, J.K. (2011). Multidrug-resistant 2009 pandemic influenza A(H1N1) viruses maintain fitness and transmissibility in ferrets. *J. Infect. Dis.* 203, 348–357.

44. von Messling, V., and Cattaneo, R. (2003). N-linked glycans with similar location in the fusion protein head modulate paramyxovirus fusion. *J. Virol.* 77, 10202–10212.

45. Meunier, J.C., Fournillier, A., Choukhi, A., Cahour, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J., and Wychowski, C. (1999). Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *Journal of General Virology* 80, 887–896.

46. Meyer, W.J., Wood, J.M., Major, D., Robertson, J.S., Webster, R.G., and Katz, J.M. (1993). Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* 196, 130–137.

47. Monto, A.S., Fleming, D.M., Henry, D., de Groot, R., Makela, M., Klein, T., Elliott, M., Keene, O.N., and Man, C.Y. (1999). Efficacy and safety of the neuraminidase inhibitor zanamivir in the treatment of influenza A and B virus infections. *J. Infect. Dis.* 180, 254–261.

Nakamura, K., and Compans, R.W. (1978). Effects of glucosamine, 2-deoxyglucose, and tunicamycin on glycosylation, sulfation, and assembly of influenza viral proteins. *Virology* 84, 303–319.

48. Nichol, K.L., and Treanor, J.J. (2006). Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *J. Infect. Dis.* 194 Suppl 2, S111–118.

49. Nicholson, K.G., Aoki, F.Y., Osterhaus, A.D., Trottier, S., Carewicz, O., Mercier, C.H., Rode, A., Kinnersley, N., and Ward, P. (2000). Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet* 355, 1845–1850.

50. Pan, Y.T., Hori, H., and Elbein, A.D. (1987). The effect of glycoprotein-processing inhibitors on the secretion of glycoproteins by Madin-Darby canine kidney cells. *Biochem. Cell*

Biol. 65, 345–353.

51. Parodi, A.J. (2000). Protein glycosylation and its role in protein folding. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 69–93.
52. Pawlotsky, J.-M. (2013). Chapter Five - Hepatitis C Virus: Standard-of-Care Treatment. In *Advances in Pharmacology*, E. De Clercq, ed. (Academic Press), pp. 169–215.
53. Pizer, L.I., Cohen, G.H., and Eisenberg, R.J. (1980). Effect of tunicamycin on herpes simplex virus glycoproteins and infectious virus production. *J. Virol.* 34, 142–153.
54. Rey, F.A., Heinz, F.X., Mandl, C., Kunz, C., and Harrison, S.C. (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291–298.
55. Roberts, N.A. (2001). Treatment of influenza with neuraminidase inhibitors: virological implications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 356, 1895–1897.
56. Rosenthal, E.S., and Graham, C.S. (2016). Price and affordability of direct-acting antiviral regimens for hepatitis C virus in the United States. *Infect Agent Cancer* 11.
57. Russell, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al. (2008). Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D31–34.
58. Ruzek, D., Županc, T.A., Borde, J., Chrdle, A., Eyer, L., Karganova, G., Kholodilov, I., Knap, N., Kozlovskaya, L., Matveev, A., et al. (2019). Tick-borne encephalitis in Europe and Russia: Review of pathogenesis, clinical features, therapy, and vaccines. *Antiviral Res.*
59. Saito, T., and Yamaguchi, I. (2000). Effect of glycosylation and glucose trimming inhibitors on the influenza A virus glycoproteins. *J. Vet. Med. Sci.* 62, 575–581.
60. Sandrin, V., Boulanger, P., Penin, F., Granier, C., Cosset, F.-L., and Bartosch, B. (2005). Assembly of functional hepatitis C virus glycoproteins on infectious pseudoparticles occurs intracellularly and requires concomitant incorporation of E1 and E2 glycoproteins. *Journal of General Virology* 86, 3189–3199.
61. Schröder, M. (2008). Endoplasmic reticulum stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 862–894.
62. Schulze, I.T. (1997). Effects of glycosylation on the properties and functions of influenza virus hemagglutinin. *J. Infect. Dis.* 176 Suppl 1, S24–28.
63. Schwarz, R.T., Rohrschneider, J.M., and Schmidt, M.F. (1976). Suppression of glycoprotein formation of Semliki Forest, influenza, and avian sarcoma virus by tunicamycin. *J. Virol.* 19, 782–791.
64. Shi, X., and Elliott, R.M. (2004). Analysis of N-linked glycosylation of hantaan virus glycoproteins and the role of oligosaccharide side chains in protein folding and intracellular trafficking. *J. Virol.* 78, 5414–5422.
65. Silber, L.A., and Soloviev, V.D. (1946). Far Eastern tick-borne spring-summer (spring) encephalitis. *Am Rev Sov Med* 1–80.
66. Sofia, M.J., Bao, D., Chang, W., Du, J., Nagarathnam, D., Rachakonda, S., Reddy, P.G., Ross, B.S., Wang, P., Zhang, H.-R., et al. (2010). Discovery of a β-d-2'-Deoxy-2'-α-fluoro-2'-β-C-methyluridine Nucleotide Prodrug (PSI-7977) for the Treatment of Hepatitis C Virus. *J. Med. Chem.* 53, 7202–7218.
67. Steffen, R. (2016). Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in international travellers to Western/Central Europe and conclusions on vaccination recommendations. *J Travel Med* 23.
68. Tkacz, J.S., and Lampen, O. (1975). Tunicamycin inhibition of polyisoprenyl N-acetylglucosaminyl pyrophosphate formation in calf-liver microsomes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 248–257.
69. Tree, J.A., Richardson, C., Fooks, A.R., Clegg, J.C., and Looby, D. (2001). Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine* 19, 3444–3450.

70. Trombetta, E.S., and Parodi, A.J. (2003). Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19, 649–676.
71. Unligil, U.M., and Rini, J.M. (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10, 510–517.
72. Vieyres, G., Thomas, X., Descamps, V., Duverlie, G., Patel, A.H., and Dubuisson, J. (2010). Characterization of the Envelope Glycoproteins Associated with Infectious Hepatitis C Virus. *J Virol* 84, 10159–10168.
73. Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S., and Klenk, H.D. (2000). Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J. Virol.* 74, 6316–6323.
74. Wagner, R., Heuer, D., Wolff, T., Herwig, A., and Klenk, H.-D. (2002). N-Glycans attached to the stem domain of haemagglutinin efficiently regulate influenza A virus replication. *J. Gen. Virol.* 83, 601–609.
75. Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, M., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.-G., Mizokami, M., et al. (2005). Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* 11, 791–796.
76. Wang, X., Zhang, L.-H., and Ye, X.-S. (2003). Recent development in the design of sialyltransferase inhibitors. *Med Res Rev* 23, 32–47.
77. Ward, C.W., Murray, J.M., Roxburgh, C.M., and Jackson, D.C. (1983). Chemical and antigenic characterization of the carbohydrate side chains of an Asian (N2) influenza virus neuraminidases. *Virology* 126, 370–375.
78. Yoshii, K., Yanagihara, N., Ishizuka, M., Sakai, M., and Kariwa, H. (2013). N-linked glycan in tick-borne encephalitis virus envelope protein affects viral secretion in mammalian cells, but not in tick cells. *J. Gen. Virol.* 94, 2249–2258.
79. Zou, W. (2005). C-glycosides and aza-C-glycosides as potential glycosidase and glycosyltransferase inhibitors. *Curr Top Med Chem* 5, 1363–1391.

Król Ewelina