

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244794 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438966**

(22) Data zgłoszenia: **2021.09.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.03.20 BUP 12/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.03.04 WUP 10/2024**

(51) MKP:

A61K 39/12 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

A61P 31/14 (2006.01)

- (73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET GDAŃSKI, Gdańsk, PL
- (72) Twórca(-y) wynalazku:
EWELINA KRÓL, Gdynia, PL
BOGUSŁAW SZEWCZYK, Gdańsk, PL
MARTA ZIMNA, Gdańsk, PL
GABRIELA BRZUSKA, Pomorsko, PL
SARA BOCH-KMINIKOWSKA, Gdańsk, PL
- (74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Justyna Pawłowska-Bajerska,
Gdańsk, PL

(54) Tytuł:

**Rekombinowana cząstka wirusopodobna kleszczowego zapalenia mózgu
oraz jej zastosowanie medyczne**

PL 244794 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy dziedziny szczepionek opartych na antygenach immunogennych wykorzystywanych do prewencji zakażeń wirusem kleszczowego zapalenia mózgu (ang. tick-borne encephalitis virus, TBEV). Wynalazek dotyczy rekombinowanej cząstki wirusopodobnej (ang. virus-like particles, VLPs) zawierającej m.in. dwa wybrane fragmenty białek wirusa TBEV oraz inne wstawione sekwencje. W sekwencji zastosowano wśród białek naturalnych wirusa TBEV – białko strukturalne E oraz białko strukturalne prM. Wynalazek w postaci rekombinowanych cząstek wirusopodobnych ma zastosowanie lecznicze do zapobiegania zakażeniom wirusem TBEV jako składnik immunogeny do otrzymywania szczepionek. Przedmiotem wynalazku jest również zastosowanie medyczne zwłaszcza jako immunogenna szczepionka przeciwko wirusowi TBEV oparta na VLPs o sekwencji aminokwasowej wg wynalazku.

Do wirusów należących do rodzaju *Flavivirus* rodziny *Flaviviridae* zalicza się dużą liczbę patogenów ludzkich, jak również patogenów zwierzęcych. Większość z nich jest przenoszona za pomocą wektorów owadzych takich jak kleszcze np. wirus kleszczowego zapalenia mózgu oraz komary np. wirus Zika czy wirus Dengue.

Wirus TBEV jest patogenem, który wywołuje zakaźną chorobę o nazwie kleszczowe zapalenie mózgu (KZM). Główną drogą transmisji na ludzi i zwierzęta jest ukąszenie przez zakażonego kleszcza, głównie z gatunków *Ixodes ricinus*, bądź *Ixodes persulcatus*. Dodatkową drogą zakażenia dla ludzi jest spożycie niepasteryzowanych produktów mlecznych, pochodzących od zakażonych zwierząt. Uważa się, że nawet 20% zakażeń może następować właśnie w ten sposób. Wyróżnia się trzy podtypy wirusa TBEV: Europejski (TBEV-Eu), Syberyjski (TBEV-Sib) oraz dalekowschodni (TBEV-FE) (Ruzek i wsp. (1999), *Antiviral Res.*, 164:23–51).

Czas inkubacji wirusa od zakażenia do rozwinięcia choroby wynosi najczęściej od 7 do 14 dni, w niektórych przypadkach może wydłużyć się nawet do 28 dni. Ze względu na możliwy bezobjawowy przebieg duża liczba przypadków zakażeń TBEV pozostaje niezdiagnozowana. W około 20% przypadków, które zostają prawidłowo zdiagnozowane infekcja przebiega w sposób bezobjawowy. W pozostałych 80% procentach dochodzi do rozwoju choroby, której początkowy przebieg jest podobny do grypy – występują bóle mięśni i stawów, gorączka, bóle głowy oraz ogólne zmęczenie. Po kilku dniach od wystąpienia tych objawów, wirus może zaatakować układ nerwowy, powodując zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, zapalenie mózgu lub zapalenie rdzenia kręgowego. W przypadku rozwoju infekcji neurologicznej poziom śmiertelności zależy od podtypu wirusa. W przypadku podtypu Europejskiego wynosi ona od 1 do 5%, dla podtypu Syberyjskiego 2–8%, natomiast w przypadku podtypu dalekowschodniego sięga od 20 do 60% (Ecker i wsp. (1999), *J. Gen. Virol.*, 80(1): 179–185).

Wirus TBEV po raz pierwszy został wyizolowany w 1937 w Związku Radzieckim. Do tej pory wykazano jego obecność w 28 państwach w Europie Środkowej i Wschodniej, Skandynawii oraz wybranych rejonach Azji. Co roku odnotowuje się nowe ogniska zakażeń w wielu krajach, m. in. w Finlandii, Danii, Norwegii, Austrii, Niemczech czy Polsce (Yoshii i wsp. (2019), *J. Vet. Med. Sci.*, 81(3):343–347). Częstość zakażeń TBEV w ciągu ostatnich 20 lat wzrosła ponad 4-krotnie, w związku z czym kleszczowe zapalenie mózgu jest drugą po boreliozie chorobą najczęściej przenoszoną przez kleszcze (Daep i wsp. (2014), *J Neurovirol.*, 20(6):539–60).

Flawiwirusy charakteryzują się wysokim podobieństwem strukturalnym wirionów, podobieństwami w przebiegu cyklu replikacyjnego, jak również wysokim podobieństwem poszczególnych białek wirusowych. Wirus TBEV, podobnie jak inne flawiwirusy, zbudowany jest z ikozaedralnego kapsydu tworzonego przez strukturalne białko C. W środku kapsydu znajduje się genom wirusa w postaci ssRNA(+). Z zewnątrz kapsyd osłonięty jest dwuwarstwą lipidową, w której zakotwiczone są dwa białka strukturalne: prM/M oraz glikoproteina E. Dojrzałe wiriony zbudowane są z 90 dimerów glikoproteiny E oraz 90 dimerów dojrzałego białka M. Oba białka osłonki prM/M i E są białkami transmembranowymi posiadającymi po dwie domeny transmembranowe na końcu C'. W strukturze glikoproteiny E można wyróżnić trzy domeny (DI, DII, DIII), region domen helikalnych (stem) oraz region domen transmembranowych (anchor). DI ma kształt β -baryłki, DII ma strukturę podobną do domeny palców cynkowych, natomiast DIII strukturalnie przypomina strukturę immunoglobuliny. Większość szczepów flawiwirusów posiada jedno miejsce N-glikozylacji w DI. Według badań funkcjonalnych nad strukturą glikoproteiny E wirusa kleszczowego zapalenia mózgu wykazano rolę DII w procesie dimeryzacji, z kolei region stem uczestniczy w procesie trimeryzacji oraz stabilizacji

kompleksu prM-E (Füzik i wsp. (2018), *Nat Commun.* 30;9(1):436). Region anchor prawdopodobnie jest zaangażowany w składanie cząstek wirusowych. W DIII znajduje się wiele epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała neutralizujące oraz limfocyty cytotoksyczne, co sprawia, że glikoproteina E może być odpowiednim kandydatem do stosowania jako antygen szczepionkowy czy diagnostyczny. Podczas cyklu replikacyjnego wirusa TBEV, składanie wirionów rozpoczyna się w siateczce śródplazmatycznej, gdzie nowo powstała poliproteina zawierająca wszystkie białka wirusowe ulega obróbce proteolitycznej. W pierwszym etapie odcinane jest białko C przez proteazę wirusową NS2B/NS3, następnie białka prM i E ulegają odcięciu przez peptydazę sygnałową I komórki gospodarza. Na tym etapie tworzą się sferyczne cząstki wirusowe w formie niedojrzałej zbudowane z białek prM i E zakotwiczonych w osłonce lipidowej. Następnie niedojrzałe cząstki są transportowane do aparatu Golgiego i dalej do pęcherzyków wydzielniczych sieci trans aparatu Golgiego. Fragment pr białka prM pokrywa pętlę fuzyjną białka E, aby zapobiec przedwczesnej fuzji błony osłonki z błoną pęcherzyków wydzielniczych spowodowanej przez ich kwaśne środowisko. Tuż przed uwolnieniem wirionów z komórki gospodarza zostaje odcięty fragment pr od białka prM przez proteazę furynową obecną w sieci trans aparatu Golgiego, co doprowadza do sekrecji dojrzałych cząstek wirusowych (Pulkkinen i wsp. (2018), *Viruses*, 10(7): 1–20). Jednak cięcie przez tą proteazę nie jest efektywne, co skutkuje uwolnieniem z komórki mieszanej populacji wirionów zarówno dojrzałych jak i niedojrzałych. Uważa się, że obecność niedojrzałych wirionów flawiwirusów w organizmie człowieka może odgrywać rolę w unikaniu odpowiedzi immunologicznej. Ponadto, w czasie składania wirionów powstają także sferyczne cząstki strukturalnie przypominające cząstki wirusowe, zbudowane tylko z dwóch białek strukturalnych prM/M i E zakotwiczonych w błonie komórkowej. Cząstki te są jednak pozbawione kapsydu jak i materiału genetycznego. Naturalny proces składania tych cząstek jak i wirionów flawiwirusowych wykorzystano do produkcji rekombinowanych cząstek wirusopodobnych w różnych systemach ekspresji genów. Ekspresja genów dwóch białek strukturalnych prM oraz E prowadzi do powstawania VLPs. VLPs składają się z wielu kopii białek prM/M i E zakotwiczonych w podwójnej warstwie lipidowej. Wysokie podobieństwo strukturalne do natywnych wirionów sprawia, że są one doskonałym kandydatem jako antygeny szczepionkowe, w zastępstwie żywych atenuowanych lub inaktywowanych wirusów. Brak materiału genetycznego sprawia, że nie są zdolne do replikacji, a jednocześnie wykazują wysoką immunogenność, gdyż zawierają wiele kopii białek wirusowych, ściśle uporządkowanych, co zapewnia odpowiednią prezentację epitopów, będących celem przeciwciał neutralizujących czy limfocytów cytotoksycznych.

Obecnie dostępnych jest 5 szczepionek opartych na inaktywowanym wirusie przeciwko wirusowi TBEV. Dwie z nich oparte są na szczepach podtypu Europejskiego – FSME-IMMUN (Pfizer/EISA) na szczepie Neudoerfl oraz Encepur (GlaxoSmithKline plc/Wielka Brytania) na szczepie K23. Kolejne to szczepionki oparte na szczepach dalekowschodnich dopuszczone do stosowania w Rosji: TBE vaccine Moscow i Tick-E-Vac (Chumakov FSC R&D IBP RAS/Rosja) oparte na szczepie Sofjin oraz EnceVir (Microgen-Branch FSUC “SIC “Microgen” of MOH of Russia “SIC „Virion”/Rosja) oparta na szczepie 205. Wszystkie te szczepionki produkowane są w pierwotnych fibroblastach kurzych (PCECs, ang. primary chicken embryo fibroblasts cells). Po oczyszczeniu i inaktywacji do szczepionek dodawane są adiuwant oraz stabilizatory. We wszystkich szczepionkach adiuwantem jest wodorotlenek glinu. Jako stabilizatory stosowane są sacharoza lub albuminy surowicy ludzkiej. Opracowana została również szczepionka SenTaiBao (Changchun Institute of Biological Products Co., Ltd./Chiny) oparta na szczepie Sen-Zhang (dalekowschodni), jednak została ona zatwierdzona tylko w Chinach i nie jest stosowana od co najmniej 9 lat. Wszystkie opisane szczepionki są wielodawkowe; wymagają podania dwóch lub trzech dawek w określonych odstępach czasu, a następnie dawek przypominających co 3–5 lat. W zależności od preparatu, skuteczność dostępnych szczepionek w różnych badaniach podaje się jako sięgającą od 86 do 99% (Kubinski i wsp. (2020), *Viruses* 12;8(3):451).

Oprócz dostępnych preparatów szczepionkowych toczą się badania nad innymi podejściami w opracowaniu szczepionek przeciwko TBEV. Jednymi z pierwszych podejść były antygeny oparte na rekombinowanym białku E lub VLPs (białka prM i E). W badaniach na myszach wykazano, że tworzenie wyższych struktur białkowych oraz VLPs zwiększało poziom odpowiedzi immunologicznej (Heinz i wsp. (1995), *Vaccine*, 13:1636–1642). Innym podejściem było zastosowanie szczepionki DNA niosącej geny dla białek strukturalnych prM-E. W badaniach przeprowadzonych na myszach

oraz naczelnym wykazano, że jej skuteczność jest porównywalna do stosowanej szczepionki inaktywowanej FSME-IMMUN. Była ona również skuteczniejsza niż analogiczne podejście, w którym szczepionka DNA niosła tylko gen białka E (Aberle i wsp. (1999), *J. Immunol.* 163:6756–6761; Schmaljohn i wsp. (1997) *J. Virol.*, 71:9563–9569; Schmaljohn i wsp. (1999) *Virology*, 263:166–174). Wykazano również skuteczność szczepionek RNA niosących cały genom wirusa. W jednym z takich podejść stosowano infekcyjne RNA z wprowadzoną mutacją, pozwalającą na atenuację wirusa (Mandl i wsp. (1998), *Nat. Med.* 4:1438–1440). W innym badaniu stosowane RNA również obejmowało cały genom wirusa, jednak ze względu na delecję fragmentu białka C, uniemożliwiającego składanie wirionów potomnych było ono nieinfekcyjne (Kofler i wsp. (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101:1951–1956; Aberle i wsp. (2005), *J. Virol.*, 79:15107–15113). W obu przypadkach w badaniach na myszach obserwowano wzbudzenie silnej odpowiedzi odpornościowej, w tym odpowiedzi komórkowej, która nie jest wzbudzana przez stosowaną szczepionkę FSME-IMMUN. Stosowane w tych badaniach preparaty szczepionkowe zawierały „nagie” RNA, bez dodatkowych nośników.

Oprócz opisanych wyżej podejść badano też skuteczność szczepionek wektorowych opartych na adenowirusach oraz wirusie krowianki. W większości przypadków do wektora wprowadzane były geny kodujące białka prM i E lub białko nie strukturalne NS1. W badaniach na myszach szczepionki wektorowe wykazywały wysoką skuteczność. Przeprowadzono też wiele badań nad szczepionkami opartymi na atenuowanym wirusie, jednak w większości przypadków poziom atenuacji wirusa nie był wystarczający lub działanie preparatu było niższe niż w przypadku stosowania innych podejść (Kubinski i wsp. (2020), *Viruses* 12;8(3):451).

W literaturze opisano wiele strategii produkcji białek flawiwirusowych oraz VLPs, które mogą zostać użyte jako antygeny szczepionkowe czy diagnostyczne. Strategie te opierają się na ekspresji genów białek strukturalnych C, prM i/lub E w postaci naturalnej lub zmodyfikowanej – rekombinowanej.

Przedstawiony wynalazek dotyczy nowej strategii produkcji cząstek immunogennych tj. rekombinowanych cząstek wirusopodobnych. Strategia ta obejmuje połączenie naturalnych sekwencji aminokwasowych białek prM i E wirusa TBEV z innymi dodatkowymi elementami tj. naturalną sekwencją sygnałową dla fosfatazy LMSAP1 (ang. *Leishmania mexicana* Secreted acid phosphatase 1) z *Leishmania mexicana* i naturalną sekwencją peptydu P2A wraz z łącznikiem GSG stanowiącym połączenie aminokwasów glicyna-seryna-glicyna. Wprowadzone modyfikacje poprawiają produkcję, składanie, sekrecję, dojrzewanie oraz immunogenność uzyskanych białek rekombinowanych i VLPs. Rekombinowane VLPs o sekwencji aminokwasowej wg wynalazku mogą być nadprodukowane systemie ekspresyjnym w komórkach pierwotniakowych.

W pierwszym aspekcie niniejszy wynalazek dotyczy rekombinowanej cząstki wirusopodobnej VLPs, którą przedstawiono na sekwencji SEQ 1, opartej na naturalnych białkach: białku prM i białku E wirusa TBEV. Zmiana w sekwencji białka naturalnego dotyczy m.in. wprowadzenia do sekwencji naturalnych białek dodatkowych zmodyfikowanych sekwencji tj.: sekwencji sygnałowej dla fosfatazy LMSAP1 z *Leishmania mexicana*, np. sekwencji sygnałowej z systemu ekspresyjnego LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience) oraz sekwencji P2A, które powodują wydajniejszą nadprodukcję VLPs oraz zwiększają ich immunogenność.

Drugi aspekt wynalazku dotyczy rekombinowanych VLPs o sekwencji aminokwasowej wg wynalazku (SEQ 1) do medycznego zastosowania w prewencji i zwalczaniu kleszczowego zapalenia mózgu, zwłaszcza w użyciu jako komponent szczepionki. Aspekt ten obejmuje kompozycję immunogennego preparatu zawierającego VLPs korzystnie wraz z adiuwantem. Jako adiuwant zastosowana może być nanoemulsja skwalenu w wodzie np. Addavax (InvivoGen), 2% zawiesina żelowa wodorotlenku glinu –Alhydrogel. Zastosowanie adiuwantu zwiększa immunogenność preparatu.

Pierwszy aspekt wynalazku, czyli sekwencja aminokwasowa rekombinowanych VLPs (SEQ 1) wg wynalazku to sekwencje aminokwasowe białek strukturalnych wirusa TBEV, do których wprowadzono różne modyfikacje ich sekwencji.

Podstawowymi białkami strukturalnymi wirusa TBEV, będącymi naturalnymi składnikami wirionów tego wirusa jakie zastosowano w wynalazku to białka prM i E. W genomie wirusa TBEV geny białek prM i E występują po genie białka strukturalnego C. W stanie techniki dla wirusa TBEV domena transmembranowa białka C stanowi naturalną sekwencję sygnałową dla białka prM i podobnie domena transmembranowa białka prM stanowi naturalną sekwencję sygnałową dla białka E. W wynalazku jej nie zastosowano, ale zamiast niej wprowadzono sekwencję sygnałową dla fosfa-

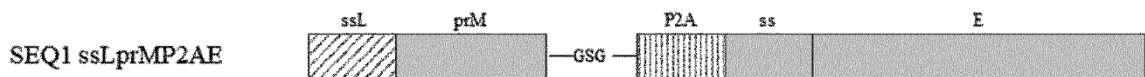
tazy LMSAP1 z *Leishmania mexicana*. Generalnie sekwencje sygnałowe kierują białka do odpowiednich kompartmentów w komórce eukariotycznej w celu dalszego ich dojrzewania, składania się w cząstki wirusowe oraz sekrecji na zewnątrz komórki. Sekwencje te po spełnieniu swojej roli są następnie odcinane przez odpowiednie dla danego rodzaju komórki eukariotycznej peptydazy sygnałowe. Celem poprawienia własności rekombinowanych VLPs w wynalazku użyto sekwencję sygnałową dla fosfatazy LMSAP1 z *Leishmania mexicana*. Sekwencję tę wprowadzono przed białkiem prM, zastępując nią naturalną sekwencję sygnałową dla tego białka (domenę transmembranową białka C). Fosfataza LMSAP1 z *Leishmania mexicana* jest białkiem naturalnie ulegającym sekrecji w komórkach pierwotniaka. Dołączenie jej sekwencji sygnałowej do sekwencji VLPs ma na celu zwiększenie wydajności nadprodukcji oraz efektywnego dojrzewania i sekrecji rekombinowanych VLPs w komórkach pierwotniaka *Leishmania tarentolae*.

Kolejną modyfikacją jest wprowadzenie naturalnej sekwencji peptydu P2A pochodzącego z niżej opisanego wirusa, powodującego samoczynne rozdzielanie wspólnie dojrzewających rekombinowanych białek prM i E, które są podstawowym elementem budującym VLPs, eliminując zależność tego procesu od obecności odpowiedniej peptydazy sygnałowej w komórce eukariotycznej. Efektywne rozdzielanie białek prM i E jest konieczne do pełnego dojrzewania cząstek wirusopodobnych. Sekwencja peptydu P2A pochodzi ze świńskiego Teschowirusa-1. Jest to 19-aminokwasowy peptyd zakończony aminokwasami prolina-glicyna-prolina. Obecność tych aminokwasów w kasecie białek powoduje samoczynne przerwanie translacji w miejscu pierwszej proliny i ponowne rozpoczęcie translacji od kolejnej proliny, w wyniku czego otrzymywane są dwa odrębne białka rekombinowane. Dodatkowo wprowadzono łącznik między białko prM i peptyd P2A tzw. „linker GSG”, czyli sekwencję trzech aminokwasów glicyny-seryny-glicyny, między C' koniec białka prM a N' koniec peptydu P2A w celu zmniejszenia sferycznych zaburzeń struktury białek.

Bazując na naturalnej zdolności białek prM i E do tworzenia VLPs, we wcześniejszych badaniach nad flawiwirusowymi VLPs jak również na własnym doświadczeniu w produkcji cząstek wirusowych w Zakładzie Szczepionek Rekombinowanych Międzyuczelnianego Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego zaprojektowano nową i efektywną strategię produkcji flawiwirusowych rekombinowanych VLPs zawierających znane białka strukturalne TBEV, wykorzystując połączenie wyżej wymienionych elementów.

Przedstawione modyfikacje w sekwencji aminokwasowej znanych białek TBEV, czyli sekwencja aminokwasowa VLP będąca przedmiotem wynalazku jest przedstawiona na schemacie 1. Sekwencje aminokwasowe białek prM i E wirusa TBEV mogą pochodzić z różnych szczepów wirusa TBEV. W przedstawionej w wynalazku sekwencji białek rekombinowanych i VLPs użyto sekwencji aminokwasowych białek wirusa TBEV-szczep Neudoerfl (GenBank: AAA86870.1). Wynalazek zobrazowano również na wykazie sekwencji.

Schemat 1- Schemat sekwencji aminokwasowej.



ssL – sekwencja sygnałowa dla fosfatazy LMSAP1 z *Leishmania mexicana* ulegającej sekrecji z systemu ekspresyjnego LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience)
 prM – białko strukturalne wirusa TBEV
 GSG – linkerowa sekwencja trzech aminokwasów, zapewniająca efektywniejszy rozdział białek
 P2A – sekwencja powodująca samoczynny rozdział białek, pochodzi ze świńskiego Teschowirusa-1
 ss – sekwencja sygnałowa dla białka E wirusa TBEV, zawarta w domenach transmembranowych białka prM wirusa TBEV
 E – białko strukturalne wirusa TBEV

SEQ 1

Sekwencja aminokwasowa rekombinowanych VLPs – sekwencja aminokwasowa składająca się z sekwencji aminokwasowych dwóch białek: prM (region 114–281 w sekwencji aminokwasowej

poliproteiny wirusa TBEV) i E wirusa TBEV (region 282–776 w sekwencji aminokwasowej poliproteiny wirusa TBEV) poprzedzonych odpowiednio aminokwasową sekwencją sygnałową dla fosfatazy LMSAP1 z *Leishmania mexicana* (region 1–23 w sekwencji aminokwasowej tego białka, Genbank: CAA87090.1) np. sekwencja sygnałowa z systemu ekspresyjnego LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience), rozdzielonych sekwencją linkerową trzech aminokwasów wyżej opisanych – glicyny-seryny-glicyny nazywane linkerem GSG) połączoną z peptydem P2A (region 979–997 w sekwencji aminokwasowej poliproteiny wirusa Teschowirusa 1, Genbank: NP_653143.1).

Podsumowując, modyfikacje wprowadzone do sekwencji aminokwasowych znanych białek flawiwirusowych powodują:

- sekwencja sygnałowa dla fosfatazy LMSAP 1 z *Leishmania mexicana* ułatwia sekrecję dojrzałych cząstek wirusopodobnych VLPs (SEQ 1), co umożliwi zastosowanie prostszych metod oczyszczania VLPs
- peptyd P2A wstawiony między białkami prM i E (SEQ 1) pozwala na efektywniejsze rozdzielanie białek flawiwirusowych prM i E, co ułatwia składanie cząstek VLPs
- sekwencja sygnałowa dla fosfatazy LMSAP 1 z *Leishmania mexicana* zastosowana jako sekwencja sygnałowa do białka prM oraz P2A wstawiona między białkami prM i E (SEQ 1) zwiększa wydajność produkcji rekombinowanych VLPs TBEV w systemie ekspresyjnym pierwotniaka *Leishmania tarentolae* LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience).

Cząstki wirusopodobne VLPs o sekwencji SEQ 1 są zdolne do wzbudzenia silnej odpowiedzi immunologicznej w modelu mysim, co jest niezbędne do skutecznej neutralizacji wirusa TBEV w modelach *in vitro* oraz *in vivo*, co znajduje przełożenie do neutralizacji wirusa TBEV w organizmie człowieka.

VLPs o SEQ 1 wg wynalazku mogą być nadprodukowane w komórkach pierwotniaka *Leishmania tarentolae*. Do nadprodukcji można wykorzystać komercyjny system nadprodukcji LEXSY (Jena Bioscience).

W celu nadprodukcji antygenów flawiwirusowych mogą być wykorzystane standardowe warunki (m.in. skład pożywki hodowlanej, czas nadprodukcji, temperatura hodowli komórek, ilość użytego wektora itp.) stosowane do nadprodukcji białek wirusowych i/lub zastosowane warunki zalecane przez producentów komercyjnych systemów.

Drugi aspekt tego wynalazku przedstawia zastosowanie rekombinowanych VLPs o sekwencji SEQ 1 wg wynalazku jako antygeny szczepionkowe, w profilaktyce zakażeń wirusem TBEV. Aspekt ten obejmuje też kompozycję immunogennego preparatu zawierającego VLPs oraz korzystnie co najmniej jeden adiuwant – składnik szczepionki. Jako adiuwant wykorzystane mogą być zastosowane w przykładach Addavax (InvivoGen) lub Alhydrogel (InvivoGen).

W skład preparatu szczepionkowego do zapobiegania infekcji wirusem TBEV mogą wchodzić wyprodukowane rekombinowane VLPs o sekwencji SEQ 1 zmieszane z adiuwantem. Rekombinowane VLPs mogą być wyprodukowane wg metody produkcji podanej w przykładzie 1.

Schemat podawania takich preparatów szczepionkowych może obejmować od 1 do 3 dawek podawanych w odstępie 2 tygodni. Jedna dawka może zawierać 1–100 µg białka całkowitego w próbnie zawieszony w 50–100 µl buforu PBS zmieszane z adiuwantem.

Preparaty szczepionkowe mogą być podawane domięśniowo i/lub podskórnie.

Wynalazek przedstawiono na sekwencji opisywanej dalej jako SEQ 1. Wynalazek opisano również w przykładach wykonania i rysunku, na którym poszczególne figury przedstawiają:

- Fig. 1. Analiza western blot przedstawiająca potwierdzenie produkcji rekombinowanych VLPs ssLprMP2AE w pożywce hodowlanej z komórek pierwotniaka *Leishmania tarentolae*.
- Fig. 2. Zdjęcia z transmisyjnej mikroskopii elektronowej VLPs ssLprMP2AE o sekwencji SEQ 1 (barwienie negatywowe oraz barwienie negatywowe z barwieniem Immungold przeciwciałami skierowanymi przeciwko białku E).
- Fig. 3. Wykres przedstawiający średnie miana mysich surowic uzyskanych po 3 szczepieniach VLPs ssLprMP2AE o sekwencji SEQ 1.

Przykład 1

PRODUKCJA REKOMBINOWANYCH VLPs O SEKWENCJI AMINOKWASOWEJ WEDŁUG WYNALAZKU

Sekwencję uzyskano znanym sposobem.

Geny kodujące rekombinowane wchodzące w skład VLPs ssLprMP2AE o sekwencji SEQ 1 zostały chemicznie zsyntetyzowane przez GeneArt (Life Technology). Następnie zostały wklonowane do wektora plazmidowego pLEXSY_I-blecherry3 – składnika systemu ekspresji LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience) używając miejsc restrykcyjnych Sall/NotI.

Plazmid był namnażany w komórkach *E. coli* (TOP 10) i izolowany przy użyciu kitu Plasmid Mini (A&A Biotechnology). Uzyskany plazmid został zliniowany za pomocą enzymu restrykcyjnego SmaI, w celu wprowadzenia go do komórek pierwotniaka *Leishmania tarentolae*. Przygotowany w ten sposób plazmid został użyty do transfekcji zgodnie z protokołem systemu LEXSInduce3 Expression Kit (Jena Bioscience), w celu uzyskania indukowalnych linii stabilnych niosących geny kodujące VLPs. Po przeprowadzeniu transfekcji za pomocą elektroporacji komórki zostały poddane selekcji za pomocą bleomycyny (100 µg/ml) zgodnie z protokołem producenta. Komórki były hodowane w pożywce LEXSY BHI Medium (Jena Bioscience) suplementowanej heminą (5 µg/ml), z dodatkiem antybiotyków Pen-Strep i LEXSY NTC (100 µg/ml) (Jena Bioscience) oraz Hygromycin B Gold (100 µg/ml) (InvivoGen) w 26°C. Po 2 tygodniach selekcji uzyskano linię stabilną z indukowalną ekspresją genów kodujących rekombinowane białka tworzące VLPs ssLprMP2AE pod kontrolą represora tetracyklinowego.

W celu nadprodukcji VLPs o SEQ 1 komórki indukowano tetracykliną (15 µg/ml), skala hodowli 50 ml, przygotowana przez zaszczerpienie 5 ml hodowli do 45 ml świeżej pożywki LEXSY BHI Medium (Jena Bioscience). Następnie inkubowano komórki przez 3 dni w 26°C z wytrząsaniem.

W dalszym kroku pożywkę z nadkomórek odwirowywano w celu pozbycia się resztek komórkowych (8000 rpm, 15 min). Wykonano analizę western blot przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko białku E oraz prM w celu potwierdzenia obecności rekombinowanych białek wchodzących w skład VLPs o sekwencji SEQ 1 w pożywce hodowlanej. Fig. 1 przedstawia wynik przeprowadzonej analizy, potwierdzającej produkcję oraz sekrecję do pożywki białek prM i E. W celu oczyszczenia VLPs pożywkę poddawano peletowaniu przez ultrawierowanie przez 20% poduszkę sacharozową (20% sacharoza w buforze Tris-NaCl-EDTA 50 mM-100 mM-10 mM) przy prędkości 28 000 rpm przez 3 h. Precypitaty rozpuszczono przez noc w roztworze buforowanej fosforanem soli fizjologicznej o pH 7,4 (PBS). Po rozpuszczeniu precypitaty poddawano ultrawierowaniu w gradiencie gęstości sacharozy (20–60% w buforze Tris-NaCl-EDTA 50 mM-100 mM-10 mM), 27 000 rpm, 16 h. W celu usunięcia sacharozy z próbek i wymiany buforu na PBS wykorzystano filtry Amicon Ultra 100K (Merck Milipore).

Analiza frakcji zawierających VLPs ssLprMP2AE o sekwencji SEQ 1 po ultrawierowaniu w gradiencie została wykonana przy użyciu metod takich jak western blotting, barwienie coomassie brilliant blue, transmisyjna mikroskopia elektronowa, metoda Bradford w celu oznaczenia stężenia białka. Wyniki analizy pokazano na Fig. 2. Zarówno mikroskopia elektronowa z barwieniem negatywowym oraz barwieniem negatywowym z Immunogold ze specyficznymi przeciwciałami przeciwko białku E (Fig. 2), jak i inne wymienione metody badawcze potwierdziły, że zgodnie z założeniami białka produkowane według SEQ 1 tworzą VLPs.

Przykład 2

PREPARAT SZCZEPIONKOWY

Budowa sekwencji według wynalazku świadczy o medycznym zastosowaniu VLPs do prewencji zakażeń wywołanych przez wirusa TBEV z rodzaju Flavivirus, zwłaszcza jako składnik szczepionki.

Dla przykładu, rekombinowane VLPs o sekwencji SEQ 1 wyprodukowane metodą przedstawioną w przykładzie 1 zostały użyte jako immunogen w badaniach na modelu mysim.

Preparaty szczepionkowe o składzie powyżej opisanym były podawane myszom w 3 dawkach w odstępie 2 tygodni. Preparaty szczepionkowe stanowiące 1 dawkę powstały przez zmieszanie oczyszczonych rekombinowanych VLPs o sekwencji SEQ 1 (w ilości 10 µg całkowitej ilości oczyszczonego białka w objętości 100 µl) z adiuwantem AddaVax (InvivoGen) w stosunku objętościowym 1:1 lub adiuwantem Alhydrogel (InvivoGen) w stosunku masowym 1:25. Następnie preparaty zostały podane dwóm grupom myszy Balb/c (6 samic myszy na grupę) podskórnie w dwa miejsca wkłucia. Trzy myszy były zaszczerpięone tylko buforem PBS zmieszany z adiuwantem w tym samym stosunku i stanowiły grupę kontrolną.

Preparaty 2 i 3 dawki zostały wykonane przez zmieszanie 10 µg oczyszczonych rekombinowanych VLPs o sekwencji SEQ 1 w objętości 50 µl w stosunku objętościowym 1:1 z adiuwantem AddaVax lub adiuwantem Alhydrogel w stosunku masowym 1:25. Preparaty podano również podskórnie w 1 miejsce wkłucia.

W celu oceny skuteczności szczepionek tj. immunogenności rekombinowanych VLPs pobrano surowice po każdym szczepieniu każdej grupy myszy i przeprowadzono analizę immunogenności przez oznaczenie miana surowic. Analiza polegała na przeprowadzeniu testu ELISA gdzie antygenem były białka prM/E nadprodukowane w komórkach ssaczy HEK293T i oczyszczone przez ultrawierwienie lub na złożu niklowym z wykorzystaniem znaczników histydynowych. Płytkę M-96 opłaszczono antygenem o stężeniu 10 µg/ml w ilości 50 µl przez noc. Następnie dodano roztwór blokujący (3% BSA w buforze PBS+0,05% Tween20) w ilości 100 µl. Po odpłukaniu nadmiaru roztworu blokującego dodano seryjne rozcieńczenia surowic uzyskanych z poszczególnych myszy w objętości 50 µl i inkubowano 2 h. Następnie po odpłukaniu nadmiaru, dodano przeciwciała drugorzędowe anti-mysie skoniugowane z peroksydazą chrzanową i inkubowano 1 h. Po odpłukaniu nadmiaru przeciwciał dodano substrat tetrametylobenzydynę (TMB) (Life Technology) i przeprowadzono reakcję enzymatyczną przez 2 min. Następnie reakcję zastopowano przez dodanie 0,5 M kwasu siarkowego (VI). Odczyt reakcji nastąpił przez odczyt absorbancji przy długości fali 450 nm w czytniku płytek.

Miano surowicy oznaczano przez wybranie takiego rozcieńczenia surowicy, w którym sygnał jest wyższy niż średnia wartość absorpcji powiększona o potrojoną wartość odchylenia standardowego w kontroli negatywnej. Figura 3 przedstawia miana surowic. Po trzecim szczepieniu ich średnie miana sięgają wartości rzędu od około 10^5 , co wskazuje na wysoką immunogenność zastosowanego preparatu szczepionkowego zawierającego rekombinowane VLPs. Uzyskane wyniki potwierdzają immunogenność uzyskanych VLPs o sekwencji SEQ 1 według wynalazku oraz potwierdzają ich użyteczność jako preparatu szczepionkowego.

Wykaz sekwencji:

SEQ. 1 - długość 733

Met	Ala	Ser	Arg	Leu	Val	Arg	Val	Leu	Ala	Ala	Ala	Met	Leu	Val	Ala
1				5					10					15	
Ala	Ala	Val	Ser	Val	Asp	Ala	Thr	Met	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Val	Arg
			20					25					30		
Lys	Glu	Arg	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Ile	Arg	Ala	Glu	Gly	Lys	Asp	Ala
		35					40					45			
Ala	Thr	Gln	Val	Arg	Val	Glu	Asn	Gly	Thr	Cys	Val	Ile	Leu	Ala	Thr
	50					55					60				
Asp	Met	Gly	Ser	Trp	Cys	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Tyr	Glu	Cys	Val	Thr
65					70					75					80
Ile	Asp	Gln	Gly	Glu	Glu	Pro	Val	Asp	Val	Asp	Cys	Phe	Cys	Arg	Asn
				85					90					95	
Val	Asp	Gly	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr	Gly	Arg	Cys	Gly	Lys	Gln	Glu	Gly
			100					105					110		
Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Ser	Val	Leu	Ile	Pro	Ser	His	Ala	Gln	Gly	Glu
		115					120					125			
Leu	Thr	Gly	Arg	Gly	His	Lys	Trp	Leu	Glu	Gly	Asp	Ser	Leu	Arg	Thr
	130					135					140				
His	Leu	Thr	Arg	Val	Glu	Gly	Trp	Val	Trp	Lys	Asn	Lys	Leu	Leu	Ala
145					150					155					160
Leu	Ala	Met	Val	Thr	Val	Val	Trp	Leu	Thr	Leu	Glu	Ser	Val	Val	Thr
				165					170					175	
Arg	Val	Ala	Val	Leu	Val	Val	Leu	Leu	Cys	Leu	Ala	Pro	Val	Tyr	Ala
			180					185					190		
Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val
		195					200					205			

Glu Glu Asn Pro Gly Pro Thr Leu Glu Ser Val Val Thr Arg Val Ala
 210 215 220
 Val Leu Val Val Leu Leu Cys Leu Ala Pro Val Tyr Ala Ser Arg Cys
 225 230 235 240
 Thr His Leu Glu Asn Arg Asp Phe Val Thr Gly Thr Gln Gly Thr Thr
 245 250 255
 Arg Val Thr Leu Val Leu Glu Leu Gly Gly Cys Val Thr Ile Thr Ala
 260 265 270
 Glu Gly Lys Pro Ser Met Asp Val Trp Leu Asp Ala Ile Tyr Gln Glu
 275 280 285
 Asn Pro Ala Lys Thr Arg Glu Tyr Cys Leu His Ala Lys Leu Ser Asp
 290 295 300
 Thr Lys Val Ala Ala Arg Cys Pro Thr Met Gly Pro Ala Thr Leu Ala
 305 310 315 320
 Glu Glu His Gln Gly Gly Thr Val Cys Lys Arg Asp Gln Ser Asp Arg
 325 330 335
 Gly Trp Gly Asn His Cys Gly Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ile Val Ala
 340 345 350
 Cys Val Lys Ala Ala Cys Glu Ala Lys Lys Lys Ala Thr Gly His Val
 355 360 365
 Tyr Asp Ala Asn Lys Ile Val Tyr Thr Val Lys Val Glu Pro His Thr
 370 375 380
 Gly Asp Tyr Val Ala Ala Asn Glu Thr His Ser Gly Arg Lys Thr Ala
 385 390 395 400
 Ser Phe Thr Ile Ser Ser Glu Lys Thr Ile Leu Thr Met Gly Glu Tyr
 405 410 415
 Gly Asp Val Ser Leu Leu Cys Arg Val Ala Ser Gly Val Asp Leu Ala
 420 425 430
 Gln Thr Val Ile Leu Glu Leu Asp Lys Thr Val Glu His Leu Pro Thr
 435 440 445
 Ala Trp Gln Val His Arg Asp Trp Phe Asn Asp Leu Ala Leu Pro Trp
 450 455 460
 Lys His Glu Gly Ala Gln Asn Trp Asn Asn Ala Glu Arg Leu Val Glu
 465 470 475 480
 Phe Gly Ala Pro His Ala Val Lys Met Asp Val Tyr Asn Leu Gly Asp
 485 490 495
 Gln Thr Gly Val Leu Leu Lys Ala Leu Ala Gly Val Pro Val Ala His
 500 505 510
 Ile Glu Gly Thr Lys Tyr His Leu Lys Ser Gly His Val Thr Cys Glu
 515 520 525
 Val Gly Leu Glu Lys Leu Lys Met Lys Gly Leu Thr Tyr Thr Met Cys
 530 535 540
 Asp Lys Thr Lys Phe Thr Trp Lys Arg Ala Pro Thr Asp Ser Gly His
 545 550 555 560
 Asp Thr Val Val Met Glu Val Thr Phe Ser Gly Thr Lys Pro Cys Arg
 565 570 575
 Ile Pro Val Arg Ala Val Ala His Gly Ser Pro Asp Val Asn Val Ala
 580 585 590
 Met Leu Ile Thr Pro Asn Pro Thr Ile Glu Asn Asn Gly Gly Ser Phe
 595 600 605
 Ile Glu Met Gln Leu Pro Pro Gly Asp Asn Ile Ile Tyr Val Gly Glu
 610 615 620
 Leu Ser His Gln Trp Phe Gln Lys Gly Ser Ser Ile Gly Arg Val Phe
 625 630 635 640

Gln	Lys	Thr	Lys	Lys	Gly	Ile	Glu	Arg	Leu	Thr	Val	Ile	Gly	Glu	His
				645					650					655	
Ala	Trp	Asp	Phe	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Ile	Gly	Lys
			660					665					670		
Ala	Val	His	Thr	Val	Leu	Gly	Gly	Ala	Phe	Asn	Ser	Ile	Phe	Gly	Gly
		675					680					685			
Val	Gly	Phe	Leu	Pro	Lys	Leu	Leu	Leu	Gly	Val	Ala	Leu	Ala	Trp	Leu
	690					695					700				
Gly	Leu	Asn	Met	Arg	Asn	Pro	Thr	Met	Ser	Met	Ser	Phe	Leu	Leu	Ala
705					710					715					720
Gly	Gly	Leu	Val	Leu	Ala	Met	Thr	Leu	Gly	Val	Gly	Ala			
				725								730			

Zastrzeżenia patentowe

1. Rekombinowana cząstka wirusopodobna kleszczowego zapalenia mózgu o sekwencji SEQ 1 zawierająca sekwencję aminokwasową białka prM regionu 114–281 w sekwencji aminokwasowej poliproteiny wirusa kleszczowego zapalenia mózgu (TBEV), sekwencję aminokwasową białka E wirusa TBEV regionu 282–776 w sekwencji aminokwasowej poliproteiny wirusa TBEV oraz aminokwasową sekwencję sygnałową dla fosfatazy LMSAP 1 z *Leishmania mexicana* regionu 1–23 w sekwencji aminokwasowej tego białka, przy czym sekwencja sygnałowa dla LMSAP 1 usytuowana jest przed sekwencją białka prM, a ponadto zawiera sekwencję linkerową trzech aminokwasów glicyny-seryny-glicyny połączoną z peptydem P2A regionu 979–997 w sekwencji aminokwasowej poliproteiny Teschowirusa 1.
2. Cząstka o sekwencji SEQ 1 do zastosowania w prewencji i zwalczaniu kleszczowego zapalenia mózgu.
3. Cząstka do zastosowania według zastrz. 2, **znamienna tym**, że jest stosowana jako mieszanina z adiuwantem.
4. Cząstka do zastosowania według zastrz. 2, **znamienna tym**, że służy do produkcji szczepionek.

Rysunki

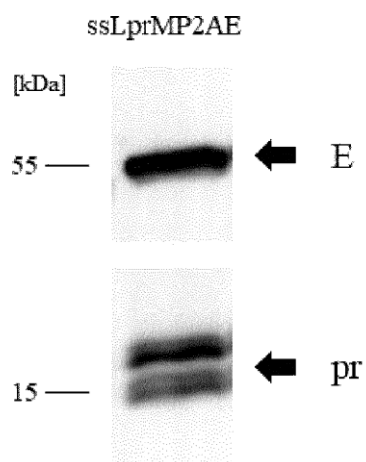
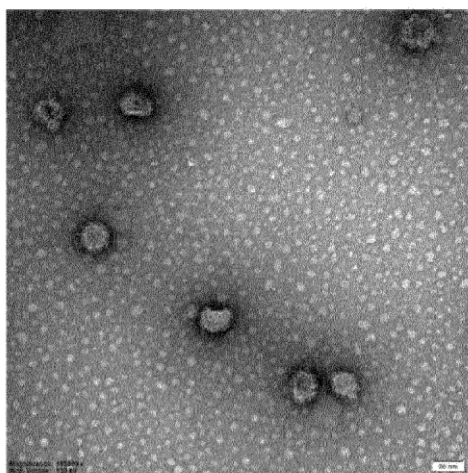
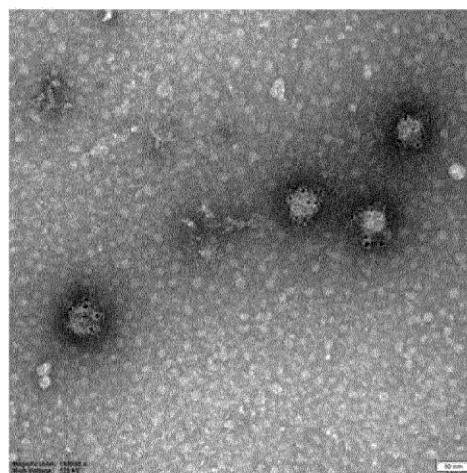


Fig. 1



ssLprMP2AE
barwienie negatywowe



ssLprMP2AE
barwienie negatywowe z
barwieniem Immunogold

Fig. 2

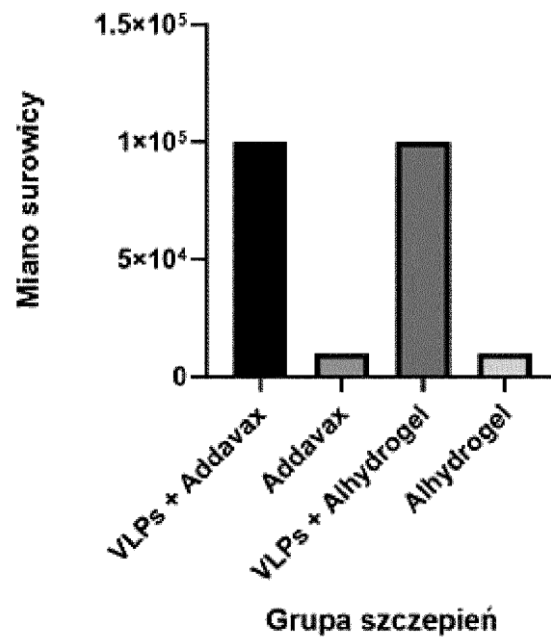


Fig. 3