

STRESZCZENIE

Cząsteczki wirusopodobne (VLP) reprezentują nową klasę bionanocząsteczek, stanowiących atrakcyjne narzędzie w medycynie. Cząsteczki te otrzymuje się metodami inżynierii genetycznej, wykorzystując prokariotyczne i eukariotyczne systemy ekspresji białek rekombinowanych. Białka te, jeśli posiadają prawidłową konformację, spontanicznie agregują w wyższe struktury przypominające natywne wirusy. VLP skutecznie naśladują strukturę wirusa, ale ze względu na brak genomu, nie wykazują właściwości infekcyjnych. Dzięki tym cechom cząsteczki wirusopodobne znajdują zastosowanie w wakcynologii oraz jako platformy dostarczające leki i geny. Cechą szczególną cząsteczek wirusopodobnych jest możliwość dołączania do nich heterologicznych epitopów i ich skuteczna prezentacja na powierzchni utworzonych struktur. To czyni VLP znakomitym narzędziem umożliwiającym prace nad szczepionkami nowej generacji dla teoretycznie każdej choroby infekcyjnej.

Atrakcyjną grupą wirusów do pracy nad cząsteczkami VLP są parwovirusy (PV), głównie ze względu na swoją prostą budowę. PV to małe, bezotoczkowe wirusy o średnicy ok. 20 nm i genomie w postaci jednoniciowego DNA. Należące do tej grupy kurzy oraz indyczy parwovirus (odpowiednio ChPV i TuPV) uważane są za jeden z czynników etiologicznych enteropatii u tych gatunków drobiu. Występowanie enteropatii u drobiu jest istotnym problemem z punktu widzenia ekonomii chowu przemysłowego. Obecnie brak jest szczepionek stosowanych w profilaktyce zakażeń ChPV, ale widzi się potrzebę ich opracowania.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej po raz pierwszy uzyskano cząsteczki wirusopodobne parwovirusa kur. ChPV VLP otrzymano z rekombinowanego białka uzyskanego w bakteryjnym systemie ekspresyjnym. Rekombinowany antygen był fragmentem (40-536 aminokwasów) głównego białka strukturalnego VP2 ChPV. W ramach przeprowadzonych badań sklonowano gen kodujący rekombinowany antygen VP2, uzyskano wysoki poziom ekspresji białka w komórkach *E. coli* w formie ciał inkluzyjnych, opracowano skuteczną i względnie taną metodę oczyszczania rekombinowanego antygeny oraz tworzenia *in vitro* z oczyszczonego białka cząsteczek wirusopodobnych. Opracowana metoda otrzymywania cząsteczek VLP obejmowała denaturację ciał inkluzyjnych, wstępne oczyszczanie rekombinowanego białka metodą chromatografii jonowymiennej, podwójną renaturację białka rozdzieloną wysalaniem cząsteczek VLP w niskich stężeniach siarczanu amonu, oraz zatężania uzyskanych struktur metodą filtracji stycznej (TFF). Czystość uzyskanego antygeny wynosiła ok. 93%, a wydajność opracowanej metody ok. 10 mg VLP/l hodowli.

Morfologię otrzymanych cząsteczek określono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) i obrazowaniem przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (TEM). Zastosowane metody potwierdziły, że otrzymane struktury przypominają parwowirusa kur. Aktywność biologiczną otrzymanych VLP oznaczono testem hemaglutynacji (HA), zaś immunogenność eksperymentalnym szczepieniem kurcząt SPF pojedynczą dawką antygeny (20 µg) w formułacji z adiuwantem Montanide ISA 71 VG. Otrzymane cząsteczki miały zdolność aglutynacji kurzych erytrocytów oraz indukowały bardzo wysokie miana przeciwciał, obserwowane 3 tygodnie po immunizacji. Zdefiniowano również potencjalne zastosowanie otrzymanych cząsteczek VLP jako: antygen szczepionkowy w profilaktyce zakażeń ChPV, uniwersalna platforma do opracowywania szczepionek typu VLP w profilaktyce chorób drobiu, oraz antygen do opracowania testów serologicznych w diagnostyce zakażeń ChPV i TuPV.

SUMMARY

Virus-like particles (VLPs) represent a new class of bionanoparticles that are an attractive tool in medicine. These molecules are obtained by genetic engineering methods, using prokaryotic and eukaryotic expression systems for recombinant proteins. Provided they have a correct conformation, these proteins spontaneously aggregate into higher structures resembling native viruses. VLPs effectively mimic the structure of a virus but are noninfectious due to their lack of genome. Thanks to these properties, virus-like molecules are used in vaccinology and as platforms for providing drugs and genes. A special property of virus-like particles is their ability to attach heterologous epitopes and their effective presentation on the surface of created structures. This makes VLP an excellent tool for developing new generation vaccines for, theoretically, every infectious disease.

Parvoviruses (PVs) are an attractive group of viruses to work on VLP molecules, mainly due to their simple structure. PVs are small, non-enveloped viruses with a diameter of about 20 nm, and genome in the form of a single-stranded linear DNA molecule. Chicken parvovirus (ChPV), which belongs to this group, is considered to be one of the etiological factors of the occurrence of enteropathy in poultry. The occurrence of enteropathy in poultry is a significant economic problem for industrial farming. Currently, there are no vaccines for prevention of ChPV infections. However, there is a need to develop them.

Within the framework of this dissertation, virus-like particles similar to chicken parvovirus were obtained for the first time. VLP ChPV was obtained from recombinant protein expressed in bacterial cells. The recombinant antigen was a fragment (40-536 amino acids) of the main structural protein VP2 ChPV. The research involved cloning the gene encoding the recombinant VP2 antigen, obtaining a high level of protein expression in *E. coli* cells in the form of inclusion bodies, developing an effective and relatively cheap method of purification of the recombinant antigen and *in vitro* assembly of virus-like particles from purified protein. The developed method of obtaining VLP molecules included denaturation of inclusion bodies, preliminary purification of recombinant protein by ion exchange chromatography, double renaturation of protein separated by salting out of VLP in low concentration of ammonium sulfate, and final concentration of obtained structures by tangential flow filtration (TFF). The antigen purity was c.a. 93% and the yield c.a. 10 mg of VLP/l culture.

Morphology of the obtained particles was determined by dynamic light scattering (DLS) and imaging using transmission electron microscope (TEM). The used methods verified that

the obtained structures resemble chicken parvovirus. Biological activity of the VLP was determined by haemagglutination assay (HA) and immunogenicity was determined by experimental vaccination of SPF chickens with single dose of antigen (20 µg) in the formula with adjuvant Montanide ISA 71 VG. The obtained molecules had the ability to agglutinate chicken erythrocytes and induced very high antibody titers, observed 3 weeks following the immunization. Potential use of the obtained VLP molecules was also defined as: vaccine antigen for the prevention of ChPV infections, universal platform for development of VLP vaccines for prevention of poultry diseases, and an antigen for development of serological tests for diagnosing ChPV and TuPV infections.