



**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**Școala de Studii Avansate a Academiei Române**  
**Institutul de Biochimie**

## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Producerea și caracterizarea de particule subvirale chimerice  
pentru dezvoltarea unui nou vaccin față de virusul hepatitei B**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT**  
**CS I Dr. Norica Nichita**

**DOCTORAND**  
**Pantazică Ana-Maria Mădălina**

**2023**

# CUPRINS (TEZĂ IN EXTENSO)

<b>Listă Figuri</b> .....	4
<b>Listă Tabele</b> .....	6
<b>Listă abrevieri</b> .....	7
<b>Rezumat</b> .....	12
<b>Capitol 1. INTRODUCERE</b> .....	14
1.1 Virusul Hepatitei B (VHB) .....	14
1.1.1 Răspândirea și impactul global al infecției cu VHB.....	14
1.1.2 Evoluția infecției.....	14
1.1.3 Structura și genomul VHB.....	15
1.1.4 Ciclul de viață al VHB.....	22
1.1.4.1 Internalizarea celulară.....	22
1.1.4.2 Formarea ADNccc.....	23
1.1.4.3 Sinteza ARN și a proteinelor virale.....	25
1.1.4.4 Asamblarea capsidei virale și formarea ADNrc.....	26
1.1.4.5 Secreția particulelor virale.....	26
1.1.5 Modele celulare pentru studiul <i>in vitro</i> al VHB.....	27
1.1.6 Modele animale pentru studiul <i>in vivo</i> al VHB.....	29
1.1.7 Terapii antivirale.....	31
1.1.8 Profilaxie.....	34
1.2 Utilizarea plantelor ca sistem alternativ de producție a antigenelor VHB.....	37
1.2.1 Avantajele și dezavantajele producției de antigene virale în plante.....	37
1.2.2 N-glicozilarea proteinelor secretorii la plante și modelarea acesteia prin tehnologia CRISPR/Cas9.....	40
1.3 Scopul studiului.....	42
<b>Capitol 2. MATERIALE ȘI METODE</b> .....	44
2.1 Linii celulare.....	44
2.2 Plasmide.....	45

2.3 Izolare ADN plasmidial.....	47
2.4 Obținerea antigenelor VHB în celule mamaliene (HEK293T) .....	48
2.5 Obținerea antigenelor VHB în plante ( <i>Nicotiana benthamiana</i> ) de tip „sălbatic” (WT) sau cu tipar „umanizat” de glicozilare (FX-KO).....	48
2.6 Extracția antigenelor VHB produse în plante.....	49
2.7 Purificarea antigenelor VHB produse în celule mamaliene și plante.....	49
2.8 Purificarea și cuantificarea VHB din mediul extracelular.....	50
2.9 Determinare antigen HBs prin ELISA.....	51
2.10 Determinare antigen HBe prin ELISA.....	51
2.11 SDS-PAGE și western blot.....	52
2.12 Pulse-chase și imunoprecipitare.....	52
2.13 Analiza de N-glicani prin cromatografie de lichide de ultra-performanță cu detecție de fluorescență (UPLC-FLD) cuplată cu spectrometrie de masă (MS).....	53
2.14 Testarea antigenicității chimerei VHB-S/preS1 produse în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO prin ELISA.....	55
2.15 Imunizarea animalelor.....	56
2.15.1 Imunizarea cu antigen VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în celule HEK293T.....	57
2.15.2 Imunizarea cu antigen VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	57
2.16 Analiza răspunsului imun umoral în șoareci imunizați.....	57
2.17 Analiza răspunsului imun celular în șoareci imunizați.....	58
2.17.1 Antigen VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în celule HEK293T.....	58
2.17.2 Antigen VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	59
2.18 Caracterizarea funcțională a anticorpilor anti-VHB din serul șoarecilor imunizați.....	60
2.19 Analiza capacității de neutralizare a serului imun față de VHB.....	60
2.20 Analiza statistică.....	61
<b>Capitol 3. REZULTATE.....</b>	<b>62</b>
3.1 Construcția și obținerea antigenelor chimerice.....	62
3.2 Expresia și caracterizarea antigenelor VHB chimerice în celule HEK293T.....	65

3.3 Producția și purificarea antigenelor VHB-S și -S/preS1 <sup>16-42</sup> din celule mamaliene.....	69
3.4 Analiza răspunsului imun umoral indus de antigenele VHB.....	71
3.5 Analiza răspunsului imun celular indus de antigenele VHB.....	73
3.6 Imunizarea cu antigenul VHB chimeric induce atât anticorpi anti-S cât și anti-preS1.....	75
3.7 Analiza capacității de neutralizare a serului imun obținut în urma imunizării cu VHB-S și S/preS1 <sup>16-42</sup> față de VHB.....	76
3.8 Analiza capacității de neutralizare a serului imun obținut în urma imunizării cu VHB-S și S/preS1 <sup>16-42</sup> față de VHB cu mutații de rezistență la vaccinul standard.....	78
3.9 Producția și caracterizarea antigenului VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	81
3.10 Profilul de N-glicozilare al antigenului VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> este diferit între <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	85
3.11 Antigenicitatea proteinei VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produse în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	90
3.12 Analiza răspunsului imun umoral indus de imunizarea cu VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	92
3.13 Analiza răspunsului imun celular indus de imunizarea cu VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în <i>N. benthamiana</i> WT și FX-KO.....	95
3.14 Antigenul VHB-S/preS1 <sup>16-42</sup> produs în <i>N. benthamiana</i> FX-KO induce anticorpi puternic neutralizanți față de VHB WT și cu mutații de rezistență la vaccin.....	97
<b>Capitol 4. DISCUȚII.....</b>	<b>99</b>
<b>CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE.....</b>	<b>103</b>
<b>Mulțumiri.....</b>	<b>105</b>
<b>Lista lucrărilor publicate.....</b>	<b>106</b>
<b>Participări la conferințe.....</b>	<b>107</b>
<b>BIBLIOGRAFIE.....</b>	<b>109</b>

## Scopul studiului

La nivel global, peste 290 milioane de oameni sunt infectați cronic cu Virusul Hepatitei B (VHB). Anual, infecțiile cronice conduc la peste 800.000 decese datorate complicațiilor cum ar fi ciroza hepatică sau carcinomul hepatocelular. Terapiile aflate în mod curent pe piață au contribuit semnificativ la reducerea impactului infecțiilor cu VHB, însă nu pot elimina complet virusul de la nivelul hepatocitelor. Așadar, vaccinarea rămâne cea mai eficientă metodă de a controla răspândirea VHB. Vaccinul aflat în mod curent pe piață este bazat pe proteina S de anvelopă a VHB produsă în drojdii și a condus la o scădere semnificativă a ratei de infecție cu VHB. Cu toate acestea, zonele cu prevalența cea mai ridicată de infecții sunt adesea mai puțin dezvoltate din punct de vedere economic și nu dispun de infrastructura necesară transportului și stocării vaccinului la rece. În plus, 5-10% din persoanele vaccinate nu dezvoltă titru protector și studii recente au arătat o pierdere a titrului protector indus de imunizarea cu vaccinul bazat pe proteina S, la 10-15 ani post-vaccinare. O altă problemă este apariția de virusuri cu mutații de rezistență la vaccin, ce nu pot fi recunoscute de către anticorpii anti-S induși de vaccinul actual, indicând necesitatea dezvoltării de vaccinuri alternative, mai imunogene.

Având în vedere aceste aspecte, scopul acestui studiu a fost dezvoltarea unui concept nou pentru producerea de antigene VHB cu imunogenicitate ridicată precum și expresia acestora atât în celulele mamaliene cât și în plante, ca o alternativă cu costuri scăzute de producție a antigenelor pentru vaccin. Proteina S ce stă la baza vaccinului aflat în mod curent pe piață are o proprietate particulară, și anume faptul că se poate autoasambla în particule subvirale cu imunogenicitate ridicată. Această proprietate intrinsecă a fost folosită pentru obținerea de antigene chimerice S/preS1, prin inserarea de epitopi imunogeni din regiunea preS1 a proteinei L de anvelopă, regiune implicată în interacția virusului cu receptorul de internalizare, în bucla antigenică a proteinei S, asigurând astfel expunerea ambilor epitopi către sistemul imun.

Pe lângă expresia în celulele mamaliene, am vrut să testăm și posibilitatea utilizării plantelor ca sistem de expresie. Un dezavantaj major al producției de glicoproteine în plante, cum ar fi *N. benthamiana*, este tiparul diferit de glicozilare dintre celulele mamaliene și plante, ce poate afecta proprietățile antigenice ale proteinelor exprimate în acest sistem. În plus, acești glicani specifici plantelor pot fi puternic imunogeni sau induce reacții alergice la oameni. Proteina S de anvelopă

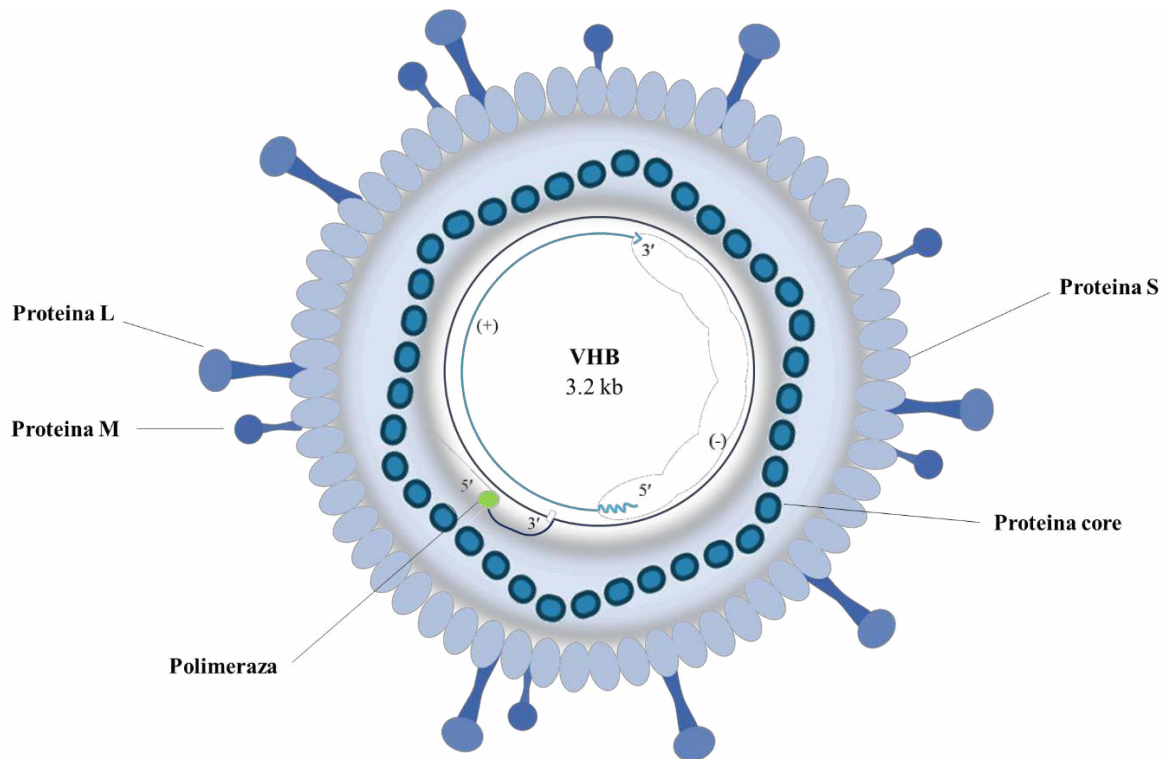
are un singur situs de glicozilare în poziția Asn146, ce se află în regiunea antigenică și este ocupat în doar 50% din cazuri în mod fiziologic, fiind implicat în modularea răspunsului imun.

Astfel, un al doilea scop al studiului a fost expresia antigenelor chimerice într-o nouă linie de *N. benthamiana* cu tipar de N-glicozilare “umanizat” prin CRISPR/Cas9, proces ce a implicat eliminarea genelor ce codifică  $\beta$ -1,2-xiloza și  $\alpha$ -1,3-fucoza (*N. benthamiana* FX-KO), și analiza impactului N-glicozilării asupra antigenicității proteinelor chimerice candidat. Ulterior, s-au caracterizat și proprietățile imunologice ale antigenului obținut în cele două linii și capacitatea de neutralizare a anticorpilor induși față de VHB WT și cu mutații de rezistență la vaccin.

## Capitol 1. Introducere

VHB este un virus ADN anvelopat cu genom parțial dublu catenar, membru al familiei *Hepadnaviridae* din genul *Orthohepadonavirus* de virusuri. Particulele virale au formă sferică, cu diametru de 42 nm, numite și particule Dane, și sunt formate dintr-o anvelopă lipidică constituită din cele trei antigene virale de suprafață, S (small), M (medium) și L (large), ce înconjoară o capsidă icosaedrică cu diametru de 30 nm ce înglobează genomul viral (Figura 1). Genomul viral este reprezentat de un ADN relaxat circular (ADNrc) parțial dublu-catenar de aproximativ 3.2 kilobaze (kb) cu o catenă sens incompletă (catena +) și o catenă antisens completă (catena -) ce codifică șapte proteine virale: polimeraza virală, proteina de capsidă (core) și derivați precum antigenul HBe, proteina HBx și cele trei proteine de anvelopă, acestea fiind sintetizate de la trei codoni start alternativi (Figura 1).

În afară de particulele virale infecțioase, VHB induce și secreția de particule subvirale (SVPs) ce nu conțin nucleocapsidă și sunt neinfecțioase. Unele date arată ca acestea se pot secreta chiar de 10.000 de ori mai mult decât virionii, considerându-se a fi un mecanism utilizat de virus pentru a evada sistemul imun (Hu and Liu, 2017).



**Figura 1. Reprezentarea schematică a structurii VHB.** VHB este un virus ADN anvelopat, a cărui anvelopă este formată dintr-un bistrat lipidic în care sunt inserate proteinele virale de anvelopă (S, M și L). Genomul viral, reprezentat de un ADN parțial dublu catenar este înconjurat de o capsidă formată din proteina core. ADN viral conține atașat covalent la capătul 5' al catenei antisens (-) polimeraza virală.

Toate cele trei proteine de anvelopă conțin domeniul S (226 aminoacizi) în capătul C-terminal, proteinele M și L fiind extinse în N-terminal cu domeniul preS2 (55 aminoacizi) în cazul proteinei M și cu domeniul preS2 și preS1 (108/119 aminoacizi în funcție de genotip) în cazul proteinei L. Domeniul S conține patru domenii transmembranare cu o buclă antigenică expusă la suprafața particulelor virale/subvirale ce conține determinantul "a", un domeniu antigenic ce este ținta majoritară a anticorpilor neutralizanți (Carman et al., 1990). Conformația acestui determinant este extrem de importantă pentru recunoaștere, aceasta fiind stabilizată de punți disulfurice. În plus, proteina S conține și un situs de glicozilare în poziția Asn146 ce este ocupat doar în 50% din cazuri în condiții fiziologice și joacă un rol în modularea răspunsului imun față de VHB. O proprietate importantă a acesteia este capacitatea de autoasamblare în particule subvirale imunogene, ce se secretă în număr mult mai mare comparativ cu virionii.

Proteina L este de asemenea extrem de importantă, deoarece domeniul preS1 al proteinei L conține determinanții majori pentru infectivitate. Regiunea 2-48 de aminoacizi din domeniul N-terminal al regiunii preS1 sunt esențiali pentru interacția cu receptorul de internalizare viral, și anume receptorul NTCP (Sankhyan et al., 2016).

Ciclul de viață al VHB începe cu atașarea particulelor virale la heparansulfat proteoglicanii aflați pe membrana hepatocitelor ce facilitează steric interacția domeniului preS1 al proteinei L cu receptorul NTCP aflat pe membrana latero-bazală a hepatocitelor (Yan et al., 2012). Recent a fost identificat și un co-factor implicat în internalizare, și anume receptorul pentru factor de creștere epidermal (EGFR), ce formează un complex cu VHB și NTCP ce mediază intrarea virusului în celulă (Iwamoto et al., 2019). Virusul este apoi internalizat prin endocitoză dependentă de clatrină (Herrscher et al., 2020; Huang et al., 2012) și caveolină (Macovei et al., 2010). Nucleocapsida este apoi transportată către nucleu cu ajutorul rețelei de microtubuli unde nucleocapsida se dezassemblează, eliberând atât ADNrc cât și subunități ale proteinei core în nucleul hepatocitului. În nucleu, ADNrc trece printr-o serie de etape biochimice mediate de factori din celula gazdă pentru a fi convertit la ADN covalent circular închis (ADNccc – *covalently closed circular*), ce va servi ulterior drept matriță pentru replicarea VHB (Nassal, 2015). Odată format, ADNccc se va organiza sub formă de minicromozomi virali foarte stabili, ce constituie un rezervor pentru persistența virusului în hepatocite (Allweiss and Dandri, 2017). ADNccc este apoi folosit drept matriță pentru transcrierea celor 4 transcripti de ARNm viral (3.5 kb, 2.4 kb, 2.1 kb și 0.7 kb), cu ajutorul ARN-polimerazei II din celula gazdă. Transcriptiile sunt apoi translocați către citosol, unde va avea loc translația și sinteza proteică. Se va iniția apoi formarea capsidului viral prin asamblarea proteinei de capsidă și împachetarea ARNpg și a polimerazei virale. În interiorul capsidului, polimeraza va iniția sinteza celor două catene de ADN viral, ducând la formarea de ADNrc (Tong and Revill, 2016). Nucleocapsidul nou format ce conține ADNrc va urma două căi: o parte vor fi transportate înapoi la nucleu pentru a menține constantă încărcătura de ADNccc, în timp ce majoritatea nucleocapsidelor vor fi anvelopate și secretate. Pentru anvelopare, domeniul citoplasmatic al regiunii preS1 și S a proteinelor de anvelopă aflate în membrana corpurilor multiveziculari (MVB) va face contact cu nucleocapsida și va induce ordonarea proteinelor de anvelopă într-o formațiune cu grad înalt de împachetare, astfel facilitând procesul de înmugurire internă (Watanabe et al., 2007). Acestea sunt apoi sortate în



complexele ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), urmând a fi ulterior secretate. Pe lângă virioni se vor secreta și particule subvirale lipsite de genom și formate majoritar din proteina S, nucleocapside neanvelopate, precum și antigenul HBe.

Terapiile aprobate în mod curent pentru tratamentul infecțiilor cronice cu VHB sunt interferon  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) sau analogi de nucleotide/nucleozide (NUCs). IFN- $\alpha$  inhibă direct replicarea ADN viral prin regularea indirectă a răspunsului imun al gazdei (Allweiss and Dandri, 2017; Dill et al., 2014). Tratamentul cu IFN- $\alpha$  duce la scăderea viremiei și la creșterea titrului de anticorpi anti-HBs și -HBe dar este adesea asociat cu efecte secundare sistemice și contraindicații. Analogii de nucleotide/nucleozide sunt cel mai des folosite pentru tratamentul VHB și funcționează prin blocarea activității revers transcriptazei, reducând astfel replicarea virală. Deși tratamentul cu aceste medicamente scade semnificativ replicarea virală, nu induce eliminarea completă a virusului din hepatocite, necesitând administrare pe toată durata vieții. În plus, tratamentul de lungă durată poate duce la selecția de mutații ce conferă rezistență la tratament (Lok et al., 2016). Noile generații de medicamente aflate în mod curent în dezvoltare se concentrează pe găsirea unei modalități de a eradica ADNccc din hepatocite, în vederea obținerii unei vindecări complete. Acești compuși pot fi împărțiți în două categorii: (1) compuși care interferă direct cu ciclul de viață viral și (2) imuno-modulatori care țintesc reactivarea răspunsului imun (Sandmann and Cornberg, 2021) cu rezultate promițătoare în studii clinice incipiente.

Primul vaccin împotriva VHB a apărut în 1982 și se baza pe particule subvirale formate din proteina S de anvelopă purificate din serul inactivat al pacienților purtători de VHB. Acest vaccin s-a dovedit să aibă eficacitate ridicată însă era dificil de produs și costisitor. Pentru a adresa aceste dezavantaje, următoarea generație de vaccinuri, apărute în 1986, a fost bazată pe antigenul HBs recombinant produs și purificat din drojdiile (*Saccharomyces cerevisiae*) (Kim, 2009). Acest vaccin este utilizat până în prezent și a dus la o scădere semnificativă a numărului de infecții la nivel global, inducând un titru protector de anticorpi la peste 90% din recipienți (Rubin et al., 2014). Cu toate acestea, costurile ridicate, necesitatea imunizării cu 3 doze ce trebuie injectate intramuscular și a infrastructurii pentru transport și depozitare la rece, reprezintă o barieră economică pentru programele de vaccinare în țări mai puțin dezvoltate ce adesea au și cea mai mare prevalență a infecțiilor cu VHB (Gerlich, 2017).

Cu toate că eficacitatea acestui vaccin este foarte bine caracterizată, longevitatea răspunsului imun indus a fost recent pusă sub semnul întrebării. Studiile au arătat că indivizii vaccinați la naștere își pot pierde titrul protector de anticorpi la 10-15 ani post-vaccinare. În plus, 5-10% din populație nu dezvoltă un răspuns imun suficient de puternic în urma vaccinării, datorită unei multitudini de factori precum vârsta, sexul, nivelul de obezitate, statutul de fumător sau prezența unor alte afecțiuni cronice precum diabet și boli renale sau un sistem imun compromis datorită unei infecții cu virusul imunodeficienței umane (HIV). De asemenea, chiar și persoanele ce au dezvoltat un titru protector de anticorpi ar putea fi susceptibile la infecția cu variante de VHB ce conțin mutații în determinantul antigenic major al proteinei S de anvelopă ce împiedică recunoașterea virusului de către anticorpii anti-S induși de vaccin (Bian et al., 2013; Lai et al., 2012).

Așadar, este necesară dezvoltarea de antigene VHB cu imunogenicitate mai ridicată pentru a putea induce un răspuns imun protector în indivizii ce nu răspund la vaccinurile bazate pe proteina S aflate pe piață și pentru a mitiga pericolul răspândirii variantelor de VHB cu mutații rezistente la vaccin. În acest sens, a treia generație de vaccinuri anti-VHB conțin, pe lângă antigenul S, și proteinele L și M de anvelopă. Recent, Agenția pentru Alimente și Medicamente din America (FDA – Food and Drug Administration) a aprobat utilizarea unui nou vaccin anti-VHB ce încorporează toate cele 3 proteine de anvelopă și este produs în celule mamaliene și ce s-a dovedit a induce un răspuns imun puternic chiar și în pacienții ce nu răspund la vaccinul clasic (Vesikari et al., 2021a; Vesikari et al., 2021b).

Proteina L de anvelopă prezintă un interes aparte în vederea dezvoltării de antigene mai imunogene, deoarece regiunea N-terminală a domeniului preS1 este implicată în atașarea VHB la hepatocite și internalizarea acestuia prin interacția cu receptorul NTCP. În plus, un studiu recent realizat a demonstrat că proteina L poate induce anticorpi neutralizanți și față de variante de VHB cu mutații la nivelul determinantului antigenic, ce nu sunt afectate de anticorpii induși de vaccinuri bazate pe proteina S (Washizaki et al., 2022). Un dezavantaj major al vaccinurilor ce conțin doar proteina L este faptul că aceasta nu se autoasamblează în particule subvirale sferice, ducând la un răspuns imun mai slab deoarece nu permite expunerea epitopilor către sistemul imun (Bian et al., 2017). O strategie alternativă este realizarea de antigene chimerice, ce profită de capacitatea proteinei S de a se autoasambla în particule subvirale, permițând astfel expunerea epitopilor relevanți din regiunea preS1. O astfel de strategie a fost utilizată pentru

dezvoltarea antigenului chimeric S/preS1<sup>21-47</sup> în cadrul grupului nostru, ce conținea secvența 21-47 de aminoacizi din regiunea preS1 a proteinei L (genotipul D) inserată între aminoacizii 126/127 din bucla antigenică a proteinei S (Dobrica et al., 2017). Acest antigen a indus un răspuns imun umoral și celular superior celui indus de vaccinarea cu proteina S, indicând că o astfel de strategie este promițătoare pentru dezvoltarea de noi vaccinuri alternative.

## **Utilizarea plantelor ca sistem alternativ de producție a antigenelor VHB**

Plantele au fost explorate în ultimele decenii ca fabrici verzi pentru sinteza de diferiți produși biofarmaceutici, proteine cu valoare importantă în domeniul medical dar și vaccinuri destinate atât animalelor cât și oamenilor. Plantele sunt organisme eukariote, astfel permit modificări post-tranlaționale ale proteinelor exprimate, lucru extrem de important pentru producția de vaccinuri în plante, întrucât modificări complexe cum ar fi N- sau O-glicozilarea specifică plantelor pot afecta imunogenicitatea antigenelor recombinante comparativ cu cele produse în celule mamaliene. În plus, s-a arătat că plantele pot realiza procesarea proteinelor virale transmembranare complexe și susține oligomerizarea lor în particule asemănătoare cu virusul cu imunogenicitate îmbunătățită. Totodată, componente ale plantelor ce se asociază adesea cu aceste particule tind să funcționeze drept adjuvant, îmbunătățind imunogenicitatea vaccinului produs. Producția de astfel de vaccinuri în plante are ca avantaj costul și timp mai scăzut de producție, ușurința scalării procesului precum și riscul scăzut de contaminare datorită absenței patogenilor umani sau mamalieni.

Expresia de proteine heterologe în plante poate fi atât tranzientă cât și stabilă, genele ce codifică proteinele de interes fiind introduse la nivel nuclear respectiv la nivelul cloroplastelor. Introducerea genelor de interes are loc cel mai frecvent prin intermediul transfecției cu *Agrobacterium tumefaciens*. Se pot folosi de asemenea vectori virali pentru a introduce gene ce codifică pentru proteine heterologe în genomul plantelor. Având în vedere complexitatea procesului de pliere a antigenului HBs, expresia acestuia în plante (*Nicotiana tabacum*) și confirmarea faptului că acesta se assemblează în particule subvirale a fost considerată o descoperire extrem de importantă în domeniul agriculturii moleculare. Mai mult decât atât, imunizarea cu antigenul produs în plante și purificat a indus un răspuns imun specific la nivelul limfocitelor B și T în șoareci, demonstrând viabilitatea aceste strategii de producție a antigenelor VHB în plante. Ulterior, antigenul HBs a fost produs în multiple specii de plante (Pantazica et

al., 2021). Cu toate acestea, niciun vaccin anti-VHB produs în plante nu a fost încă dezvoltat, deși potențialul ridicat al utilizării unor astfel de platforme pentru producția de antigene destinate dezvoltării de vaccinuri este ilustrat de aprobarea recentă a unui vaccin produs în plante împotriva COVID-19 pentru adulți în Canada. Acesta este primul vaccin produs în plante autorizat pentru uz la oameni la nivel global (National Advisory Committee on Immunization, 2022).

N-glicozilarea reprezintă una dintre cele mai conservate căi de modificare post-translațională a proteinelor în celule eukariote, jucând un rol crucial în proprietățile și funcțiile proteinelor. Deși pașii de maturare a N-glicanilor sunt similari între celule de plante și celule mamaliene, plantele sintetizează N-glicani ce conțin  $\beta$ -1,2-xiloză și  $\alpha$ -1,3-fucoză și nu conțin acid sialic și  $\alpha$ -1,6-fucoză, ce sunt specifice celulelor mamaliene (Schoberer and Strasser, 2018). În plus, studiile au arătat că N-glicanii specifici plantelor pot fi imunogeni sau induce alergii, indicând că administrarea acestora pe termen lung ar putea prezenta un risc pentru sănătatea oamenilor. Astfel, un interes deosebit a fost acordat găsirii de metode pentru a “umaniza” glicanii din plante. Recent s-a utilizat o metodă bazată pe tehnologia CRISPR/Cas9 pentru a genera linii de *N. benthamiana* lipsite de activitatea  $\beta$ -1,2-xiloziltransferazei și a  $\alpha$ -1,3-fucoziltransferazei (FX-KO) (Jansing et al., 2019). Această linie a fost utilizată ulterior pentru producția de anticorpi umani monoclonali, demonstrându-se că aceștia sunt lipsiți de N-glicanii tipici plantelor și că au activitate similară cu anticorpii produși în celule mamaliene (Frigerio et al., 2022; Jansing et al., 2019). Cu toate acestea, linia FX-KO nu a fost încă folosită pentru expresia de proteine recombinante și efectul “umanizării” tiparului de N-glicozilare asupra proprietăților sau imunogenității antigenelor recombinante produse în astfel de plante nu a fost investigat.

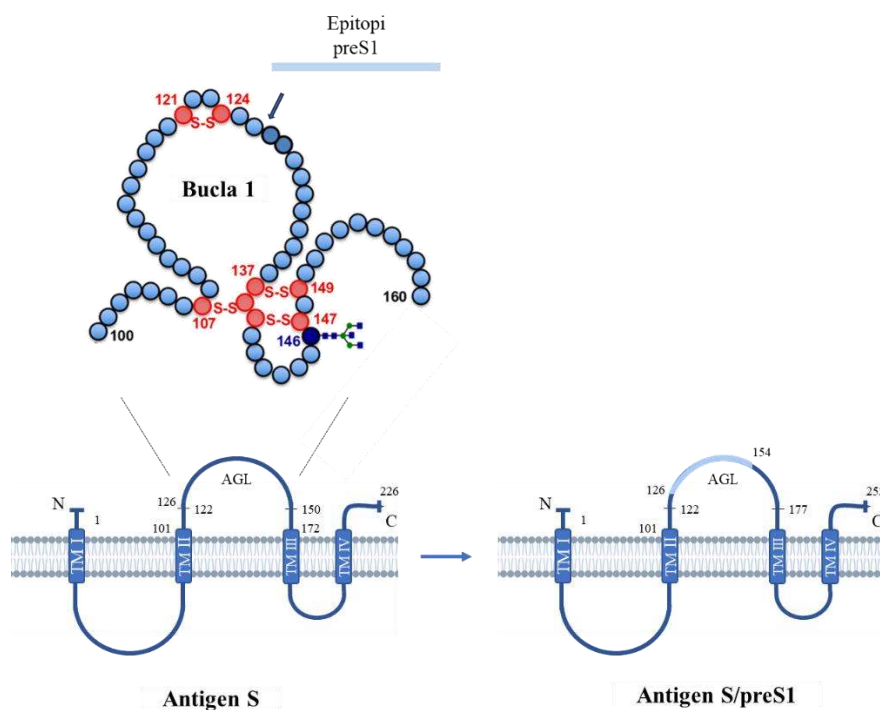
Antigenele VHB precum antigenul S și proteinele chimerice derivate din acesta sunt un model ideal pentru investigarea influenței N-glicozilării asupra antigenității, întrucât aceste proteine au un singur N-glican în domeniul antigenic iar datele de literatură au arătat că acesta joacă un rol important în modularea și evadarea răspunsului imun (Dobrica et al., 2020). Astfel, orice modificare a acestui glican poate influența proprietățile antigenice ale proteinei S.

### **Antigenele propuse**

Grupul nostru a dezvoltat anterior o strategie nouă de construcție a unor antigene chimerice, ce folosește proprietatea proteinei S de anvelopă de a se asambla în particule subvirale. Astfel,

regiunea 21-47 de aminoacizi din domeniul preS1 a fost inserată în bucla antigenică a proteinei S pentru a forma un antigen chimeric S/preS1<sup>21-47</sup> ce a fost exprimat atât în celule mamaliene cât și în plante (Dobrica et al., 2017). Cu toate că acest antigen s-a dovedit a induce un răspuns imun mai puternic decât imunizarea cu antigenul S, problemele legate de expresia și secreția acestuia ar împiedica producția la scală largă.

Așadar, scopul acestui studiu a fost optimizarea designului antigenelor chimerice prin inserare de regiuni parțial suprapuse din domeniul preS1 extinse spre N-terminal față de domeniul inserat anterior, în vederea obținerii unui antigen chimeric cu proprietăți moleculare și imunologice superioare (Figura 2). Astfel, folosind tehnici de biologie moleculară, regiunile 10-36, 16-42 și 16-47 de aminoacizi din regiunea N-terminală a domeniului preS1 (genotip D) au fost inserate între aminoacizii 126/127 ai buclei antigenice a proteinei S, sau între aminoacizii 126-132 în cazul regiunii 16-47 de aminoacizi, pentru a compensa lungimea crescută a acestuia.



**Figura 1.8. Reprezentare schematică a designului antigenelor chimerice S/preS1**  
Epitopii din domeniul N-terminal al regiunii preS1 din proteina L au fost inserați între aminoacizii 126/127 din bucla antigenică a proteinei S sau între 126-132 în cazul constructului  $S\Delta^{127-131}/preS1^{16-47}$  pentru a compensa lungimea lui

## Capitolul 2. MATERIALE ȘI METODE

Antigenele VHB propuse au fost exprimate în celule mamaliene HEK293T și în plante *N. benthamiana* fie de tip sălbatic (WT) fie cu tipar ”umanizat” de glicozilare (FX-KO). Antigenele au fost apoi caracterizate din punct de vedere structural și molecular determinându-se capacitatea de pliere și dimerizare, N-glicozilarea, capacitatea de expresie și secreție și antigenicitatea. Candidatul cu cele mai avantajoase proprietăți a fost apoi purificat și utilizat pentru studii imunologice în șoareci BALB/c. S-a analizat apoi răspunsul imun umoral prin cuantificarea titrului de anticorpi IgG precum și răspunsul imun celular prin determinarea secreției de citokine de către splenocite. În final anticorpii induși de imunizarea cu antigenul chimeric au fost caracterizați prin analiza interacției lor cu diferiți epitopi virali și s-a determinat capacitatea lor de neutralizare a infecției cu VHB de tip sălbatic și cu mutații de rezistență la vaccin într-un sistem *in vitro* de infecție bazat pe celulele HepG2<sup>hNTCP</sup>.

## Capitol 3. REZULTATE

Construcția antigenelor VHB chimerice s-a bazat pe strategia utilizată anterior (Dobrica et al., 2017), ce a implicat inserția secvenței de aminoacizi 21-47 din regiunea preS1 a proteinei L (genotip D) în bucla antigenică a proteinei S, mai precis între aminoacizii 126 și 127, situs ce s-a arătat în trecut a fi tolerant pentru inserția de epitopi străini. Astfel, în urma alinierii secvențelor preS1 din cele mai prevalente izolatele de VHB s-au ales regiunile 10-36, 16-42 și 16-47 (genotip D), ce sunt parțial suprapuse cu chimera S/preS1<sup>21-47</sup>, fiind extinse spre capătul N-terminal prin adăugarea de aminoacizi conservați. Deoarece unul dintre construcții avea o lungime mai mare de 27 aminoacizi (constructul S/preS1<sup>16-47</sup>), s-a realizat și un construct în care aminoacizii 127-131 din proteina S au fost înlăturați prin deleție pentru a compensa lungimea suplimentară a regiunii preS1 introduse. Antigenele au fost obținute prin mutageneză direcționată prin PCR și primeri specifici.

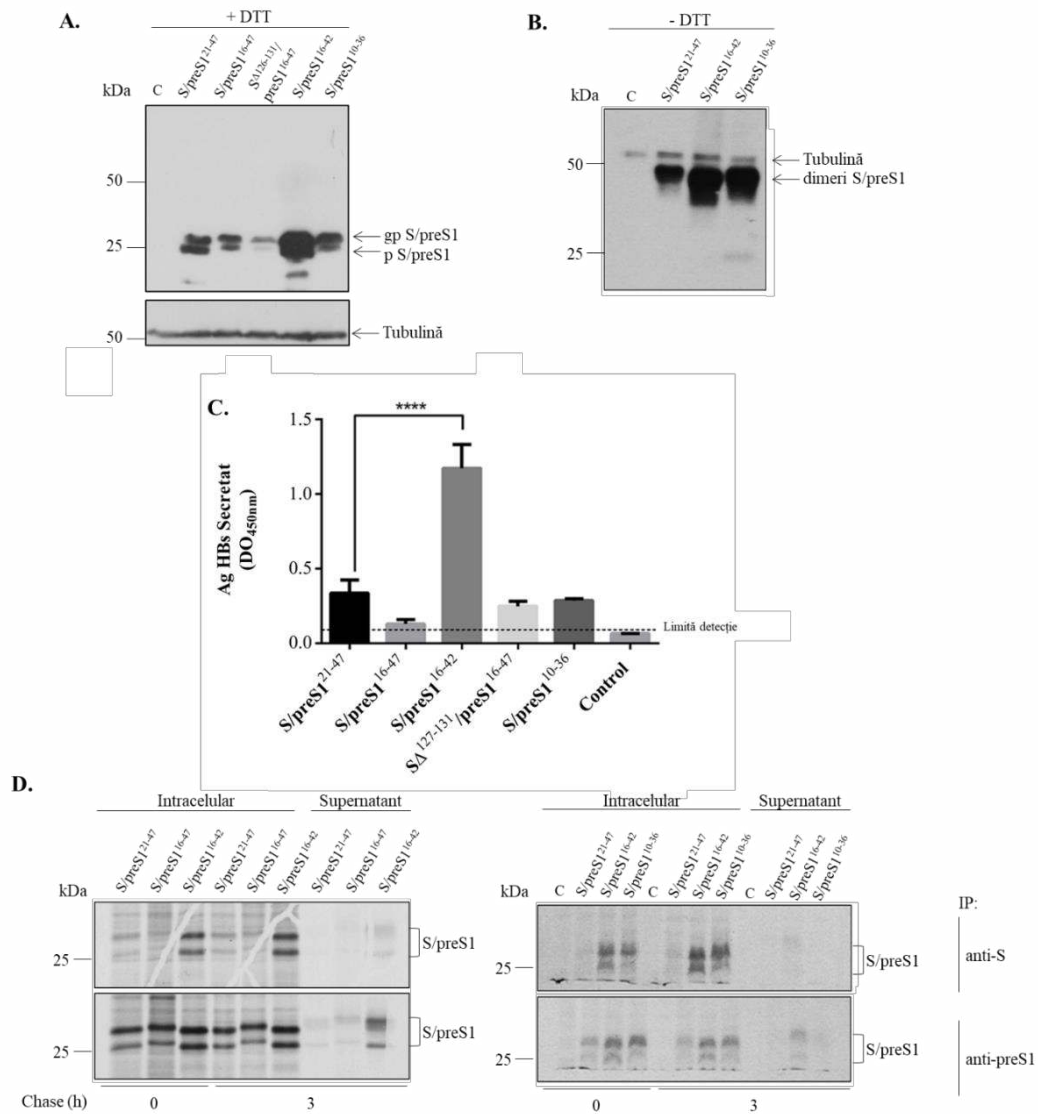
Caracterizarea moleculară și structurală a antigenelor chimerice nou obținute a fost realizată prin transfecția tranzientă în celule HEK293T. Analiza expresiei prin western-blot a arătat că antigenul S/preS1<sup>16-42</sup> are cel mai mare nivel de expresie, chiar și comparat cu S/preS1<sup>21-47</sup> (Figura 3A, B). Inserția unei secvențe mai lungi (32 aminoacizi) din regiunea preS1 a rezultat într-o expresie mult scăzută, după cum se poate vedea în cazul proteinelor S/preS1<sup>16-47</sup> și S $\Delta$ <sup>127-131</sup>/preS1<sup>16-47</sup>, confirmând că acest situs de inserție nu poate acomoda epitopi de lungime foarte

mare fără a afecta proprietățile proteinei. Totodată, inserția aceluiași epitop într-o buclă antigenică mai scurtă s-a dovedit a fi detrimentală pentru expresia antigenului  $S\Delta^{127-131}/preS1^{16-47}$ , sugerând că această deleție ar putea afecta plierea și implicit stabilitatea proteinei (Figura 3A). Această analiză a arătat de asemenea modificarea post-tranlațională a antigenelor prin prezența benzii corespunzătoare proteinelor glicozilate și dimerilor.

În continuare s-a analizat și capacitatea de secreție a noilor chimere comparativ cu antigenul  $S/preS1^{21-47}$  prin ELISA. Analiza a arătat o acumulare semnificativ mai mare a antigenului  $S/preS1^{16-42}$  comparativ cu celelalte proteine chimere testate (Figura 3C).

Întrucât această diferență de secreție se poate datora și unei modificări a domeniului antigenic al proteinei S, împiedicând astfel recunoașterea de către anticorpii conformaționali, s-au realizat și experimente de pulse-chase și imunoprecipitare pentru a determina influența secvențelor inserate asupra structurii, sintezei și secreției proteinelor chimere. S-a arătat că proteina  $S/preS1^{16-42}$  este recunoscută atât de anticorpi anti-S cât și de anticorpi anti- $preS1$  și are cel mai ridicat nivel de expresie dintre antigenele testate. Aceste date indică că secvența 16-42 este bine tolerată de bucla antigenică, fiind expusă corespunzător pentru recunoaștere de către anticorpii anti- $preS1$  dar neafectând integritatea domeniului antigenic al proteinei S (Figura 3D).

Având în vedere toate datele obținute, antigenul  $S/preS1^{16-42}$  a fost selectat mai departe drept candidat pentru studii imunologice și produs la scală largă urmând a fi purificat pe baza proprietății de a se autoasambla în particule subvirale. Astfel, antigenele au fost separate prin ultracentrifugare în gradient de densitate de sucroză și prin cromatografie de excludere de masă folosind rășina CaptoCore 400. Antigenele cuantificate și purificate au fost utilizate pentru imunizare prin injecție intramusculară în șoareci BALB/c. Analiza răspunsului imun umoral și celular a arătat că antigenul  $S/preS1^{16-42}$  are proprietăți imunologice îmbunătățite comparativ cu antigenul S. În plus, caracterizarea anticorpilor induși a arătat că antigenul chimeric induce atât anticorpi anti-S cât și anti- $preS1$ , demonstrând expunerea corespunzătoare a ambilor epitopi pe suprafața particulelor subvirale.



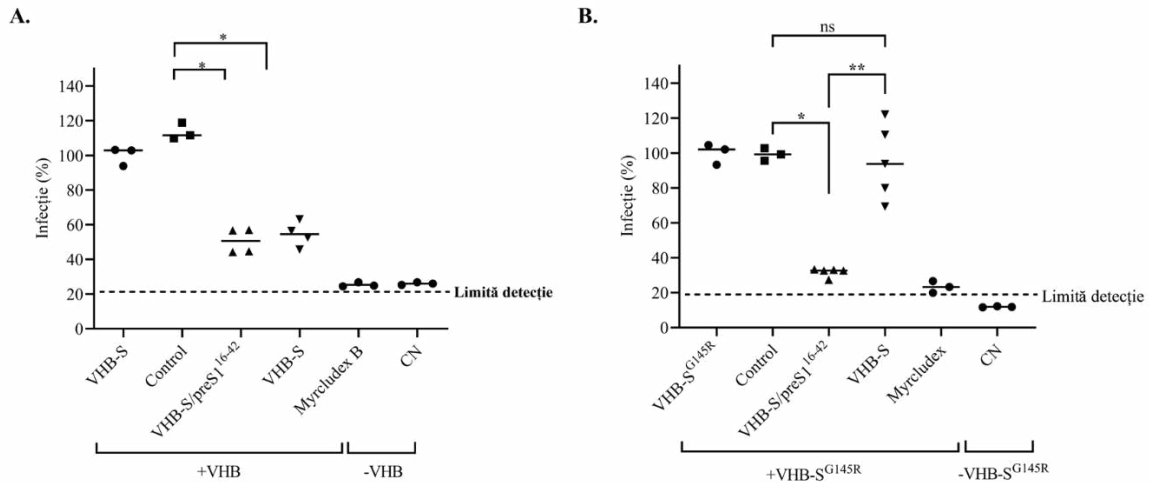
**Figura 3. Expresia și caracterizarea noilor antigene VHB chimerice în celule mamaliene.** Celulele HEK293T au fost transfectate cu plasmide pCi ce codifică antigenele indicate sau plasmid gol drept control (C). Lizatele celulare au fost analizate prin western blot în condiții reducătoare (+DTT) (**A**) sau nereducătoare (-DTT) (**B**). Anticorpi anti-preS1 au fost utilizați pentru detecția proteinelor S/preS1 glicozilate (gp) sau neglicozilate (p) precum și dimerii formați. (**C**) Mediul celular a fost recoltat la 72 h post-transfecție și secreția de antigen HBs a fost cuantificată prin ELISA măsurând densitatea optică (DO) la 450 nm. (**D**) La 24 h post-transfecție celulele au fost marcate cu <sup>35</sup>S timp de 30 minute și apoi lăsate în cultură încă 3 h post-marcare (chase). Lizatele și supernatantele au fost



imunoprecipitate cu anticorpi anti-S și anti-preS1 și separate prin SDS-PAGE urmat de vizualizare prin autoradiografie. Imagine adaptată după (Pantazica et al., 2022).

Pentru a determina capacitatea anticorpilor generați de imunizarea cu VHB-S și -S/preS1<sup>16-42</sup> de a proteja împotriva infecției cu VHB, s-au realizat experimente de neutralizare într-un sistem *in vitro* de infecție. S-a observat că imunizarea cu ambele antigene a inhibat în mod specific infecția cu VHB, comparativ cu grupurile control (Figura 4A). Mai mult decât atât, capacitatea de neutralizare a serurilor obținute în urma imunizării cu S/preS1<sup>16-42</sup> este mai bună comparativ cu S, însă diferența dintre cele două grupuri nu a fost semnificativ statistică. Pentru a determina capacitatea antiserurilor de a neutraliza variante de VHB cu mutații de rezistență la vaccin, s-a introdus mutația cu cea mai mare prevalență în clinică, G145R, prin mutageneză direcționată (Bian et al., 2013). Particulele VHB-S<sup>G145R</sup> astfel obținute au fost produse în celule Huh7, purificate și caracterizate din punct de vedere al secreției, infectivității și capacității de recunoaștere față de anticorpi anti-S conformaționali. În final, s-a determinat capacitatea de neutralizare a antiserurilor față de acest virus mutant. Datele au arătat că serul obținut de la șoriceii imunizați cu S/preS1<sup>16-42</sup> a inhibat semnificativ infecția cu VHB-S<sup>G145R</sup>, la nivel similar cu cel obținut în urma tratamentului cu Myrcludex B, un inhibitor specific al infecției cu VHB (Figura 4B). În cazul serului de la șoriceii imunizați cu S se observă un răspuns mai heterogen, dar fără o capacitate semnificativă de neutralizare față de VHB-S<sup>G145R</sup> comparativ cu grupul control.

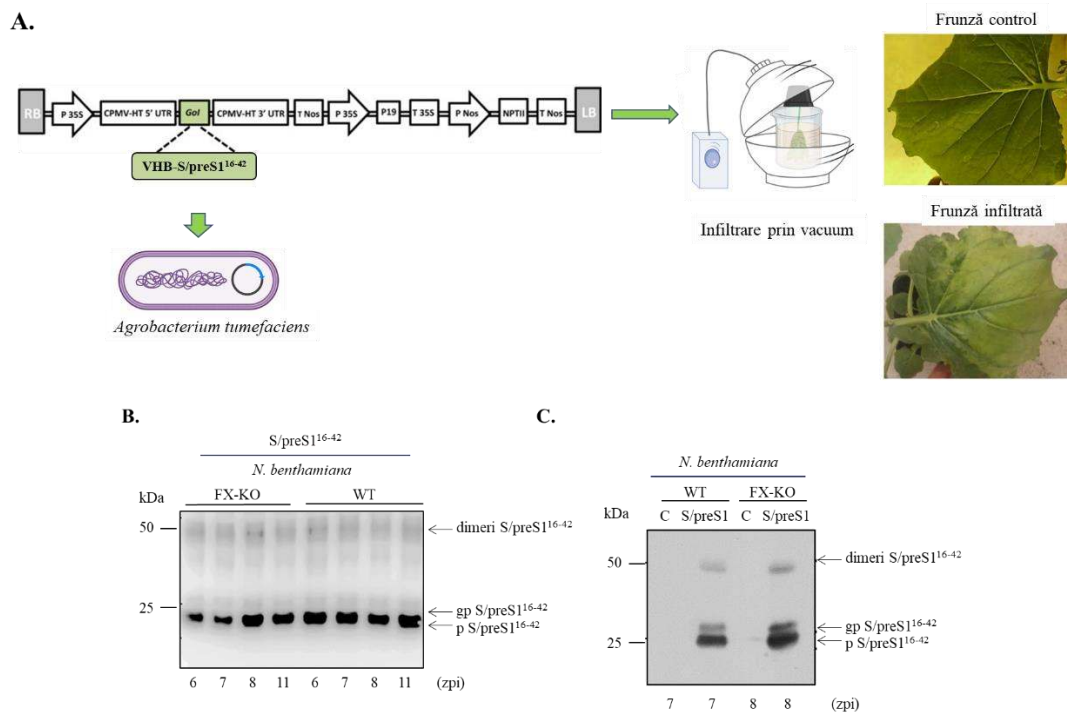
În concluzie, datele au arătat că combinarea de epitopi S și preS1 relevanți într-o singură moleculă este o strategie promițătoare pentru a îmbunătăți răspunsul imun și implicit eficiența vaccinării împotriva VHB la pacienții ce nu răspund la vaccinul actual. Mai mult decât atât, această strategie permite dezvoltarea unui vaccin cu eficiență ridicată și față de variantele de VHB cu mutații de rezistență la vaccin. Cu toate acestea, producția în celule mamaliene este costisitoare, astfel încât următorul pas a fost testarea unor sisteme alternative de producție precum plantele. În plus, am vrut să investigăm posibilitatea producției acestui antigen în plante cu tipar de glicozilare “umanizat” pentru a vedea efectul N-glicozilării asupra antigenității și capacității de a activa sistemul imun și induce anticorpi neutralizanți.



**Figura 4. Capacitatea de neutralizare a infecției cu VHB a anticorpilor induși de imunizarea cu S și S/preS1<sup>16-42</sup>.** Serurile pre-umune reunite sau de la șoareci imunizați cu S, S/preS1<sup>16-42</sup> sau proteine control (control) au fost diluate și pre-incubate cu VHB sau VHB-S<sup>G145R</sup> (100 EqG/celulă). Celulele HepG2<sup>hNTCP</sup> au fost incubate cu inoculul VHB tratat cu ser sau au fost menținute neinfectate, drept control negativ (CN). Celulele incubate cu Myrcludex B timp de 3 ore înainte de infectare au fost utilizate drept control pentru specificitatea inhibării infecției cu VHB. Mediile celulare au fost colectate în ziua 11 post-infecție și utilizate pentru a cuantifica nivelul de antigen HBe prin ELISA. Datele sunt prezentate ca procent de infecție cu VHB în prezența serurilor post-umune din valorile de infecție obținute în prezența serurilor pre-umune, la aceeași diluție (n=4). Valorile în prezența Myrcludex B și în controlul negativ reprezintă procente de infecție din probele infectate doar cu VHB (n=4) (\*, p < 0,05). Imagine adaptată după (Pantazica et al., 2022).

Posibilitatea producției noului antigen în *N. benthamiana* a fost determinată folosind linia WT, precum și o nouă linie ediatată prin CRISPR/Cas9 cu knockout a două gene pentru 1,2-xiloziltransferază și patru gene pentru  $\alpha$ -1,3-fucoziltransferază (Jansing et al., 2019) (Figura 5A). Expresia antigenului VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> a fost testată inițial în plante WT prin transformare tranzientă cu plasmidul corespunzător. Datele au arătat că atât forma glicozilată (gp) cât și cea neglicozilată (p) a antigenului chimeric sunt exprimate în extractele de plante. Similar cu linia WT, linia FX-KO a fost capabilă să producă antigenul VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> (Figura 5B, C). În urma cuantificării cantității de antigen obținute pentru fiecare linie s-a arătat că nivelul mediu

de expresie al antigenului chimeric VHB este de aproximativ 200  $\mu\text{g/g}$  țesut vegetal proaspăt. Aceste valori sunt semnificativ mai mari decât cantitățile obținute anterior în literatură pentru producția de antigen HBs prin agroinfiltrare în diferite plante gazdă (Pniewski, 2013) și similare cu cele obținute cu ajutorul unor sisteme de expresie bazate pe vectori virali pentru plante (Huang et al., 2008). În plus, separarea antigenului pe gradient de sucroză a arătat că antigenul produs în ambele sisteme de plante se poate asambla în particule subvirale.



**Figura 5. Expresia antigenului VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> în *N. benthamiana*.** (A) Reprezentare schematică a protocolului de producție a antigenelor VHB în *N. benthamiana*. (B) Frunze de *N. benthamiana* WT și FX-KO ce exprimă VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> recoltate la timpii indicați au fost lizate și analizate prin western blot folosind anticorpi anti-preS1. (C) Lizate de frunze *N. benthamiana* WT (7 zpi) și FX-KO (8 zpi) sau frunze control ce exprimă proteină nerelevantă (7 zpi) au fost analizate prin western blot folosind anticorpi anti-preS1. Imagine preluată din (Pantazica et al., 2023).

Pentru purificare, lizatele de *N. benthamiana* WT și FX-KO ce exprimă VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> au fost inițial concentrate prin ultracentrifugare pe pat de 20% sucroză, urmat de fracționare via gradient de sucroză 15-60%. Frațiile pozitive au fost reunite, dializate față de PBS și incubate

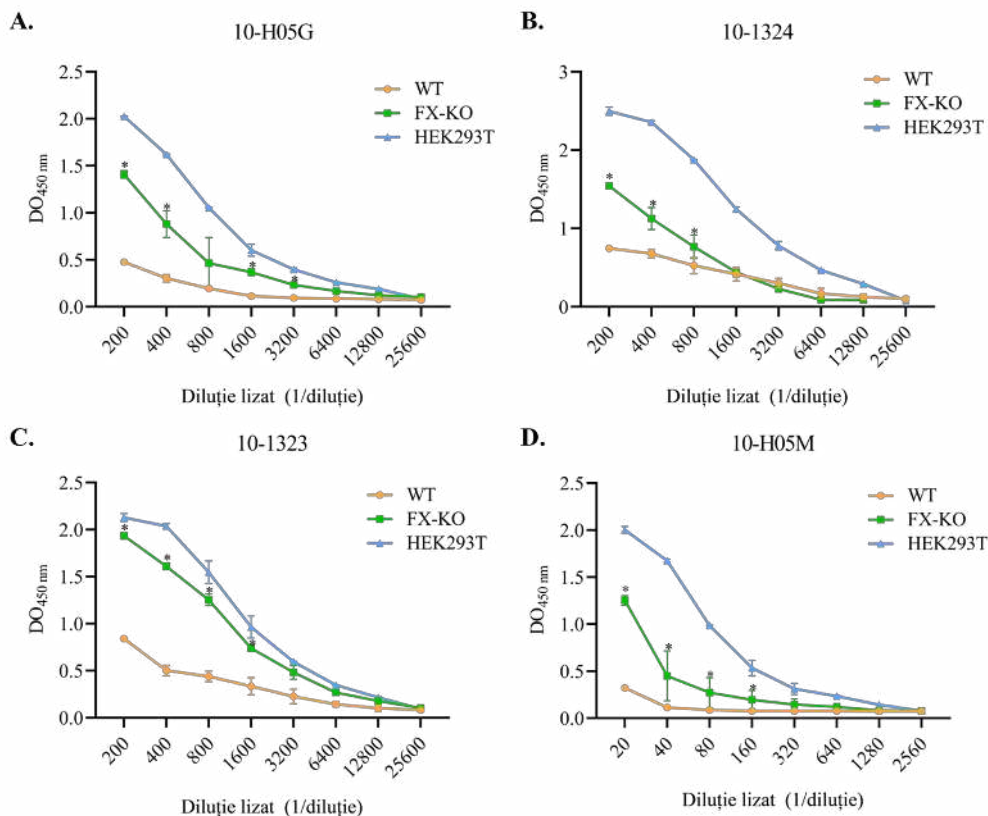
cu cărbune activ 1%, urmat de gel-filtrare cu ajutorul rășinii CaptoCore 400. Frațiile eluate pozitive au fost concentrate și analizate prin SDS-PAGE, urmat fie de colorare cu Coomassie blue fie de western blot. Conform cuantificării cantității de antigen și de proteină totală din probele purificate, s-a obținut o proteină cu o puritate de aproximativ 80%.

Monomerii de VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> purificați din *N. benthamiana* WT și FX-KO au fost apoi extrași din gel și tratați cu PNGase A pentru a elibera N-glicanii, urmat de analiza structurii glicanilor obținuți prin UPLC-FLD/ESI-TOF MS. Datele au arătat un tipar semnificativ diferit de N-glicozilare între cele două sisteme. Spectrul de masă pentru antigenul produs în *N. benthamiana* WT a arătat un semnal majoritar (~63% din conținutul total de glicani) ce reprezintă N-glicanul specific pentru plante, și anume N2H4FX, ce conține  $\beta$ -1,2-xiloză și  $\alpha$ -1,3-fucoză. Restul semnalelor au reprezentat glicani complecși fără fucoză și xiloză, cu doar ~11% din glicanii identificați fiind glicani parțiali procesați, reprezentați de structuri N2H5 bogate în manoză.

În schimb, structura N4H5 fără  $\beta$ -1,2-xiloză și  $\alpha$ -1,3-fucoză a fost glicanul predominant în probele de antigen produse în *N. benthamiana* FX-KO (~55%). Alți N-glicani complecși specifici celulelor mamaliene au fost de asemenea mai abundenți în această probă, cum ar fi N4H4 și N3H3. Totodată, se pare că structuri ce conțin  $\beta$ -1,2-xiloză și  $\alpha$ -1,3-fucoză au fost în continuare prezente în linia FX-KO, dar cu o abundență extrem de scăzută (0.7-1.4% din conținutul total de glicani). Aceste date reprezintă prima analiză detaliată a tiparului de N-glicozilare al antigenului VHB produs în plante și indică că antigenul chimeric este transportat de-a lungul căii secretorii la rețeaua trans-Golgi unde are loc procesarea structurilor complexe de N-glicani de către glicozil transferaze specifice.

Pentru a determina impactul modificării tiparului de N-glicozilare asupra antigenității proteinei VHB-S/preS1<sup>16-42</sup>, s-a testat capacitatea de legare a acesteia față de un panel de anticorpi anti-S comerciali dependenți de conformație via ELISA (Figura 6). Pentru a obține date cât mai robuste, comparația a fost făcută între antigenul produs în celule mamaliene și cel produs în cele două linii de *N. benthamiana*, WT și FX-KO. După cum ne așteptam, cea mai bună eficiență de legare s-a regăsit la antigenul obținut în celule mamaliene. Antigenul VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* WT a avut o eficiență mai scăzută de legare față de toți anticorpii testați. În schimb, s-a observat o îmbunătățire a legării la antigenul produs în *N.*

*benthamiana* FX-KO, eficiența de legare fiind în unele cazuri apropiată de cea observată la antigenul produs în celule HEK293T. Astfel, deși nu se cunosc cu exactitate epitopii virali recunoscuți de anticorpii utilizați în acest experiment, datele sugerează că structura N-glicanului joacă un rol important în acest proces. Mai mult decât atât, s-a arătat că umanizarea tiparului de N-glicozilare în plante îmbunătățește antigenicitatea, dar nu în totalitate, aceasta fiind mai scăzută decât cea observată pentru antigenul produs în celule mamaliene.



**Figura 6. Antigenicitatea VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* WT și FX-KO.**

(A-D) Un panel de anticorpi anti-S dependenți de conformație au fost utilizați pentru a acoperii plăci de 96 godeuri, urmat de incubare cu lizate de celule HEK293T sau *N. benthamiana* WT și FX-KO ce exprimă VHB-S/preS1<sup>16-42</sup>. Acestea au fost apoi incubate cu anticorpi secundari de iepure anti-S independenți de conformație urmat de anticorpi anti-iepure conjugați cu HRP și substratul corespunzător. Legarea antigenului este reprezentată ca media densității optice (DO) măsurată la 450 nm ± SD. Analiza statistică a

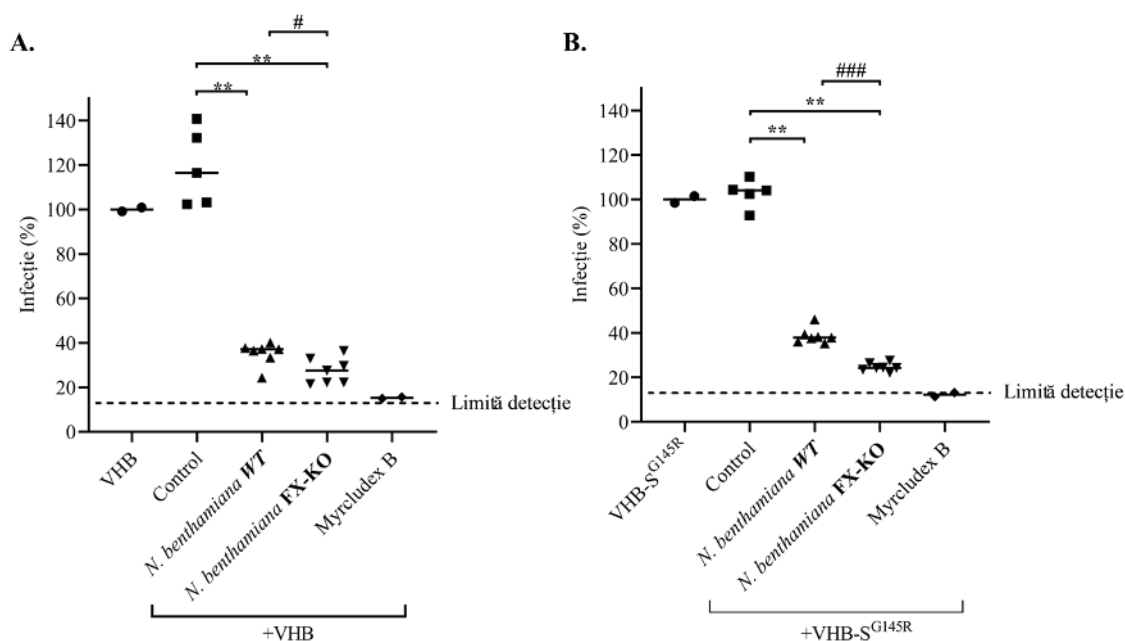
fost realizată folosind testul Mann-Whitney U pentru fiecare diluție. \*,  $p < 0.05$  (WT vs. FX-KO). Imagine adaptată după (Pantazica et al., 2023).

Având în vedere proprietățile îmbunătățite ale antigenului produs în *N. benthamiana* FX-KO, s-a realizat ulterior analiza imunogenicității prin comparație cu antigenul produs în plante WT *in vivo*. Pentru asta, loturi de 7 șoricei BALB/c au primit intramuscular 3 doze a câte 25  $\mu\text{g}$  antigen în prezență de AddaVax, un adjuvant de tip emulsie ulei în apă pe bază de squalene, la interval de 14 zile. Datele de literatură au arătat că această clasă de adjuvanți protejează antigenul de la eliminare prematură și induce activarea atât a răspunsului imun umoral cât și a celui celular, rezultând într-o mai bună protecție la oameni (O'Hagan et al., 2021). S-a observat că ambele antigene au indus o cantitate semnificativă de IgG, cu un titru mai mare fiind observat în cazul șoricilor imunizați cu antigenul produs în plante FX-KO. Mai mult decât atât, analiza subclaselor IgG1 și IgG2a, ce sunt markeri ai activării imunității umorale și respectiv celulare, a arătat că antigenul produs în *N. benthamiana* FX-KO are o imunogenicitate îmbunătățită.

Investigarea răspunsul imun celular în splenocitele recoltate de la șoarecii imunizați și stimulate cu VHB a arătat că imunizarea cu VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* FX-KO induce cel mai puternic răspuns, cu secreție mai mare de IFN- $\gamma$  și IL-5 comparativ cu grupul imunizat cu antigen produs în plante WT și cel control, date ce confirmă din nou că acest antigen induce un răspuns imun mai puternic. Mai mult decât atât, secreția de IFN- $\gamma$  și IL-5 în splenocite recoltate de la grupurile imunizate cu antigen și stimulate cu PBS a fost foarte scăzută (aproape nedetectabilă), indicând că răspunsul imun indus are specificitate foarte crescută față de VHB.

În final, s-a testat capacitatea anticorpilor obținuți în urma imunizării cu antigen VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* FX-KO și WT de a proteja împotriva infecției cu VHB *in vitro* (Figura 7). VHB WT și VHB cu mutații de rezistență la vaccin (VHB-S<sup>G145R</sup>) au fost incubate cu diluții de ser pre-imun și de la ziua 49 obținute de la șoricei imunizați fie cu adjuvant fie cu cele două antigene și apoi utilizate pentru a infecta celule HepG2<sup>hNTCP</sup> (100 EqG/celulă). Infecția a fost apoi evaluată prin cuantificarea secreției de antigen HBe prin ELISA. Datele au fost normalizate prin raportarea nivelului de infecție la cea obținută prin incubare cu serul pre-imun pentru fiecare grup. Se observă că serul obținut de la șoricei imunizați cu antigen VHB-S/preS1<sup>16-42</sup>, indiferent de sistemul de producție, a indus o neutralizare puternică atât a virusului WT (Figura 7A) cât și a VHB-S<sup>G145R</sup> (Figura 7B) în comparație cu grupul control, date ce sunt

consistente cu cele obținute în experimentele precedente de neutralizare cu acest antigen produs în celule mamaliene. În schimb, putem observa că răspunsul imun mai puternic, indus de VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* FX-KO, a dus la o neutralizare semnificativ mai puternică atât a VHB WT cât și a VHB-S<sup>G145R</sup>, comparativ cu grupul imunizat cu antigen produs în plante WT. Astfel, aceste rezultate sugerează că o mai bună prezentare a epitopilor relevanți, cu activitate de neutralizare față de VHB, către sistemul imun, așa cum este cazul antigenului produs în plante FX-KO, contribuie la imunogenicitatea observată în cadrul acestui studiu.



**Figura 7. Capacitatea de neutralizare față de VHB WT și -S<sup>G145R</sup> a anticorpilor induși de imunizarea cu VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* WT și FX-KO.** Serurile de la șoareci imunizați cu antigen S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* WT sau FX-KO sau doar cu adjuvant (control) au fost diluate și preincubate cu VHB WT (A) sau -S<sup>G145R</sup> (B) la 100 EqG/celulă. Celulele HepG2<sup>hNTCP</sup> au fost apoi incubate cu acest preinocul sau doar cu virus. Celule incubate în prelabil cu Myrcludex B au fost folosite drept control al specificității inhibiției infecției cu VHB. Cuantificarea infecției s-a realizat prin determinarea cantității de antigen HBe secretat prin ELISA. Datele sunt prezentate ca procent de infecție cu VHB în prezența serurilor post-imune din valorile obținute în prezența serurilor pre-imune, la aceeași diluție. Valorile în prezența Myrcludex reprezintă

procente de infecție din probele infectate doar cu VHB. Analiza statistică a fost efectuată utilizând testul Mann-Whitney U. Sunt prezentate comparații între grupurile control și grupurile imunizate cu antigen (\*\*,  $p < 0,01$ ) și între grupurile WT și FX-KO (#,  $p < 0,05$ ; ###,  $p < 0,001$ ).

## CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

Studiul de față prezintă optimizarea strategiei de construcție a unor antigene chimerice VHB S/preS1 cu obținerea a 4 noi construcții. Aceștia au fost reprezentați de secvențe parțial suprapuse din domeniul antigenic al regiunii preS1 ce au fost inserați în bucla antigenică a proteinei S în vederea expunerii lor pe suprafața particulelor subvirale. Construcțiile au fost exprimate în celule mamaliene și caracterizate. Noul candidat antigenic, VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> s-a dovedit a avea o expresie și secreție mult îmbunătățită față de chimera obținută anterior (Dobrica et al., 2017). Analiza imunologică a arătat că noua chimeră (produsă în celule HEK293T) induce un răspuns imun îmbunătățit față de proteina S, anticorpii rezultați fiind capabili să neutralizeze infecția *in vitro* atât cu VHB WT cât și cu o variantă de virus cu mutații de rezistență la vaccin (-S<sup>G145R</sup>), indicând că noul antigen este un bun candidat pentru dezvoltarea de vaccinuri alternative anti-VHB.

Având în vedere avantajele asociate producției de proteine destinate dezvoltării de vaccin în plante, noul antigen candidat a fost propus pentru producție în *N. benthamiana*. Datele de literatură au arătat că tiparul de N-glicozilare al plantelor poate afecta proprietățile proteinelor recombinante. Astfel, acest studiu a reprezentat o analiză în premieră a efectului N-glicozilării din plante asupra proprietăților moleculare, antigenice și imunogenice ale unei proteine destinate a fi folosită ca vaccin. S-a arătat că “umanizarea” tiparului de N-glicozilare a îmbunătățit recunoaștrerea antigenului S/preS1<sup>16-42</sup> față de anticorpi anti-S dependenți de conformație, sugerând rolul N-glicanului în mascarea epitopilor de către sistemul imun. Mai mult decât atât, analiza imunologică a arătat că antigenul S/preS1<sup>16-42</sup> produs în *N. benthamiana* cu tipar “umanizat” de N-glicozilare a indus un răspuns imun semnificativ îmbunătățit precum și anticorpi cu capacitate crescută de neutralizare a VHB WT și -S<sup>G145R</sup>. Aceste date au arătat în premieră importanța tiparului de glicozilare din plante asupra imunogenității antigenelor și au ilustrat potențialul liniei *N. benthamiana* FX-KO ca platformă de producție a antigenelor VHB.



În acest studiu, am arătat că imunizarea cu proteina chimerică S/preS1<sup>16-42</sup> induce atât anticorpi anti-preS1, cât și anticorpi anti-S, demonstrând că această strategie asigură o expunere echimolară a epitopilor pe suprafața subparticulelor virale formate. Cu toate acestea, rămâne încă neclar dacă capacitatea îmbunătățită de neutralizare a anticorpilor rezultați în urma imunizării cu această chimeră se datorează combinației de anticorpi anti-S și anti-preS1 sau doar anticorpilor anti-preS1. Așadar, o perspectivă de viitor a acestui studiu este realizarea unor experimente de depleție a anticorpilor anti-preS1 din antiserul obținut în vederea testării capacității de neutralizare a anticorpilor anti-S. Acest aspect este extrem de important, întrucât prezența anticorpilor anti-S neutralizanți este esențială pentru a asigura neutralizarea față de diferite genotipuri de VHB, deoarece majoritatea diferențelor de secvență dintre genotipuri apar în regiunea preS1 (Figura 3.1A). Astfel, o a doua perspectivă este testarea capacității de neutralizare a anticorpilor rezultați față de celelalte genotipuri de VHB, pentru a confirma că noul antigen candidat poate duce la dezvoltarea unui vaccin pangenotipic.

Mai mult decât atât, o altă linie de cercetare de viitor al acestui studiu este producția antigenului în alte sisteme alternative de expresie cu costuri scăzute, cum ar fi microalgele. În acest sens, în cadrul proiectului ISEE s-au obținut date preliminare ce confirmă posibilitatea expresiei antigenului chimeric VHB-S/preS1<sup>16-42</sup> în microalga *Porphiridium purpureum* și faptul că acest antigen se assemblează în particule subvirale. Producția acestui antigen la scală largă, analiza profilului de glicozilare și testarea proprietăților antigenice și imunologice reprezintă următoarele etape în dezvoltarea acestui vaccin candidat.

Având în vedere toate proprietățile antigenului S/preS1<sup>16-42</sup> descrise în acest studiu, ce îl fac un candidat promițător pentru dezvoltarea unui vaccin alternativ, un următor pas ar fi inițierea de studii preclinice mai avansate. Acestea pot include modele murine infectabile cu VHB, așa numite experimente de tip ”challenge”, ce implică imunizarea completă și ulterior analizarea capacității vaccinului de a preveni infecția cu VHB. Alte studii preclinice ar implica testarea profilului de siguranță și a eficacității vaccinului în modele primare, cu sistem imun similar oamenilor. Dacă toate aceste studii au rezultate favorabile, atunci pasul final ar fi inițierea studiilor clinice ce implică pacienți, în vederea aprobării vaccinului pentru uz uman.

## **Mulțumiri**

În primul rând, doresc să îi mulțumesc Dr. Norica Nichita pentru posibilitatea desfășurării studiilor de doctorat în cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române, Departamentul de Glicoproteine Virale și pentru permanenta îndrumare științifică și personală pe parcursul celor patru ani de studiu.

Apoi, aș dori să mulțumesc colegilor din Departamentul de Glicoproteine Virale, Dr. Mihaela-Olivia Dobrică, Cristina Scurtu și Dr. Cătălin Lazăr pentru îndrumarea științifică și asistență în ceea ce privește tehnici experimentale utilizate în cadrul studiului de față, precum și Drd. Lia-Maria Cucos pentru discuții și ajutor în derularea experimentelor.

Totodată, mulțumesc colaboratorilor din instituțiile partenere în acest proiect și anume:

- Dr. Jihong-Liu Clarke, , Dr. Andre Eerde, Hege Steen, Sissel Haugslie, Inger Heldal de la NIBIO (Norwegian Institute for Bioeconomy Research, Ås, Norvegia), pentru expresia antigenelor VHB în plante și colaborare.

- Dr. Crina Stăvaru, Dr. Adrian Onu, Dr. Cătălin Țucureanu, Dr. Iuliana Caraș, Dr. Irina Ionescu, Dr. Adriana Costache de la Institutul Național de Cercetare Cantacuzino, pentru realizarea studiilor de imunizare și colaborare

- Dr. Stephan Urban de la University Hospital Heidelberg, Germania, pentru linia celulară HepG2-hNTCP pe care am utilizat-o pentru analiza neutralizării infecției cu VHB și pentru sugestiile privind antigenul S/preS1

De asemenea, aș dori să mulțumesc, celorlalți colegi din grupul de Glicoproteine Virale, dar și din celelalte departamente – Dr. Mihaela Uță, Drd. Alina-Veronica Ghionescu, Dr. Costin-Ioan Popescu, Drd. Ștefania Buzătoiu, Dr. Cristian Munteanu, Dr. Mari Chirițoiu, Dr. Simona Ghenea și Dr. Rodica Badea pentru discuții și sprijin. Totodată, aș vrea să îi mulțumesc și doamnei tehnician Emilia Ardelean.

În final, aș dori să mulțumesc familiei și prietenilor pentru suportul emoțional acordat de-a lungul anilor de studiu doctoral.

**Studiile prezentate în această lucrare au fost finanțate prin Grantul SEE 2014-2021, proiectul SmartVac nr. 1SEE/2019.**

## Listă lucrări publicate în cadrul temei de doctorat

1. **Pantazica, A.-M.**, van Eerde, A., Dobrica, M.-O., Caras, I., Ionescu, I., Costache, A., Tucureanu, C., Steen, H., Lazar, C., Heldal, I., Haugslie, S., Onu, A., Stavaru, C., Branza-Nichita, N. and Liu Clarke, J., The “humanized” N-glycosylation pathway in CRISPR/Cas9-edited *Nicotiana benthamiana* significantly enhances the immunogenicity of a S/preS1 Hepatitis B Virus antigen and the virus-neutralizing antibody response in vaccinated mice. *Plant Biotechnol J.* **2023**, doi: 10.1111/pbi.14028, **IF 13.263, Q1, AIS 2.17**
2. **Pantazica A-M**, Dobrica M-O, Lazar C, Scurtu C, Tucureanu C, Caras I, Ionescu I, Costache A, Onu A, Clarke JL, Stavaru C and Branza-Nichita N., Efficient cellular and humoral immune response and production of virus-neutralizing antibodies by the Hepatitis B Virus S/preS1<sup>16-42</sup> antigen. *Front. Immunol.*, **2022**, 13:941243, doi: 10.3389/fimmu.2022.941243. **IF 8.787, Q1, AIS 1.943**
3. **Pantazica, A.-M.**; Cucos, L.-M.; Stavaru, C.; Clarke, J.-L.; Branza-Nichita, N. Challenges and Prospects of Plant-Derived Oral Vaccines against Hepatitis B and C Viruses. *Plants* **2021**, *10*, 2037, doi: 10.3390/plants10102037. **IF 4.658, Q1, AIS 0.654**

### Lucrări publicate în domeniul temei de doctorat

4. Bucataru IC, Dragomir I, Asandei A, **Pantazica A-M**, Ghionescu A, Branza-Nichita N, Park Y, Luchian T. Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis. *Biosensors*. **2022**, 12(8):596, doi: 10.3390/bios12080596, **IF 5.743, Q1, AIS 0.976**
5. Popescu, M.-A., Patriche, D., Dobrica, M.-O., **Pantazica, A.-M.**, Flintoaca (Alexandru), P.-R., Rouillé, Y., Popescu, C.-I. and Branza-Nichita, N., Sac1 phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatase is a novel host cell factor regulating hepatitis B virus particles assembly and release. *FEBS J*, **2022**, 289: 7486-7499, doi:10.1111/febs.16575., **IF 5.622, Q2, AIS 1.341**

## BIBLIOGRAFIE

- Allweiss, L. and Dandri, M. (2017) The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses* **9**.
- Bian, T., Yan, H., Shen, L., Wang, F., Zhang, S., Cao, Y., Zhang, S., Zhang, Y. and Bi, S. (2013) Change in hepatitis B virus large surface antigen variant prevalence 13 years after implementation of a universal vaccination program in China. *J Virol* **87**, 12196-12206.
- Bian, Y., Zhang, Z., Sun, Z., Zhao, J., Zhu, D., Wang, Y., Fu, S., Guo, J., Liu, L., Su, L., Wang, F.-S., Fu, Y.-X. and Peng, H. (2017) Vaccines targeting preS1 domain overcome immune tolerance in hepatitis B virus carrier mice. *Hepatology* **66**, 1067-1082.
- Carman, W.F., Karayiannis, P., Waters, J., Thomas, H.C., Zanetti, A.R., Manzillo, G. and Zuckerman, A.J. (1990) Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *The Lancet* **336**, 325-329.
- Dill, M.T., Makowska, Z., Trincucci, G., Gruber, A.J., Vogt, J.E., Filipowicz, M., Calabrese, D., Krol, I., Lau, D.T., Terracciano, L., van Nimwegen, E., Roth, V. and Heim, M.H. (2014) Pegylated IFN- $\alpha$  regulates hepatic gene expression through transient Jak/STAT activation. *The Journal of clinical investigation* **124**, 1568-1581.
- Dobrica, M.O., Lazar, C. and Branza-Nichita, N. (2020) N-Glycosylation and N-Glycan Processing in HBV Biology and Pathogenesis. *Cells* **9**.
- Dobrica, M.O., Lazar, C., Paruch, L., Skomedal, H., Steen, H., Haugslie, S., Tucureanu, C., Caras, I., Onu, A., Ciulean, S., Branza, A., Clarke, J.L., Stavaru, C. and Branza-Nichita, N. (2017) A novel chimeric Hepatitis B virus S/preS1 antigen produced in mammalian and plant cells elicits stronger humoral and cellular immune response than the standard vaccine-constituent, S protein. *Antiviral research* **144**, 256-265.
- Frigerio, R., Marusic, C., Villani, M.E., Lico, C., Capodicasa, C., Andreano, E., Paciello, I., Rappuoli, R., Salzano, A.M., Scaloni, A., Baschieri, S. and Donini, M. (2022) Production of two SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with different potencies in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* **13**.
- Gerlich, W.H. (2017) Do we need better hepatitis B vaccines? *The Indian journal of medical research* **145**, 414-419.
- Herrscher, C., Pastor, F., Burlaud-Gaillard, J., Dumans, A., Seigneuret, F., Moreau, A., Patient, R., Eymieux, S., de Rocquigny, H., Hourieux, C., Roingeard, P. and Blanchard, E. (2020) Hepatitis B virus entry into HepG2-NTCP cells requires clathrin-mediated endocytosis. *Cellular microbiology* **22**, e13205.
- Hu, J. and Liu, K. (2017) Complete and Incomplete Hepatitis B Virus Particles: Formation, Function, and Application. *Viruses* **9**.
- Huang, H.C., Chen, C.C., Chang, W.C., Tao, M.H. and Huang, C. (2012) Entry of hepatitis B virus into immortalized human primary hepatocytes by clathrin-dependent endocytosis. *J Virol* **86**, 9443-9453.
- Huang, Z., LePore, K., Elkin, G., Thanavala, Y. and Mason, H.S. (2008) High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant biotechnology journal* **6**, 202-209.
- Iwamoto, M., Saso, W., Sugiyama, R., Ishii, K., Ohki, M., Nagamori, S., Suzuki, R., Aizaki, H., Ryo, A., Yun, J.H., Park, S.Y., Ohtani, N., Muramatsu, M., Iwami, S., Tanaka, Y., Sureau, C., Wakita, T. and Watashi, K. (2019) Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 8487-8492.

- Jansing, J., Sack, M., Augustine, S.M., Fischer, R. and Bortesi, L. (2019) CRISPR/Cas9-mediated knockout of six glycosyltransferase genes in *Nicotiana benthamiana* for the production of recombinant proteins lacking  $\beta$ -1,2-xylose and core  $\alpha$ -1,3-fucose. *Plant biotechnology journal* **17**, 350-361.
- Kim, W.R. (2009) Epidemiology of hepatitis B in the United States. *Hepatology* **49**, S28-34.
- Lai, M.W., Lin, T.Y., Tsao, K.C., Huang, C.G., Hsiao, M.J., Liang, K.H. and Yeh, C.T. (2012) Increased seroprevalence of HBV DNA with mutations in the s gene among individuals greater than 18 years old after complete vaccination. *Gastroenterology* **143**, 400-407.
- Lok, A.S., McMahon, B.J., Brown, R.S., Jr., Wong, J.B., Ahmed, A.T., Farah, W., Almasri, J., Alahdab, F., Benkhadra, K., Mouchli, M.A., Singh, S., Mohamed, E.A., Abu Dabrh, A.M., Prokop, L.J., Wang, Z., Murad, M.H. and Mohammed, K. (2016) Antiviral therapy for chronic hepatitis B viral infection in adults: A systematic review and meta-analysis. *Hepatology* **63**, 284-306.
- Macovei, A., Radulescu, C., Lazar, C., Petrescu, S., Durantel, D., Dwek, R.A., Zitzmann, N. and Nichita, N.B. (2010) Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol* **84**, 243-253.
- Nassal, M. (2015) HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* **64**, 1972-1984.
- National Advisory Committee on Immunization (2022) Recommendations on the use of Medicago COVID-19 vaccine (Covifenz).
- O'Hagan, D.T., van der Most, R., Lodaya, R.N., Coccia, M. and Lofano, G. (2021) "World in motion" – emulsion adjuvants rising to meet the pandemic challenges. *npj Vaccines* **6**, 158.
- Pantazica, A.M., Cucos, L.M., Stavaru, C., Clarke, J.L. and Branza-Nichita, N. (2021) Challenges and Prospects of Plant-Derived Oral Vaccines against Hepatitis B and C Viruses. *Plants (Basel)* **10**.
- Pantazica, A.M., Dobrica, M.O., Lazar, C., Scurtu, C., Tucureanu, C., Caras, I., Ionescu, I., Costache, A., Onu, A., Clarke, J.L., Stavaru, C. and Branza-Nichita, N. (2022) Efficient cellular and humoral immune response and production of virus-neutralizing antibodies by the Hepatitis B Virus S/preS1(16-42) antigen. *Front Immunol* **13**, 941243.
- Pantazica, A.M., van Eerde, A., Dobrica, M.O., Caras, I., Ionescu, I., Costache, A., Tucureanu, C., Steen, H., Lazar, C., Heldal, I., Haugslie, S., Onu, A., Stavaru, C., Branza-Nichita, N. and Liu Clarke, J. (2023) The "humanized" N-glycosylation pathway in CRISPR/Cas9-edited *Nicotiana benthamiana* significantly enhances the immunogenicity of a S/preS1 Hepatitis B Virus antigen and the virus-neutralizing antibody response in vaccinated mice. *Plant biotechnology journal*.
- Pniewski, T. (2013) The twenty-year story of a plant-based vaccine against hepatitis B: stagnation or promising prospects? *International journal of molecular sciences* **14**, 1978-1998.
- Rubin, L.G., Levin, M.J., Ljungman, P., Davies, E.G., Avery, R., Tomblyn, M., Bousvaros, A., Dhanireddy, S., Sung, L., Keyserling, H. and Kang, I. (2014) 2013 IDSA clinical practice guideline for vaccination of the immunocompromised host. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* **58**, 309-318.
- Sandmann, L. and Cornberg, M. (2021) Towards eradication of HBV: Treatment approaches and status of clinical trials. *Current opinion in pharmacology* **60**, 232-240.
- Sankhyan, A., Sharma, C., Dutta, D., Sharma, T., Chosdol, K., Wakita, T., Watashi, K., Awasthi, A., Acharya, S.K., Khanna, N., Tiwari, A. and Sinha, S. (2016) Inhibition of preS1-

hepatocyte interaction by an array of recombinant human antibodies from naturally recovered individuals. *Scientific Reports* **6**, 21240.

Schoberer, J. and Strasser, R. (2018) Plant glyco-biotechnology. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **80**, 133-141.

Tong, S. and Revill, P. (2016) Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *Journal of hepatology* **64**, S4-S16.

Vesikari, T., Finn, A., van Damme, P., Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Segall, N., Toma, A., Vallieres, G., Aronson, R., Reich, D., Arora, S., Ruane, P.J., Cone, C.L., Manns, M., Cosgrove, C., Faust, S.N., Ramasamy, M.N., Machluf, N., Spaans, J.N., Yassin-Rajkumar, B., Anderson, D., Popovic, V. and Diaz-Mitoma, F. (2021a) Immunogenicity and Safety of a 3-Antigen Hepatitis B Vaccine vs a Single-Antigen Hepatitis B Vaccine: A Phase 3 Randomized Clinical Trial. *JAMA network open* **4**, e2128652.

Vesikari, T., Langley, J.M., Segall, N., Ward, B.J., Cooper, C., Poliquin, G., Smith, B., Gantt, S., McElhaney, J.E., Dionne, M., van Damme, P., Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Machluf, N., Spaans, J.N., Yassin-Rajkumar, B., Anderson, D.E., Popovic, V., Diaz-Mitoma, F., Vesikari, T., Langley, J.M., Gantt, S., Dionne, M., McElhaney, J., Rankin, B., Griffin, C., Turner, M., Kirstein, J., Rizzardi, B.E., Williams, H., Ahonen, A., Henriksson, O., Ukkonen, B., Paasilta, M., Segall, N., Ward, B.J., Cooper, C., Poliquin, G., Smith, B., Van Damme, P., Leroux-Roels, I., Leroux-Roels, G., Machluf, N., Spaans, J.N., Yassin-Rajkumar, B., Anderson, D.E., Popovic, V. and Diaz-Mitoma, F. (2021b) Immunogenicity and safety of a tri-antigenic versus a mono-antigenic hepatitis B vaccine in adults (PROTECT): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Infectious Diseases* **21**, 1271-1281.

Washizaki, A., Murayama, A., Murata, M., Kiyohara, T., Yato, K., Yamada, N., Aly, H.H., Tanaka, T., Moriishi, K., Nishitsuji, H., Shimotohno, K., Goh, Y., Ishii, K.J., Yotsuyanagi, H., Muramatsu, M., Ishii, K., Takahashi, Y., Suzuki, R., Akari, H. and Kato, T. (2022) Neutralization of hepatitis B virus with vaccine-escape mutations by hepatitis B vaccine with large-HBs antigen. *Nature Communications* **13**, 5207.

Watanabe, T., Sorensen, E.M., Naito, A., Schott, M., Kim, S. and Ahlquist, P. (2007) Involvement of host cellular multivesicular body functions in hepatitis B virus budding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 10205-10210.

Yan, H., Zhong, G., Xu, G., He, W., Jing, Z., Gao, Z., Huang, Y., Qi, Y., Peng, B., Wang, H., Fu, L., Song, M., Chen, P., Gao, W., Ren, B., Sun, Y., Cai, T., Feng, X., Sui, J. and Li, W. (2012) Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* **1**, e00049.