



**KAPITAŁ LUDZKI**  
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



SAMORZĄD WOJEWÓDZTWA  
WIELKOPOLSKIEGO  
WOJEWÓDZKI URZĄD PRACY  
W POZNANIU

UNIA EUROPEJSKA  
EUROPEJSKI  
FUNDUSZ SPOŁECZNY



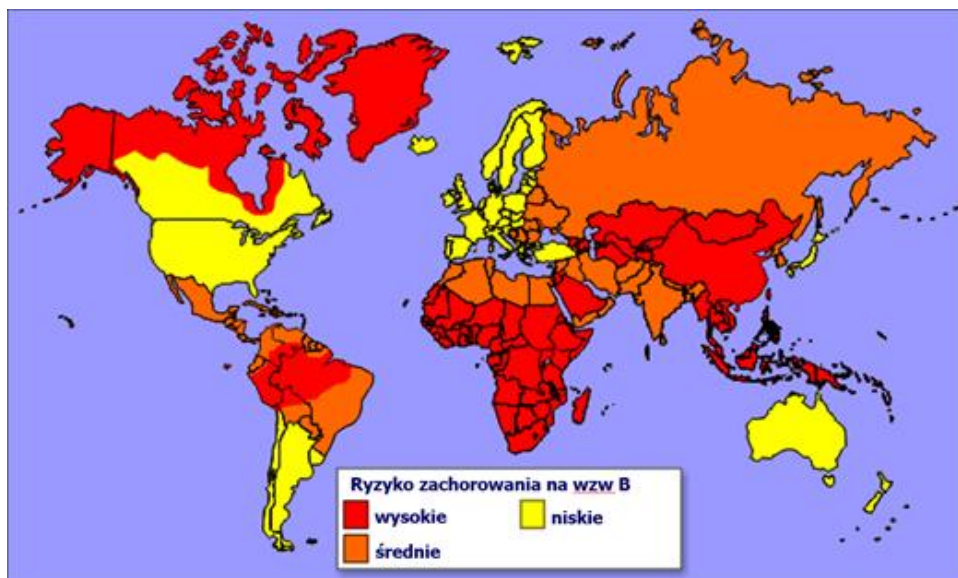
**Marcin Czyż**

**Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk**

Stypendysta projektu pt. „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki

## Preparatyka tkanki roślinnej zawierającej S-HBsAg dla potrzeb szczepionki doustnej przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B

Otrzymanie szczepionki podjednostkowej przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu B (wzwB, Hepatitis B Virus, HBV), opartej na tzw. małym antygenie powierzchniowym (SHBsAg, small Hepatitis B surface Antigen) produkowanym w rekombinowanych drożdżach, było wielkim sukcesem medycyny. Pomimo iż szczepionka przeciwko wzwB dostępna jest od ponad 25 lat, w dalszym ciągu na świecie żyje blisko 400 mln osób przewlekle chorych (nosicieli), około 1/3 populacji świata choruje na wzwB, a tylko w Polsce około 20% ludności miało kontakt z HBV. Konieczną masową profilaktykę mogłyby zapewnić tanie w produkcji i dogodne w aplikacji szczepionki doustne pochodzenia roślinnego.



Rozprzestrzenienie wirusowego zapalenia wątroby typu B na świecie

(wg. Shepard C.W. et al., 2006)

W wyniku wcześniejszych prac otrzymano linie transgenicznych roślin sałaty stabilnie wytwarzających poszczególne białka HBV, w tym podstawowy dla szczepień S-HBsAg. W pilotażowych doświadczeniach na zwierzętach i ochotnikach wykazano, że podana doustnie tkanka roślinna zawierająca S-HBsAg wzbudza odpowiedź immunologiczną. Uzyskanie takich wyników usankcjonowało podjęcie dalszych badań nad obróbką materiału roślinnego do półproduktu będącego dogodnym punktem wyjścia do otrzymania szczepionki w trwałej formie spełniającej wymagania kliniczne i umożliwiającej dogodną aplikację.

Postulowanym półproduktem może być zliofilizowana i sproszkowana tkanka roślinna, która w założeniach powinna umożliwić koncentrację czynnika szczepionkowego, trwałość i łatwość końcowej formulacji szczepionki. Dane literaturowe, jak i wstępne badania wskazują, iż proces liofilizacji stanowi dogodną i skuteczną metodę obróbki wrażliwych materiałów biologicznych, w których zachowanie natywnych struktur molekularnych odgrywa fundamentalne znaczenie. Jednakże wstępne doświadczenia nad liofilizacją materiału roślinnego ujawniły niewielką, 10-15%, wydajność procesu, a ponadto trwałość S-HBsAg w liofilizacji w czasie przechowywania nie była badana. Sam proces liofilizacji jest technologią szeroko wykorzystywaną w przemyśle biotechnologicznym sektora farmaceutycznego, diagnostycznego i naukowego z długą historią jego stosowania, brak jest jednak dokładnych wytycznych dotyczących procesu suszenia sublimacyjnego w stopniu, który pozwoliłby na bezproblemowe podejście do zagadnienia. Stwarza to istotną potrzebę rozwoju technologii liofilizacji gdyż zdobyte na tym polu doświadczenie naukowe oraz wiedza stanowią mogą duży wkład w poziom wiedzy ogólnej oraz przyczynić się do rozwoju wielkopolskiego ośrodka nauki w sferze biotechnologii medycznej i procesowej.

Zasadniczym celem prowadzonych badań jest ustalenie warunków i przebiegu procesu preparacji materiału roślinnego do liofilizatu o wysokim i stabilnym poziomie antygenów powierzchniowych HBV (HBsAg), przede wszystkim S-HBsAg, warunkującego otrzymanie szczepionki doustnej przeciw wzWB.

Spełnienie tego podstawowego założenia da szereg nowych i istotnych danych na temat procesu liofilizacji, nie tylko dla badanego antygeny S ale też w kontekście użycia roślin jako bioreaktorów do produkcji różnorodnych farmaceutyków. Ponadto praca ta stworzy możliwość opanowania technologii liofilizacji i da sposobność na wyszkolenie personelu naukowego co ma duże znaczenie strategiczne. Zgromadzony w trakcie prac kapitał wiedzy i doświadczenia mający realną wartość, może zostać z powodzeniem transferowany do sektora gospodarki stanowiąc istotny element procesu rozwoju produkcji nowych produktów, lub ulepszaniu obecnych. Koszty inicjalne opracowania nowego produktu wymagającego liofilizacji zostaną znacznie obniżone przez co narodziny i/lub rozwój podmiotu gospodarczego wykorzystującego liofilizację wymagać będą niższych nakładów finansowych, czyniąc go bardziej realnym.



Linie transgenicznej sałaty  
wytwarzające mały  
antygen S wirusa HBV



Liofilizat sałaty  
- półfabrykat do  
produkcji doustnej  
formy szczepionki  
przeciwko wzw B



Tabletki na bazie  
liofilizatu  
zawierające  
zdefiniowaną ilość  
antygeny

Badania prowadzone są na wyselekcjonowanych liniach transgenicznej sałaty charakteryzujących się wysokim i stabilnym poziomem ekspresji małego antygeny S (S-HBsAg) wirusa HBV. Proces liofilizacji prowadzony jest w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, natomiast analizy molekularne prowadzone są w macierzystej jednostce Pracowni Genomiki Strukturalnej IGR PAN.

W prowadzonych badaniach przyjęto strategię polegającą na kolejnych analizach stopnia zachowania małego antygeny na poszczególnych etapach procesu obróbki materiału. Użycie do tego celu testów ELISA z zastosowaniem specyficznych przeciwciał podyktowane jest pierwszorzędym warunkiem jakim jest zachowanie antygenowości i immunogenności przetwarzanego materiału, co jest nieodzowne dla przyszłego zastosowania szczepionki. Metoda ta pozwala dokładnie oznaczyć białko o natywnej strukturze i formującego się w tzw. cząstki wirusopodobne (Virus-Like Particles, VLPs), które są właściwym immunogenem.

Badane są parametry fizyczne procesu liofilizacji, a także dodatkowe zabiegi oraz substancje pomocnicze takie jak krioprotektanty oraz lioprotektanty, mające na celu zachowanie w możliwie najwyższym stopniu natywnego antygeny w trakcie liofilizacji oraz mające wpływ na trwałość białek w przechowywanym preparacie. W celu ustalenia warunków procesu, badany materiał jest liofilizowany w różnych warunkach temperatury i czasu suszenia, które stanowią podstawowe fizyczne parametry procesu. Istotnym elementem prowadzonych badań jest również analiza wpływu wprowadzanych do tkanki roślinnej odpowiednich protektantów i ich mieszanin, a także sam proces nasączenia materiału roślinnego. Jako protektanty stosowane są m. in.: sole mineralne, cukry, polialkohole, polimery organiczne. Badane są również dodatkowe procesy w trakcie przetwarzania materiału, takie jak tempo zamrażania tkanki zawierającej badany antygen oraz obróbka mechaniczna liofilizowanej tkanki poprzez mielenie w celu uzyskania łatwo

formowalnego półproduktu. Prowadzone są również badania pod kątem stabilności S-HBsAg zawartego w liofilizacie podczas przechowywania w różnych temperaturach i czasie. Zakładane jest również przeprowadzenie dokładnej analizy wilgotności preparatu po liofilizacji i jej wpływu na trwałość S-HBsAg w przechowywanym liofilizacie. Układ krioprotektantów i warunki fizyczne badane są pod kątem dobrania optymalnych składowych procesu, w wyniku którego otrzymany preparat spełni założenia pracy.

W kolejnym etapie prowadzonych badań planowana jest weryfikacja wyselekcjonowanych kilku najlepszych wariantów kompletnego procesu obróbki materiału roślinnego pod kątem zachowania natywnych struktur badanego białka S-HBsAg oraz powtarzalności całego procesu jak i jego elementów składowych, co ma kapitalne znaczenie dla potencjalnej skalowalności na warunki przemysłowe.

Pozytywnym efektem końcowym w aspekcie profitu regionu wielkopolski wynikającym z realizacji mojego projektu i poznania procesu liofilizacji materiałów biologicznych będzie przyczynienie się to do zmiany obecnej tendencji adaptacji i importu rozwiązań na trend budowania własnego zaplecza badawczo-rozwojowego regionu. Zdobyte "know-how" na temat liofilizacji może też być z dużą skutecznością wykorzystane przy wykonywaniu projektów badawczych i wdrożeniowych rozwijając innowacyjność ośrodka poznańskiego jako centrum nauki i przemysłu zarówno w skali województw jak i kraju. Ponadto w czasie trwania projektu zbierana jest wiedza na temat wykorzystania roślin jako bioreaktorów do produkcji transgenicznych białek, preferowanych ze względu na ograniczenie ryzyka kontaminacji produktu niebezpiecznymi lub niepożądanymi czynnikami.