

NIETECHNICZNE STRESZCZENIE DOŚWIADCZENIA

Tytuł projektu: **Immunizacja iniekcyjno-doustna myszy antygenem rdzeniowym wirusa HBV (HBcAg) pochodzenia roślinnego z wykorzystaniem preparatów oczyszczonych białek i liofilizatu.**

1. Czas trwania projektu: 12 miesięcy

2. Słowa kluczowe (maksymalnie 5 słów): HBV, antygen rdzeniowy, cząstki kapsydopodobne, szczepionka iniekcyjna roślinnego pochodzenia, szczepionka doustna

3. Cel projektu (art. 3 ustawy) (wpisać odpowiednią kategorię z poniższych):

A. Badania podstawowe

5. OPIS PLANOWANEGO DOŚWIADCZENIA

Należy określić cel naukowy lub edukacyjny doświadczenia, w tym przewidywane szkody, jakie może ono spowodować u wykorzystywanych zwierząt, i korzyści, jakie przyniesie ono dla rozwoju nauki i dydaktyki. Maksymalnie 250 słów, tekst musi być zrozumiały dla niespecjalisty.

Potrzebę kontynuacji prac nad szczepionkami przeciwko wirusowemu zapaleniu wątroby typu B (wzwb) uzasadniają dane epidemiologiczne. Liczba chronicznych nosicieli HBV (Hepatitis B Virus) wzrasta i wynosi obecnie ok. 400 mln osób (w Polsce ok. 500-600 tys.), stanowiąc rezerwuuar wirusa i źródło kolejnych zakażeń. Chroniczna postać wzwb prowadzi do postępującej niewydolności, zwłóknienia i marskości wątroby, raka wątrobowokomórkowego, a ostatecznie śmierci. Stąd, oprócz profilaktyki, duże znaczenie ma również terapia chronicznego wzwb. Wiele badań poświęconych jest opracowaniu tzw. szczepionek terapeutycznych. Przyjmuje się, że szczepionki takie powinny zawierać jako podstawowy składnik cząstki kapsydopodobne tworzone przez białko kapsydu HBV, czyli antygen rdzeniowy - HBcAg (Hepatitis B core Antigen) wraz z zestawem antygenów powierzchniowych HBV lub przynajmniej ich immunodominujących fragmentów.

Rośliny mogą być tanim źródłem szczepionek. Wytworzony w roślinach metodą ekspresji przejściowej HBcAg zachowuje zdolność składania się w silnie immunogenne cząstki kapsydopodobne. Dotychczas przeprowadzono immunizację domięśniową z zastosowaniem minimalnej dawki antygeny. Planuje się przeprowadzenie immunizacji mieszanej weryfikującej zasadność podawania antygeny drogą doustną jako szczepienia przypominającego po podaniu domięśniowym. Zastosowane zostaną różne dawki preparatu doustnego w celu optymalizacji dawki jak również zbadany będzie wpływ aplikacji poszczególnych form szczepionki na końcową odpowiedź immunologiczną.

Badania odpowiedzi immunologicznej wywoływanej przez przygotowane preparaty praktycznie są możliwe jedynie na żywych zwierzętach. Jakkolwiek część badaczy podnosi kwestię pewnej nieporównywalności układu immunologicznego myszy i człowieka, gatunek ten jest powszechnie wykorzystywany w badaniach nad szczepionkami, z uwagi na dostępność oraz otrzymywanie wyników, porównywalnych z danymi literaturowymi, które stanowią w pełni wystarczające podstawy do planowania dalszych badań.

6. LICZBA ORAZ GATUNKI ZWIERZĄT PLANOWANYCH DO WYKORZYSTANIA W DOŚWIADCZENIU

40 samic myszy (*Mus musculus*) linii BALB/c

7. OPIS UWZGLĘDNIENIA ZASAD ZASTĄPIENIA, OGRANICZENIA I UDOSKONALENIA

ZASADA ZASTĄPIENIA

Badania nad immunogennością, antygenowością, trwałością itp. właściwościami potencjalnej szczepionki są możliwe w warunkach laboratoryjnych lub kultur komórkowych *in vitro*. Jednakże określenie immunogenności szczepionki bądź opracowanie protokołu szczepienia jest zasadniczo możliwe jedynie w warunkach *in vivo* z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych z w pełni funkcjonalnym układem immunologicznym. W przypadku szczepionki przeciwko chorobom człowieka, w tym przeciwko wzwb, nieodzowne jest wykorzystanie ssaków, z uwagi na największe podobieństwo struktury i funkcji układu immunologicznego. Dodatkowo dostępne testy komórkowe ograniczają się często do jednego typu odpowiedzi immunologicznej [1] i nie dają pełnego spektrum wyników wskazujących na odpowiedź komórkową czy humoralną.

ZASADA OGRANICZENIA

Planowana minimalna liczba zwierząt, tj. 10 w grupach zwierząt otrzymujących kompletną dawkę antygeny (iniekcja i liofilizat) lub 5 w pozostałych (tylko iniekcja lub preparaty kontrolne), jest minimalną akceptowalną liczbą w doświadczeniach immunizacyjnych dla prawidłowej analizy statystycznej i uzyskania wiarygodnych wyników. Dodatkowo przewiduje się redukcję liczby zwierząt w grupie kontrolnej (zerowej), korzystając z wyników eksperymentów wcześniejszych [2,3].

ZASADA UDOSKONALENIA

Planowane podanie antygeny na drodze iniekcji domięśniowej jest najmniej inwazyjne spośród sposobów szczepienia iniekcyjnego. Procedura podania zawiesiny liofilizowanego preparatu drogą dożołądkową również klasyfikowana jest jako nieinwazyjna oraz zabezpiecza przed nieprawidłowym i niekontrolowanym pobraniem przez mysz preparatu w pokarmie i koniecznością powtarzania doświadczenia. Procedury każdym etapie doświadczeń przewidują wziewne podanie środka znieczulającego, co nie powoduje niepotrzebnego zwiększania dyskomfortu zwierzęcia. Z poprzednich doświadczeń na zwierzętach w tym samym ośrodku wynika że takie postępowanie nie wpływa negatywnie na zachowanie myszy i minimalizuje wpływ procedury na ich stan.

- [1] De Groot AS, Moise L. Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2007;10:332–40.
- [2] Brinks V, Jiskoot W, Schellekens H. Immunogenicity of therapeutic proteins: The use of animal models. *Pharm Res* 2011;28:2379–85. doi:10.1007/s11095-011-0523-5.
- [3] Pyrski M, Rugowska A, Wierzbiński KR, Kasprzyk A, Bogusiewicz M, Bociąg P, et al. HBcAg produced in transgenic tobacco triggers Th1 and Th2 response when intramuscularly delivered. *Vaccine* 2017;35:5714–21. doi:10.1016/j.vaccine.2017.07.082.