

REZUMAT

Cuvinte cheie: *shift antigenic, proteine gripale conservate, vaccin, vector lentiviral, șoarecele de laborator C57BL/6, răspuns imunitar celular*

Gripa este o preocupare reală a sănătății publice, fiind o infecție originală raportată la celelalte infecții virale. Boală respiratorie acută, cu caracter zoonotic, foarte contagioasă, gripa afectează omenirea și lumea animală încă din cele mai vechi timpuri. Dacă cel mai adesea gripa trece drept o boală comună, sezonieră, cu un caracter banal, fenomenul de shift genetic sau de reasortare genetică poate duce la transformarea unei sușe gripale comune într-un adevărat pericol internațional cu generarea de pandemii dramatice. Vaccinurile antigripale sezoniere sunt folosite cu succes în profilaxia specifică antigripală în cazul în care sușele virale circulante suferă mutații punctiforme ușor de anticipat de către specialiștii epidemiologi, bioinformaticieni, cercetători și medici. Studiul de față are drept scop anticiparea caracterului imprevizibil al gripei și respectiv a fenomenului de shift antigenic. Principiul a fost unul complet diferit, așadar în loc de a fi ținute proteinele ce suferă cel mai adesea modificări genetice, utilizarea proteinelor interne, conservate ale gripelor de tip A a fost sugerată în elaborarea unui nou vaccin antigripal. Stabilitatea acestor proteine sau segmente proteice într-un sistem vaccinal a fost asigurată prin clonarea lor în vectori lentivirali, ustensile valoroase ale biologiei, puțin cunoscute la ora actuală în România.

Relevanța acestui proiect rezidă din actualitatea și importanța strategică și tehnico-științifică a temei abordate. Teza de față a făcut obiectul unei colaborări complexe între echipa de cercetători de la USAMV (Departamentul de Epidemiologie și de Boli Infecțioase) Iași și o echipă de cercetători de la Institutul Pasteur în cadrul proiectului CNMP tip PNII cu tema „Lupta împotriva virusurilor gripale recombinante: testarea unor noi vaccinuri bazate pe vectori lentivirali la suine și păsări” ROFLU 52 180 / 2008. Schimburile parteneriale au fost numeroase, având drept scop perfecționarea celor două echipe în dublu sens în vederea abordării tematicii într-o manieră corectă și compensatorie pentru cele două părți cu intenția primară de a dezvolta un vaccin antigripal universal panserotipic.

Teza de doctorat: **Elaborarea și testarea de noi vaccinuri antigripale bazate pe vectori lentivirali la suine și păsări** cuprinde 281 de pagini și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale, în două părți principale: prima parte fiind intitulată „*Stadiul actual al cunoașterii*” este structurată în 55 de pagini iar cea de-a doua parte, „*Contribuții personale*” cuprinde 171 pagini.

Din structura primei părți fac parte patru capitole în care sunt prezentate succint informații din literatura de specialitate cu privire la subiectul tezei, metodologia abordării tematicii, precum și alte elemente importante ce ajută cu precizie înțelegerea și decriptarea celei de-a doua părți ca și referințe în interpretarea și discutarea rezultatelor obținute.

În primul capitol: „**Infecția gripală cu virusuri de tip A**” gripa este prezentată ca și un agent infecțios, boala produsă de virusul influenza de tip A fiind descrisă în detaliu, cu analiza precisă a acestuia, clasificarea lui, cu prezentarea structurii și a proprietăților virale, descrierea răspunsului imun împotriva gripei, rezistența agentului patologic la diferiți agenți chimici sau fizici, elementele importante de genetică pentru ca în final infecția gripală să fie abordată din perspectiva epidemiologică până la descrierea caracterului clinic la speciile de mamifere și de păsări interesate de această infecție precum și a profilaxiei abordate la ora actuală în vederea prevenirii potențialelor infecții gripale de tip A.

Cel de-al doilea capitol: „**Vectorii lentivirali și utilizarea lor în domeniul biotehnologiei**” abordează subiectul vectorologiei, respectiv a vectorilor de clonare moleculară existenți precum și aplicabilitatea acestora. Ulterior descrierea acestor vectori este mai amănunțită și detaliată în vederea prezentării vectorilor lentivirali și a avantajelor folosirii acestor instrumente de viitor.

Parte integrantă a tezei, „**Experimentarea animală în cercetarea biomedicală**” face subiectul celui de-al treilea capitol prezentând în mod general două specii de animale ce au fost folosite în elaborarea vaccinului antigripal, respectiv șoarecele de laborator și porcul convențional, alături de cobai și de pasăre, specii ce au fost inițial predestinate testării aceluiși vaccin, dar care la final nu au mai fost utilizate. Folosirea acestor două specii de animale (șoarecele consangvin și porcul convențional) a vizat aplicabilitatea universală a vaccinului: în medicina umană dar și cea veterinară.

Cel de-al patrulea capitol: „**Cercetări în țară și străinătate cu privire la tema proiectului**” recontextualizează subiectul abordat, prezentând inițial cercetările efectuate pe plan internațional cu privire la tema tezei, respectiv datele epidemiologice, vaccinurile antigripale existente pe piață. Cercetările în țară tratează epidemiologia și profilaxia specifică din România.

Cea de-a doua parte a tezei, respectiv: **Contribuții personale** reunește experimentele realizate în vederea abordării și finalizării tezei, după cum se detaliază cu precizie mai jos.

Capitolul cel de-al cincilea al tezei: „**Scopul și obiectivele cercetărilor**” reabordează gripa ca și boală etern de actualitate, citând cele mai vechi dar și cele mai recente episoade pandemice cu un important impact asupra sănătății omului, trecându-se în revistă: gripa spaniolă, gripa asiatică fiind abordate și gripa aviară dar și cea mai recentă gripă porcină.

Scopurile majore ale proiectului sunt precizate, respectiv:

- gruparea de cercetători ce lucrează în domeniul epidemiologiei influenței de tip A și al vaccinurilor bazate pe vectori lentivirali ce a dus la dezvoltarea unui nou și inovant vaccin;
- implementarea unei supravegheri serologice a infecțiilor naturale cu virusurile gripale la suine și păsări (inclusiv la păsările sălbatice), cu realizarea unui adevrat studiu epidemiologic;
- crearea unor noi metode și a unui model animal de studiu: standardizarea metodelor și a modelului animal ar permite evaluarea unui nou vaccin.

Metodele de cercetare sunt citate cronologic, respectiv: cercetările bibliografice ce au urmat o documentare temeinică în ceea ce privește tema propusă pentru a putea decela toate aspectele referitoare la infecția cu virusul gripal pe plan național și internațional, ancheta epidemiologică de seroprevalență a infecțiilor naturale cu virusurile gripale din tipul A la suine și păsări din sud-estul României, alegerea de noi proteine imunogene gripale de tip A, design-ul și construcția de antigene, construcția și producerea de vectori lentivirali vaccinali, evaluarea proprietăților imunogenice în model murin, testarea protecției în model murin, testul de imunogenitate la porcine, evaluarea toxicității și a altor efecte secundare ale vectorului lentiviral M1_NP la porcii convenționali și evaluarea exprimării ‘in vivo’ a transgenei M1_NP în urma utilizării unui vector lentiviral ce exprimă luciferaza și confirmarea imunogenității acestui vector (ELISPOT și marcaj pentamer).

De asemenea perspectivele și modalitățile de validare și valorificare a rezultatelor au fost în egală măsură tratate în acest capitol.

Capitolul al șaselea: **„Ancheta epidemiologică de seroprevalență a infecțiilor cu virusuri gripale de tipul A la animale domestice în zona de Est a României”** a fost realizată pe mai multe categorii de animale pe un areal extins pentru a avea o imagine de ansamblu a extinderii infecțiilor determinate de virusurile gripale de tip A în zona de Est și Sud-Est a României. Au fost recoltate probe de la suine, ecvine și păsări, preponderent din gospodăriile populației, probe ce au fost analizate cu ajutorul kit-ului ELISA Blocking Influenza ser screening monocupule de depistare a anticorpilor specifici nucleoproteinei gripale.

„Designul de antigene M1_NP” face obiectul celui de-al șaptelea capitol și enunță inițial alegerea subtipurilor de gripă A ce au servit construcției de antigene. Precum s-a expus anterior, dacă ideea de bază a fost de a se face apel la 2 proteine gripale înalt conservate precum M1 și NP alegerea subtipurilor importante ce au o importanță în elaborarea unui vaccin a fost dificilă, un arbitraj fiind făcut între subtipurile de gripă A ce evoluează în populațiile umane, precum și în cele animale: aviare, porcine și cabaline, revenindu-se în continuare la dubla aplicabilitate potențială a vaccinului antigripal vectorial, respectiv: veterinară și umană. Consecutiv alegerii subtipurilor de interes programe complexe și numeroase de bioinformatică au fost utilizate în vederea stabilirii segmentelor potențial imunogene ce vor fi folosite în clonajul molecular.

Capitolul opt: „**Clonajul molecular**” reunește folosirea tehnicilor de biologie moleculară în vederea introducerii segmentelor proteice imunogene: M1 și NP în plasmidul FLAP, purtător al transgenei. Tehnici de PCR au fost utilizate precum și migrarea pe gel de agaroză, digestia enzimatică a plasmidelor de exprimare a transgenelor, purificarea de ADN, clonajul unui insert de ADN într-un vector, transformarea plasmidelor în bacterii competente, amplificarea și purificarea clonelor plasmidice.

Eficacitatea acestor experimente a fost confirmată cu succes prin verificarea purității construcțiilor în cadrul laboratorului Theravectys dar și prin abordarea prestatarilor de servicii ce au asigurat secvențializarea construcțiilor obținute, confirmând puritatea acestora.

„**Producția de particule vectoriale lentivirale**” pe culturi celulare (tehnici de cultură celulară) prin metoda de transfecție (co-exprimarea celor 3 parteneri: unitate transcripțională ce codifică pentru genomul vectorului, incluzând gena terapeutică, sau transgena, sistemul de încapsidare care codifică pentru proteinele necesare în trans, pentru formarea de particule precum și pentru derularea etapelor precoce (retrotranscripție, integrare) și sistemul de expresie al anvelopei) a fost prezentată în capitolul al nouălea. Particulele astfel asamblate au fost ulterior concentrate prin ultracentrifugare.

Validarea stocurilor de particule vectoriale a fost realizată prin cuantificarea de particule produse consecutiv unei transducții realizate pe același tip de cultură celulară folosit și în producția de vectori lentivirali. Două metode de cuantificare au fost realizate, cuantificarea proteinei p24 a capsidei în stocurile de vectori ne-a permis determinarea numărului de particule fizice produse pentru ca realizarea unui PCR cantitativ pe lizat de celule transduse cu vectorii lentivirali să fie realizată în scopul măsurării de particule eficiente în stocurile de vectori produși. Prin titrarea vectorilor M1_NP conform metodei qPCR s-au obținut valori corecte, corelative cu cele obținute prin metoda p24.

Consecutiv producerii de vectori lentivirali mai multe studii de imunogenitate au fost realizate în model murin, știut fiind faptul că anterior clusteri cu valoare imunogenă specifici proteinelor de sinteză M1 și NP în model murin C57BL/6 au fost introduși în secvența transgenei M1_NP. Ca și metodă de evaluare a imunogenității celulare s-a făcut apel la tehnica ELISPOT. Aceste cercetări de imunogenitate au făcut subiectul capitolului al zecelea: „**Testarea imunogenității vectorului lentiviral M1_NP în model murin**”. Potențialul imunogen al acestor vectori a fost confirmat prin compararea răspunsului imun celular obținut de către șoarecii vaccinați cu răspunsul obținut la șoarecii din grupul martor ce au fost injectați cu tamponul de formulare al vectorilor lentivirali. Pe lângă confirmarea imunogenității acestor vectori capitolul de față a avut drept scop și alegerea diferitelor elemente vectoriale optime ce pot servi celor două aplicabilități vaccinale: umane sau veterinare.

În urma studiilor de imunogenitate efectuate în vederea determinării caracterului imunogen al celor 2 construcții de vectori lentivirali cu 2 transgene diferite, 2 construcții vectoriale au fost alese

pentru ulterioarele studii de protecție vaccinală. În capitolul 11, o strategie vaccinală a fost propusă: primoinjecție urmată de un rapel au fost recomandate, urmate de un challenge viral în vederea unei bune caracterizări a răspunsului imunitar obținut după vaccinare și infecție. Evaluarea răspunsului imunitar și studiile de eficacitate vaccinală au fost realizate pe șoarecele de laborator C57BL/6 după imunizarea intramusculară urmată de infecția pe cale intranasală pentru a mima infecția gripală naturală. Toate datele privitoare la imunogenitatea vectorilor și semnele clinice dezvoltate consecutiv infecției au permis identificarea posibilei protecții asigurate de cei 2 candidați vaccinali consecutiv unei infecții cu 2 virusuri gripale înalt patogene H1N1 și H3N2 patogene la șoarece consecutiv pasajelor 'in vivo' ale sușelor virale. În ciuda bunei imunogenități a celor 2 vectori lentivirali testați studiile de protecție vaccinală au fost compromise de utilizarea unor doze de virus gripal foarte puternice, doze ce au dus la moartea precoce a șoarecilor de laborator și la aprecierea dificilă a vectorilor ca și vaccinuri protective eficiente.

Capitolul 12: „**Titrare in vivo a virusurilor H1N1 și H3N2**” a permis stabilirea dozelor letale minime corespunzătoare fiecărui virus utilizat în parte. Șase diluții seriate au fost efectuate de la 10^{-1} până la doza 10^{-6} , ce au fost inoculate la șoarecii de laborator C57BL/6 (40 μ L la nivelul celor 2 narine) aflați sub anestezie ușoară. Șoarecii au fost observați zilnic până la apariția semnelor clinice. Rezultatele obținute consecutiv titrării de virusuri adaptate pe șoarece 'in vivo': Puerto Rico/8/34 H1N1 și Scotland H3N2 au fost considerate ca fiind satisfăcătoare pentru următorul studiu de protecție vaccinală prime-boost1-boost2-challenge.

„**Protecția asigurată de vectorul lentiviral M1_{NP} și M1 contra unor gripe de tipul A: H1N1 și H3N2 la șoarecele de laborator C57BL/6 consecutiv vaccinării într-o strategie de prime-boost1-boost2 și infectării cu sușe virale adaptate in vivo pe șoareci neimunizați**”, respectiv cel le-al treisprezecelea capitol a reluat studiul inițiat în capitolul 11 pentru a aprecia protecția vaccinurilor lentivirale în contextul unor infecții cu sușe gripale special adaptate la șoarece și titrate 'in vivo'. Și de această dată imunogenitatea vectorilor folosiți pentru cele 2 vaccinuri de rapel a fost confirmată. Contrar rezultatelor obținute în capitolul 11 de această dată rezultate încurajatoare ce confirmă potențialul protectiv al vectorului lentiviral ce codifică pentru proteina de sinteză M1_{NP} au fost obținute.

Pentru a putea fi estimat adevăratul caracter panserotipic al vaccinului lentiviral ce codifică pentru proteina de sinteză M1_{NP} un alt studiu de protecție a fost realizat în capitolul 14 împotriva unui virus înalt patogen H5N1. Nici de această dată virusul H5N1 nu a putut fi titrat pe șoarece deoarece accesul la acest tip de experiment a fost extrem de dificil (laborator de nivelul A3, izolator) iar planificarea inițială nu a ținut cont de acest aspect. Aparent, stabilirea unei doze infecțioase fără o titrare 'in vivo' a acestui virus a dus la evoluția unei patogeneze insiduoase, fără apariția de semne clinice. Șoarecii nu au prezentat semne de boală. Vârful infecției a fost considerat în ziua a 5-a, iar 4

șoareci vaccinați cu vectorul M1_NP și o parte din șoarecii nevaccinați au fost sacrificați. Scorul leziunilor nu a mai fost efectuat ci doar o necropsie rapidă ce a relevat prezența unor leziuni de hipertrofie pulmonară și un început de hepatizare pulmonară, în ciuda absenței de semne clinice.

Capitolele 15 și 16 au abordat evaluarea vectorului lentiviral M1_NP din perspectiva unui alt model animal: porcul convențional metis Landrace-Marele Alb-Pietrain. Un adevărat studiu de toxicologie a fost realizat în vederea confirmării siguranței folosirii vectorului lentiviral, urmat de un studiu de imunogenitate. Consecutiv acestor analize am putut concluziona că nici una din cele 3 doze de vector lentiviral nu a fost toxică și că administrarea acestor vectori în vaccinologia lentivirală nu are un efect negativ pentru sănătatea efectivelor porcine. Pe lângă confirmarea unor efecte non-toxice ale vectorului lentiviral capacitatea sa imunogenă a fost în egală măsură confirmată.

În vederea aprofundării cunoștințelor cu privire la funcționarea vaccinului nostru studii *in vivo* de repartiție a exprimării transgenei de interes de-a lungul timpului au fost realizate. Aceste studii de biodistribuție au permis înțelegerea cineticii instalării răspunsului imunitar indus de către vaccinul nostru și participarea sa la eliminarea celulelor transduse ale unui organism de către vectorul studiat. O tehnică de bioluminescență a fost utilizată împreună cu un marcaj pentamer. Capitolul 17, „**Evaluarea exprimării in vivo a transgenei M1_NP în urma utilizării unui vector lentiviral ce exprimă luciferaza, confirmarea imunogenității acestui vector (ELISPOT, marcaj pentamer)**” a fost realizat cu intenția de a reevalua potențialul imunogen al vaccinului veterinar făcându-se apel la două tehnici inovante, ce nu au fost folosite anterior.

În cadrul ultimului capitol: „**Concluzii generale și recomandări**” au fost redactate un număr de 21 de concluzii ce au rezultat în urma realizării cercetărilor, venind în sprijinul confirmării demarării acestui proiect și sprijinind valoarea științifică a experimentelor efectuate precum și valorificarea acestora, precum și câteva recomandări.