

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Kemijski odsjek

Zrinka Matić

Kemijski seminar I

**Upotreba nanočestica u medicini – primjena principa racionalnog dizajna u  
razvoju cjepiva protiv virusa hepatitisa C**

Prema radu: He, L., Tzarum, N., Lin, X., Shapero, B., Sou, C., Mann, C. J., . . . Zhu, J. (2020). Proof of concept for rational design of hepatitis C virus E2 core nanoparticle vaccines. *Science advances*, 6(eaaz6225). doi:10.1126/sciadv.aaz6225

Mentor: dr.sc. Saša Kazazić

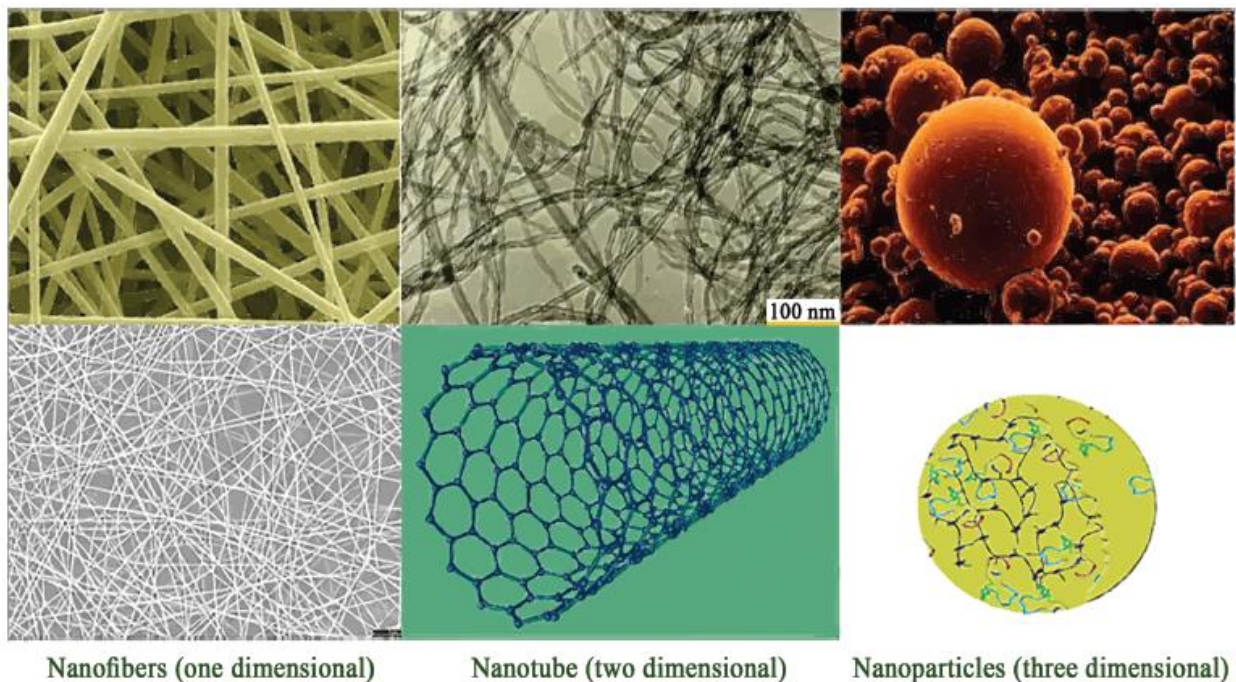
Zagreb, 21. travnja 2021.

## Sadržaj

1. Uvod.....	1
1.1 Vrste nanočestica.....	2
2. Upotreba nanočestica u medicini.....	5
2.1 Upotreba u terapijske svrhe.....	5
2.1.1 Rak.....	5
2.1.2 Infektivne bolesti.....	5
2.1.3 Autoimune bolesti.....	6
2.1.4 Kardiovaskularne bolesti.....	6
2.1.5 Neurodegenerativne bolesti.....	6
2.2 Upotreba u preventivne svrhe (profilaktička cjepiva).....	7
2.2.1 Utjecaj nanočestica na imunološki sustav kod profilaktičkih cjepiva.....	7
2.2.2 Prepoznavanje antigena od strane dendritičkih stanica.....	8
2.2.3 Prezentacija antigena od strane dendritičkih stanica.....	8
2.2.4 Strategije poboljšanja prepoznavanja i prezentacije antigena korištenjem nanočestica kao profilaktičkih cjepiva.....	10
2.3 Izazovi kod upotrebe nanočestica u klinici.....	10
2.3.1 Nedostaci u korištenju nanočestica kao profilaktičkih cjepiva.....	11
3. Primjena principa racionalnog dizajna u razvoju cjepiva protiv hepatitisa C.....	12
3.1 Virus hepatitisa C.....	12
3.2 Princip racionalnog dizajna.....	12
3.3 Optimizacija glikoproteina E2.....	13
3.4 Određivanje kristalne strukture optimiranih konstrukata iz izolata H77 i HK6a.....	15
3.5 Dizajn nanočestica koje isporučuju optimirane proteine ovojnice E2.....	15
3.6 Imunološki odgovor nanočestica fuzioniranih s modificiranim konstruktima E2 i samih konstrukata E2.....	16
4. Zaključak.....	19
5. Literatura.....	20

## 1. Uvod

Nanotehnologija podrazmijeva obradu individualnih atoma, molekula ili spojeva u strukture sa svrhom proizvodnje materijala i uređaja sa specifičnim svojstvima (Nikalje, 2015). Nanotehnologija se odnosi na strukture veličine od 1 do 100 nm u najmanje jednoj dimenziji, koje imaju varijabilnu kompoziciju, veličinu, oblik i površinska svojstva. Tijekom 1990-ih javlja se ideja o potencijalnoj primjeni nanotehnologije u medicinske svrhe (Facciola, i dr., 2019). Tri glavne kategorije nanostrukture, prema njihovoj veličini su: nanovlakna (jedna dimenzija), nanocijevi (dvije dimenzije) i nanočestice (tri dimenzije) (Slika 1.) (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).



Slika 1. Podjela nanočestica prema veličini: nanovlakna, nanocijevi i nanočestice. Preuzeto iz: (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

## 1.1 Vrste nanočestica

Prema kompoziciji nanomaterijala, nanočestice možemo podijeliti u nekoliko skupina (Slika 2.): (Sangiao-Torres, Holban, & Gestal, 2016).

### a) polimeri

Svojstva koja polimere čine ineresantnim za korištenje u nanotehnologiji su: biokompatibilnost, predvidljivost, biodegradacija, sigurnost i mogućnost modificiranja njihove površine. Prednosti korištenja polimernih nanočestica su kontinuirano ispuštanje antigena, zaštita inkapsuliranog antigena, ciljana isporuka antigena te posjedovanje učinka adjuvanta. Polimerne nanočestice dijelimo u dvije skupine: prirodne i sintetičke nanočestice. Najčešće korišteni prirodni polimeri su alginat, hijalouronska kiselina i hitozan. Uglavnom se koriste kao adjuvanti (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020). Adjuvanti se koriste dugi niz godina i jedna od prvih definicija opisuje ih kao komponente koje se dodaju antigenima za pojačavanje njihove imunogeničnosti. Oni diriraju antigen-specifični imunološki odgovor. Smanjuju potrebnu dozu antigena, oblikuju imunološki odgovor u smjeru dugotrajne zaštite te ubrzavaju imunološki odgovor (Zhu, Wang, & Nie, 2014). Najčešće korištene sintetičke nanočestice su PLG (poli-laktid-ko-glikolid), PLGA (poli-laktid-ko-glikolna kiselina) i PLA (polilaktidna kiselina). Također se koriste kao adjuvanti (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

### b) liposomi

Liposomalne nanočestice su umjetno samoudružujuće molekule, koje se sastoje od biorazgradivog netoksičnog fosfolipidnog dvosloja ili od višestrukih lamelarnih vezikula s vodenom unutrašnjosti. Koriste se kao adjuvanti. Mogu inkorporirati hidrofilne molekule u svoju unutrašnjost ili hidrofobne molekule u fosfolipidni dvosloj. Prednosti liposoma su sigurnost, biološka razgradivost, sposobnost inkorporacije različitih antigena te mogućnost njihovog pripravljanja u različitim veličinama i nabojima. Jedna od najbitnijih prednosti liposoma je sposobnost istovremenog dostavljanja adjuvanta i antigena. (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

c) emulzije

Emulzije se dijele na dva tipa: tip ulje-u-vodi i tip voda-u-ulju. Emulzijske nanočestice najčešće se koriste kao adjuvanti (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

d) anorganske nanočestice

Prednosti korištenja anorganskih nanočestica su njihova rigidna struktura i kontrolirana sinteza. Međutim, anorganske nanočestice uglavnom nisu razgradive. Koriste se kao adjuvanti i kao mehanizam za dovođenje cjepiva s ciljem pojačavanja imunološkog odgovora. Najčešće korištene anorganske nanočestice su zlato, ugljik, silikon, kalcijev fosfat i magnetne nanočestice. Uspješno induciraju i humoralni i stanični imunološki sustav (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

e) imunostimulirajući kompleksi

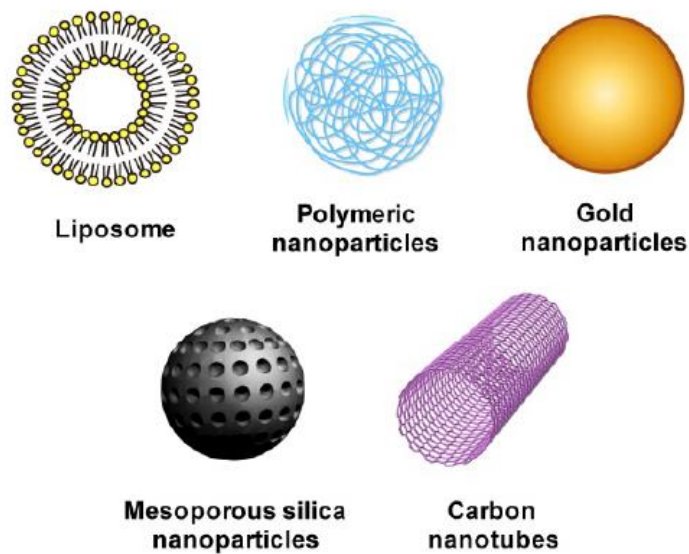
Imunostimulirajući kompleksi su čestice veličine 40 nm dobivene kombinacijom adjuvanta saponina i proteinskog antigena, kolesterola ili fosfolipida. Potiču stvaranje antitijela i stanični imunološki odgovor (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

f) virusima slične čestice

Virusima slične čestice su samoudružujuće strukture građene od virusnih strukturnih proteina. Lišene su bilo kakvog infektivnog materijala i nisu sposobne za umnažanje. Potiču imunološki odgovor tako što oponašaju svojstva virusa. Virusima slične čestice sadrže viralne proteine zaslužne za prodiranje u stanicu pa na taj način uspješno ulaze u stanicu. Induciraju i humoralni i stanični imunološki odgovor te su sposobne potaknuti i odgovor citotoksičnih T limfocita. Također, mogu biti nosači za isporuku epitopa drugih patogena (Kheirollahpour, Mehrabi, Dounighi, Mohammadi, & Masoudi, 2020).

## g) samoudružujući sustavi

Razni proteina iz prirode posjeduju karakteristiku samoudruživanja u nanočestice, koje su stabilne, simetrične i strukturno organizirane. Takve nanočestice mogu biti korištene kao platforme, odnosno nosači za predstavljanje i izlaganje određenog imunogena (Lopez-Sagaseta, Malito, Rappuoli, & Bottomley, 2016).



Slika 2. Neke vrste nanočestica korištenih u nanotehnologiji. Preuzeto iz: (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).

## 2. Upotreba nanočestica u medicini

### 2.1 Upotreba u terapijske svrhe

Ciljana isporuka odnosi se na uspješno usmjerenje terapijskog agensa na željeno mjesto. Da bi ciljana isporučivanje bilo uspješno, sustav agensa i nosača mora biti zadržan u fiziološkom sustavu kroz određeni period, potrebno je izbjeći imunološki odgovor, ciljati specifične stanice ili tkivo te naposljetku otpustiti terapijski agens (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

#### 2.1.1 Rak

Nanočestice ciljaju direktno stanice raka, isporučuju agens kontrolirano brzo i optimiraju terapijsko djelovanje. Razlikuju se dva načina isporuke agensa protiv raka: pasivno i aktivno ciljanje. Pasivno akumulira terapijski agens u tumoru, a omogućeno je razlikovanjem obilježja tumorskog i normalnog tkiva. Aktivnim ciljanjem selektivno se prepoznaju ciljane tumorske stanice. Nanočestice na površini nose ligande koje se vežu na receptore ciljanih stanica. Trenutno, većina terapijskih nanočestica koje je odobrila Uprava za kontrolu prehrambenih i farmaceutskih proizvoda (engl. US Food and Drug Administration – FDA) reformulacije su kemoterapeutika u kombinaciji s nanočesticama. Npr. konjugat lijeka i antitijela Kadcycla, koji se koristi u liječenju HER2+ raka dojke, napravljen je kovalentnim vezanjem DM1 na Herceptin (antitijelo) preko lizinskih ogranaka antitijela. DM1 se isporučuje HER2+ stanicama raka dojke, tako što se Herceptin veže na receptore na HER2+ receptore, a internalizirani DM1 potiče apoptozu (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

#### 2.1.2 Infektivne bolesti

Terapijski pristup za infektivne bolesti baziran je na korištenju lijekova protiv mikroba. Nedostaci takvih lijekova su rezistencija patogena, nuspojave, toksičnost i dr. Korištenjem nanočestica u liječenju infektivnih bolesti mogu se nadjačati ovi nedostaci. Npr. ciprofloksacin je antibiotik korišten u liječenju plućnih infekcija. Lipokvin je liposomalna formulacija

ciprofloksacina koja ga kontinuirano otpušta kroz 24 sata (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

### 2.1.3 Autoimune bolesti

Reumatoidni artritis i SIDA (sindrom stečene imunodeficijencije) su autoimune bolesti koje su podvrgnute terapiji nanočesticama. Kod reumatoidnog artritisa, sustav nanočestica može djelovati ciljano na upaljeno tkivo – sinovijalnu membranu, smanjujući sinovijalitis te može ublažiti destrukciju kosti. Nanoformulacija certolizumab pegola (lijeka korištenog u klinici u liječenju reumatoidnog artritisa) i PEG-a (polietilen glikol) pokazuje obećavajuće rezultate u dugoročnom liječenju pacijenata koji boluju od reumatoidnog artritisa (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

Polimerni i liposomalni nanonosai omogućuju ciljano i kontinuirano ispuštanje lijekova protiv HIV-a i pokazuju pojačan unos lijeka protiv HIV-a u inficiranim stanicama (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

### 2.1.4 Kardiovaskularne bolesti

Kardiovaskularne bolesti utječu na kardiovaskularni sustav, vaskularni sustav mozga i bubrega i perifernih arterija. Nanočestice su korištene u formulaciji lijeka protiv restenoze. Sastoje se od fosfatidilkolina i kolesterola napunjenih lijekom sirolimusom i obloženim hitozanom. Tako isporučeni sirolimus je značajno inhibirao vaskularnu restenozu (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

### 2.1.5 Neurodegenerativne bolesti

Neurodegenerativne bolesti karakterizira progresivan gubitak funkcije neurona što uzrokuje njihovu smrt. Napredak u liječenju ovih bolesti je postignut, ali zbog postojanja krvno-moždane barijere terapijske strategije su limitirane, odnosno mali broj lijekova može dospjeti do mozga.



Terapeutici bazirani na nanočesticama se fokusiraju na ciljanom isporučivanju i kontinuiranom otpuštanju agenasa nakon prelaska krvno-moždane barijere. Klinički korišteni lijekovi u reformulaciji s polimernim nanočesticama mogu proći krvno-moždanu barijeru te se na taj način značajno smanjuju nuspojave uzrokovane slobodnim lijekom koji ne prođe barijeru (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

Nanočestice se u terapijske svrhe koriste još kod bolesti oka, bolesti respiratornog sustava i u regenerativnoj terapiji (Yetisgin, Cetinel, Zuvin, Kosar, & Kutlu, 2020).

## 2.2 Upotreba u preventivne svrhe (profilaktička cjepiva)

Profilaktičnim cijepljenjem podrazumijeva se cijepljenje radi prevencije od raznih infektivnih bolesti. Uspješna i djelotvorna cjepiva moraju zadovoljiti tri uvjeta: 1. posjedovanje antigena koji će aktivirati imunitet, 2. posjedovanje adjuvanta koji će kostimulirati urođeni imunološki sustav te 3. sustav nosača koji će omogućiti da antigen i adjuvant dospiju do antigen prezentirajućih stanica. Mnoga potencijalna cjepiva karakterizira slaba imunogeničnost i nemogućnost izazivanja jakog i dugotrajnog imunološkog odgovora. Korištenjem nanočestica otvara se prilika da se nadvladaju ti nedostaci (Facciola, i dr., 2019).

Nanočestice kao dostavljači komponenti cjepiva mogu sudjelovati u jačanju imunološkog odgovora te, zbog svoje veličine, u pozicioniranju u specifične stanične odjeljke. Kako bi se optimalno primijenile nanočestice u svrhu profilaktičkog cijepljenja, potrebno je poznavati njihovu veličinu, fizikalno-kemijske karakteristike, površinske karakteristike, karakteristike materijala nanočestice, biodistribucije te imunostimulatornog kapaciteta (Facciola, i dr., 2019).

### 2.2.1 Utjecaj nanočestica na imunološki sustav kod profilaktičkih cjepiva

Postoji nekoliko ključnih koraka u cijepljenju koji dovode do aktivacije odgovora CD4+ i CD8+ T limfocita. Prvi korak je prepoznavanje antigena od strane dendritičkih stanica, koje zatim putuju

do limfnog tkiva gdje prezentiraju antigene T stanicama i aktiviraju ih (Irvine, Hanson, Rakhra, & Tokatlian, 2015).

### 2.2.2 Prepoznavanje antigena od strane dendritičkih stanica

Dendritičke stanice unose antigene fagocitozom i makropinocitozom. Pokazano je i da nanočestični nosači antigena ulaze u stanice na isti način. Površinske modifikacije nanočestica s antitijelima, ligandima receptora dendritičkih stanica dovode do ciljanja i aktivacije dendritičkih stanica. Veličina nanočestice od 100 nm smatra se optimalnom za unos u dendritičke stanice (veličina prirodnih meta – bakterija i virusa) (Tostanoski & Jewell, 2017).

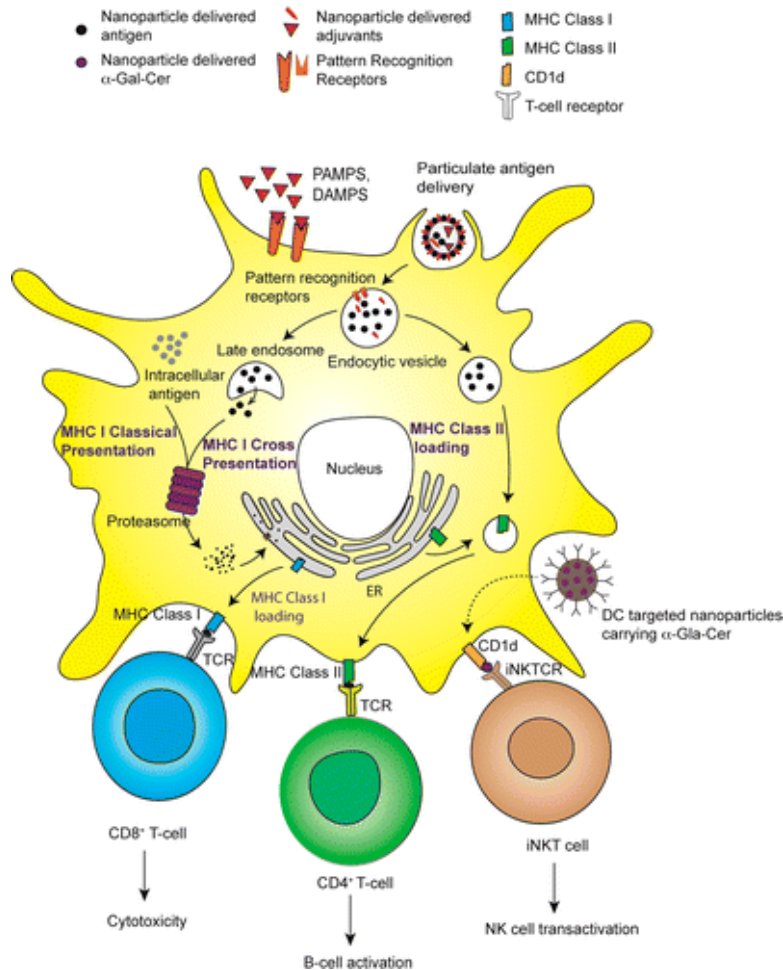
Vjerojatnost nanočestica da se nađu u limfnim čvoroima je bitno svojstvo u kontekstu primjene nanočestica kao cjepiva, jer pojačan limfni transport pojačava unos antigena i njegovu prezentaciju B i T limfocitima (Tostanoski & Jewell, 2017).

Uspješno nanošenje antigena na nanočestični nosač jedan je od preduvjeta za uspješan unos antigena od strane dendritičkih stanica. Proteinski i peptidni antigeni mogu biti inkapsulirani unutar nanočestice, konjugirani na nanočestici na temelju naboja ili kemijskih interakcija i adsorbirani na nanočesticama. Kod korištenja DNA i mRNA kao antigena najvažnija je njihova zaštita od strane nanočestica zbog mogućnosti njihove razgradnje u citosolu (Tostanoski & Jewell, 2017).

### 2.2.3 Prezentacija antigena od strane dendritičkih stanica

Unesene antigene dendritičke stanice prezentiraju koristeći dva puta: prezentaciju putem glavnog kompleksa histokompatibilnosti I (engl. major histocompatibility complex I – MHC I) koji aktivira CD8<sup>+</sup> T limfocite te prezentaciju putem MHC II koji aktivira CD4<sup>+</sup> T limfocite. Budući da nanočestični nosači ulaze u stanice endocitozom u vezikulama obavijenim membranama, antigeni se prezentiraju putem MHC II kompleksa. S druge strane antigeni isporučeni u obliku mRNA ili DNA se trebaju translocirati u citosol, transkribirati i translirati u proteine koji se prezentiraju MHC I kompleksu. Aktivacija CD8<sup>+</sup> T stanica (što se postiže prezentacijom antigena u MHC I kompleksu) je potrebna za djelotvoran učinak cjepiva. Vezanjem liganda receptora koji prepoznaju

obrazac (engl. pattern recognition receptor – PRR) na nanočestice se nadilazi ovaj problem. Aktivacija dendritičkih stanica PRR ligandima, uzokuje aktivaciju CD8<sup>+</sup> T stanica neovisno o aktivaciji CD4<sup>+</sup> T pomoćničkih stanica (aktiviraju se putem MHC II kompleksa) (Slika 3.) (Irvine, Hanson, Rakhra, & Tokatlian, 2015).



Slika 3. Schematski pregled procesiranja antigena u dendritičkim stanicama. Dendritičke stanice se aktiviraju patogen-asociranim molekularnim obrazcima (engl. pathogen-associated molecular pattern - PAMP) koje prepoznaju receptori za prepoznavanje obrasca (PRR). Kompleks MHC II – antigen putuje na staničnu membranu, prezentira antigen CD4<sup>+</sup> T limfocitima koji uzrokuju aktivaciju B stanica. Alternativno, peptidni fragmenti nakon procesiranja u proteasomu su nanoseni na MHC I kompleks te putuju na membranu gdje se peptidni fragmenti prezentiraju CD8<sup>+</sup> T limfocitima. Preuzeto iz: (Irvine, Hanson, Rakhra, & Tokatlian, 2015).

## 2.2.4 Strategije poboljšanja prepoznavanja i prezentacije antigena korištenjem nanočestica kao profilaktičkih cjepiva

Neki primjeri mehanizama koji se koriste za poboljšanje efikasnosti potencijalnih cjepiva baziranih na nanočesticama su:

1. pokazano je da se nanočestice veličine između 20 i 200 nm puno uspješnije odvede limfatičkim sustavom od onih veličine između 500 i 2000 nm (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).
2. stabiliziranjem antigena unutar dvosloja multilamelarnih vezikula unakrsno vezanih tiolnom skupinom poboljšava dovođenje antigena dendritičkim stanicama u odnosu na liposome slične veličine (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).
3. korištenje patogen-asociranih molekularnih obrazaca kao adjuvanta (engl. pathogen-associated molecular patterns – PAMPs) koji interagiraju s TLRs (engl. toll-like receptors) te potiču urođeni imunološki odgovor (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).
4. koordinirano dovođenje antigena i adjuvanta dendritičkim stanicama (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).
5. repetitivna prezentacija antigena na nanočesticama i njihovo klasteriranje poboljšava proizvodnju antitijela (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).
6. povećana funkcionalizacija antigena vezanjem na površinu nanočestica putem elektrostatskih interakcija, tiolne skupine ili adsorpcije, tiolna skupina na cisteinu je jak nukleofil i ima kapacitet kovalentnog vezanja – kontrolira se gustoća i konformacija antigena na nanočesticama, često kod zlatnih nanočestica (Chattopadhyay, Chen, Chen, & Hu, 2017).

## 2.3 Izazovi kod upotrebe nanočestica u klinici

U biološkim sustavima nanočestice moraju kontrolirano proći kroz različite barijere do ciljanih tkiva i stanica što limitira neke formulacije nanočestica. Jedan od glavnih izazova je povećati akumulaciju nanočestica na ciljanom mjestu, a smanjiti njihovu akumulaciju na svim drugim mjestima. Taj se izazov rješava npr. korištenjem PEG nanočestica u terapijske svrhe koje

limitiraju interakciju s imunološkim sustavom te takve nanočestice cirkuliraju duže pa imaju veću šansu dospjeti na ciljano mjesto. Na sličan način djeluju i hidrofilni šećeri i nanočestice željezovih oksida. Drugi veliki izazov je nadvladavanje bioloških barijera. Koriste se dvije strategije: korištenje nanočestica specifične veličine kako bi se povećala njihova akumulacija ili korištenje liposomalnog efekta koji povećavaju vezanje i ulazak u ciljane stanice (Anselmo & Mitragotri, 2016).

Mogući izazov je provedba pretkliničkih studija na životinjama i kliničkih na ljudima. Optimizacija liganada ne mora korelirati kod životinja i ljudi (Anselmo & Mitragotri, 2016).

Neki od tehničkih izazova su: povećanje sinteze za industrijske potrebe, predviđanje učinkovitosti i izvedbe nanočestica u klinici (Anselmo & Mitragotri, 2016).

### 2.3.1 Nedostaci u korištenju nanočestica kao profilaktičkih cjepiva

Izlaganjem stanice nanočesticama manjim od 100 nm mogu se izazvati nuspojave kao što su generiranje reaktivnih kisikovih radikala koji uzrokuju oksidativni stres i apoptozu. Također, zbog svoje male veličine nanočestice potencijalno mogu izbjeći obrambene mehanizme i aktivirati upalne procese. Nanočestice imaju veliku površinu što možete dovesti do stvaranja agregata i uzrokovati nestabilnost nanočestice (Irvine, Hanson, Rakhra, & Tokatlian, 2015).

### 3. Primjena principa racionalnog dizajna u razvoju cjepiva protiv hepatitisa C

U ovom radu predstavljena je strategija za razvoj cjepiva protiv virusa hepatitisa C optimizacijom glikoproteina E2 te su prikazane nanočestice korištene za to cjepivo. Glikoproteini E1 i E2 ovojnice virusa hepatitisa C odgovorni su za ulazak u stanicu, a glikoprotein E2 glavna je meta neutralizirajućih protutijela (He, i dr., 2020).

#### 3.1 Virus hepatitisa C

Svake godine virusom hepatitisa C zarazi se od 1 do 2% svjetske populacija, odnosno od 1.5 do 2 milijuna ljudi, što rezultira s 500 000 smrti godišnje. Većina pacijenata zaraženih ovim virusom razvije kroničnu infekciju koja uzorkuje hepatocelularni karcinom, cirozu i druge bolesti jetre. Neki od izazova u liječenju pacijenata s virusom hepatitisa C su: dijagnoza u uznapredovaloj fazi jer je infekcija asptomatska, liječenje antivirusnom terapijom jer se ne može spriječiti razvijanje raka jetre ili ponovna infekcija ovim virusom te postojanje sojeva rezistentnih na antivirusnu terapiju (WHO, 2021).

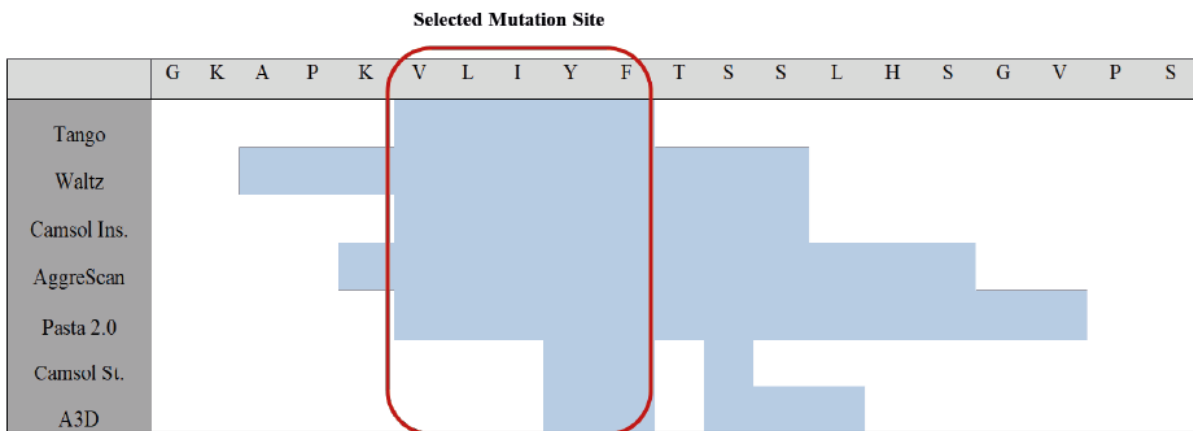
#### 3.2 Princip racionalnog dizajna

Topljivost, stabilnost i agregabilnost antitijela su bitni faktori koji utječu na razvoj antitijela i mogu uzorkovati smanjenje afiniteta antitijela i slabiji imunogenični odgovor. Svojstva topljivosti, agregabilnosti i stabilnosti antitijela ovise o njegovoj sekvenci i strukturi. Racionalnim dizajnom podrazumijeva se strategija kreiranja novih molekula određene funkcionalnosti, koje su kreirane na temelju predviđanja kako će njihova struktura utjecati na njihovo ponašanje u određenim uvjetima. Princip racionalnog dizajna nudi uvid u problematične regije na proteinskoj sekvenci ili u strukturi. Tijekom racionalnog dizajna koriste se različiti web alati i metode kako bi se poboljšala svojstva antitijela (Arslan, Karadag, & Kalyoncu, 2019).

Npr. kako bi se predvidjela agregabilnost antitijela potrebno je predvidjeti regije sklone agregaciji (engl. aggregation prone regions - APR) koje su uvjetovane nabojem, sekundarnim strukturama,

hidrofobnosti i dr. Istraživanja su pokazala da se za poboljšanje proteinske agregacije i stabilnosti mogu koristiti računalne metode i da proteini sa željenim svojstvima mogu biti dizajnirani na temelju tih izračuna (Slika 4.) (Arslan, Karadag, & Kalyoncu, 2019).

Stabilnost proteina može se predvidjeti računanjem promjene Gibbsove energije nakon supstitucije nekih aminokiselina. Negativnije vrijednosti slobodne energije znače veću stabilnost. (Arslan, Karadag, & Kalyoncu, 2019).



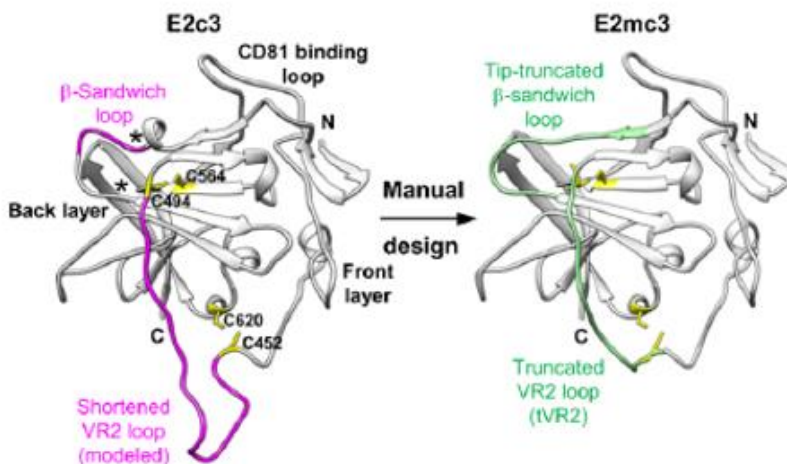
Slika 4. Primjer korištenih web alata korištenih s ciljem određivanja regija sklonih agregaciji. Preuzeto iz: (Arslan, Karadag, & Kalyoncu, 2019)

### 3.3 Optimizacija glikoproteina E2

Definiranje kristalnih struktura kapsidnog proteina E2 iz izolata H77 u kompleksu s neutralizirajućim antitijelom AR3c i nepotpunog kapsidnog proteina E2 iz izolata J6 vezanog za ne-neutralizirajuće antitijelo bio je prvi pokazatelj prepoznavanja glikoproteina ovojnice virusa od strane imunološkog sustava. Taj dokaz otvorio je mogućnost dizajna antivirusnih lijekova i cjepiva baziranih na strukturi proteina ovojnice (He, i dr., 2020).

Cjepiva protiv virusa hepatitisa C trebaju se orijentirati na dizajn i optimizaciju glikoproteina ovojnice sposobnih za stvaranje neutralizirajućih antitijela. Strategije za takav dizajn temelje se na ugradnji epitopa na heterologne nosače, micanju ili utišavaju imunodominantnih regija i stabilizaciji antigenskih struktura (He, i dr., 2020).

Glikoprotein E2 stabiliziran je s 9 disulfidnih veza, sadrži 3 varijabilne regije te je obavijen s 11 N-vezanih glikana. Skraćivanjem N i C terminalnih krajeva i varijabilne regije 2 te micanjem dvaju glikana dobiveni su konstrukti E2c i E2c3. Međutim, oni posjeduju fleksibilne dijelove: C kraj, skraćenu varijabilnu regiju 2 i N terminalni kraj  $\beta$ -sendviča. Prvi korak bio je okrnjavanje varijabilne regije 2 te okrnjavanje vrha petlje  $\beta$ -sendviča čime je dobiven konstrukt E2mc3 (Slika 5.). Varijabilna regija je odabrana jer se nalazi u blizini neutralizirajuće strane u strukturi u proteinu E2. Korištenjem metode proteinskog dizajna de novo, okrnjena varijabilna regija 2 konstrukta E2mc3 dodatno je redizajnirana za duljinu dvije petlje. Nakon uzorkovanja metodom Monte Carlo, prvih 5 sekvenci za svaku petlju je odabrano za daljnju karakterizaciju, čime su dobiveni konstrukti E2mc3-v1-v5 i E2mc3-v6-v10. Zbog slične strukture izolata H77 i HK6a, na temelju poravnjanja sekvenci modificiranog virusnog izolata H77 i virusnog izolata HK6a dizajnirani su i konstrukti E2mc3 i E2mc3-v1 za HK6a bez dodatnih modifikacija (He, i dr., 2020).



Slika 5. Prikaz struktura glikoproteina E2c3 i E2mc3 prije i nakon okrnjavanja varijabilne regije 2 i  $\beta$ -sandvič petlje. Preuzeto iz: (He, i dr., 2020).

Karakterizacija 13 novih konstrukata E2mc3 dobivenih iz H77 i H6a virusnih izolata rađena je na temelju rada Yana i dr. 2020. Uz novo-konstruirane E2mc3 konstrukte korištena su i dva E2c3 konstrukta. Svi konstrukti eksprimirani su u HEK293 stanicama i pročišćeni na AR3A koloni.



Novo konstrukti pokazali su bolji prinos na pročišćavanju na AR3A koloni u odnosu na E2c3 konstrukte (He, i dr., 2020).

Konstrukti su potom testirani metodom ELISA (engl. enyzme linke immunosorbent assay), u kojoj su se upotrijebila brojna antitijela protiv virusa hepatitisa C. Pokazano je poboljšanje u vezanju neutralizirajućih antitijela i smanjeno vezanje ne-neutralizirajućih antitijela koja se vežu na petlju  $\beta$ -sendviča u E2mc3 konstruktima u odnosu na E2c3 i E2c konstrukte (He, i dr., 2020).

### 3.4 Određivanje kristalne strukture optimiranih konstrukata iz izolata H77 i HK6a

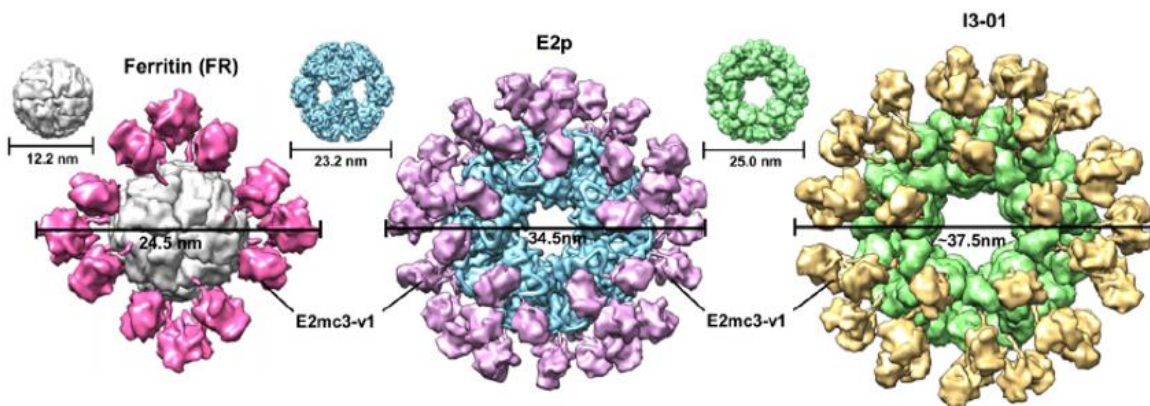
Određena je kristalna struktura određenih konstrukata kako bi se provjerilo zadržavaju li optimirani konstrukti nativnu konformaciju. Određena je kristalna struktura konstrukata H77 E2mc3-v1 i H77 E2mc3-v6 u kompleksu s antitijelom AR3C i HK6a E2mc3-v1 u kompleksu s antitijelom AR3B. Određivanje kristalne strukture pokazalo je da petlja  $\beta$ -sendviča usitinu zaslužna za vezanja na ne-neutralizirajuća antitijela te da okrnjena varijabilna regija 2 ne unosi nikakve konformacijske promjene u kontekstu neutralizirajućeg karaktera proteina E2. Sumarno, pokazano je da E2c/E2c3 glikoproteini mogu biti minimizirani kako bi se unaprijedila stabilnost i antigeničnost, a da se pritom očuva intaktna nativna struktura (He, i dr., 2020).

### 3.5 Dizajn nanočestica koje isporučuju optimirane proteine ovojnice E2

U ovoj studiji korištene su samoudružujuće proteinske nanočestice. Korišteni su feritin s 24 podjedinice te E2p i I3-01 s 60 podjedinica, veličine 12.2 - 25.0 nm, odnosno 24.5 - 37.5 nm nakon ugradnje konstrukta E2mc3-v1 (Slika 6.) (He, i dr., 2020). Feritin formira sferičnu česticu s 24 podjedinice organiziranu u oktaedar sa šupljinom u sredini. Usporedbom vezanja antitijela na goli feritin, feritin s E2 proteinom i sami protein E2 pokazano je da feritin s vezanim proteinom E2 pokazuje veći afinitet na antitijela te takva nanočestica poboljšava imunološki odgovor u odnosu na sami protein E2 (Yan, i dr., 2020).

Nanočestica E2p je dihidropoli acetiltransferaza iz bakterije *Bacillus stearothermophilus* koja je korištena u prezentaciji HIV-1 imunogena. To je nanočestica građena od 60 podjedinica s promjerom od 23.2 nm (He, i dr., 2016).

Nanočestica I3-01 je hiperstabilni dodekaedar građen od 60 podjedinica otporna na gvanidin hidroklorid pri visokom temperaturama. Od enzima iz bakterije *Thermotoga mairtima* razlikuje se u 5 ogranaka. Slične je veličine kao nanočestica E2p i korištena je za prezentaciju antigena virusa HIV-1 (He, i dr., 2018).



Slika 7. Nanočestice korištene za prezentaciju E2mc3-v1 antigena- feritin, E2p i I3-01. Preuzeto iz: (He, i dr., 2020)

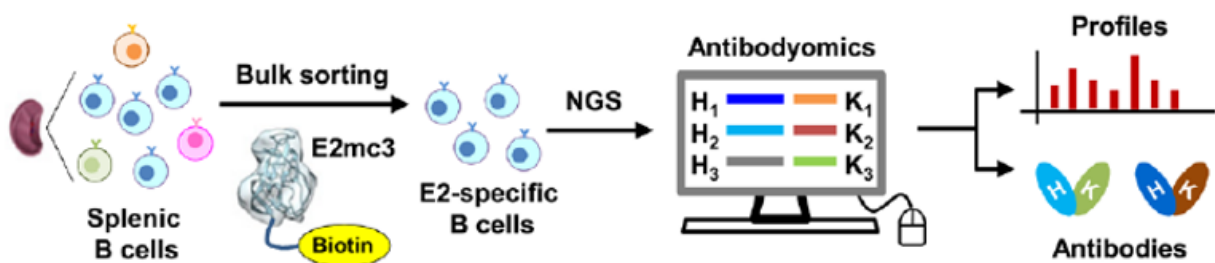
Nanočestice s epitopom E2mc3-v1 su dobivene fuzijom C terminalnog kraja konstrukta E2mc3-v1 na N terminalni kraj svake od nanočestica uz pomoć 10 ogranaka duge vezujuće sekvence (He, i dr., 2020).

### 3.6 Imunološki odgovor nanočestica fuzioniranih s modificiranim konstruktima E2 i samih konstrukata E2

Sve korištene nanočestice su formulirane s adjuvantom AddaVax, ulje-u-vodi emulzijom. Nanočestice s fuzioniranim modificiranim konstruktima E2 i sami konstrukti E2 su injektirani u

miša i napravljena je analiza antitijela u serumu. Nanočestice I3-01 nisu korištene u daljnim eksperimentima zbog problema u sintezi konstrukta HK6a E2mc3-v1-10GS-I3-01. Nanočestice s fuzioniranim konstruktima E2 uzrokovala su stvaranje veće količine antitijela od samih konstrukata E2. Nanočestice s konstruktom H77 E2mc3-v1 pokazale su stvaranje veće količine antitijela od nanočestica s konstruktom HK6a E2mc3-v1. Sumarno, pravilno formulirane nanočestice s E2 proteinima izazivaju stvaranje antitijela brzo i u velikoj količini, a u odnosu na same E2 proteine bolje neutraliziraju i heterologne i autologne virusne izolate. Usporedbom feritina i E2p nanočestica, E2p nanočestica pokazala je bolju neutralizaciju. (He, i dr., 2020).

Sljedeće, napravljeno je sortiranje B stanica specifičnih za E2mc3-v1 konstrukt te sekvenciranje druge generacije (engl. next generation sequencing – NGS) s ciljem kvantitativne analize odgovora B stanica te određivanje obrasca prepoznavanja antigena od strane B stanica kod korištenja različitih načina prezentiranja antigena (Slika 8.). Prvo je napravljena H77 E2mc3-v1 proba specifično obilježena tako da sortira E2-specifične B stanice. Miševi su imunizirani sa samom H77 E2mc3-v1 probom te tom probom fuzioniranom na nanočestice. Konstrukt na nanočestici je inducirao stvaranje veće količine neutralizirajućih antitijela od samog konstrukta te se konstrukt na nanočestici više vezao na gene teškog lanca antitijela (He, i dr., 2020).



Slika 8. Schematski prikaz strategije korištene za analizu odgovora E2-specifičnih B stanica. Preuzeto iz: (He, i dr., 2020).

Nadalje, mapirani su epitopi konstrukta s nanočesticom i samog konstrukta kako bi se utvrdilo koje regije prepoznaju neutralizirajuća antitijela. Rezultati su pokazali da se epitopi koje prepoznaju antitijela na samom konstruktu E2mc3-v1 i konstruktu E2mc3-v1 na nanočestici razlikuju, odnosno pokazano je kako različito prezentiranje epitopa (sam ili na nanočestici) utječe na odgovor antitijela (He, i dr., 2020).

#### 4. Zaključak

U svrhu stvaranja profilaktičkih cjepiva nanočestice se mogu koristiti za isporuku različitih antigena u specifična tkiva i organa. Nanočestice pružaju platforme koje su biodegradibilne i biokompatibilne s minimalnom toksičnošću, a dobra su alternativa tradicionalnim cjepivima (Zhu, Wang, & Nie, 2014). Studija, koja je zapravo dokaz koncepta principa racionalnog dizajna, predstavila je novu strategiju za sintezu nanočestičnog cjepiva protiv virusa hepatitisa C. Prvo su redizajnirani konstrukti proteina ovojnice E2 okrnjavanjem varijabilne regije 2 i petlje  $\beta$ -sendviča. Te okrnjene regije su računalno optimirane te je nekoliko konstrukata odabrano za daljnje eksperimente. Ti konstrukti su fuzionirani na 3 nanočestice - feritin, E2p i I3-01. Miševi su se imunizirali s takvim konstruktima, koji su izazvali jak imunološki odgovor i stvaranje antitijela. Naposljetku, analizirana su antitijela te je pokazano kako prezentacija antigena (je li sam ili na nanočestici) utječe na prepoznavanje epitopa od strane antitijela. Ova studija predstavila je novog kandidata za profilaktičko cjepivo protiv virusa hepatitisa C – optimirani kapsidni protein E2mc3-v1 fuzioniran s E2p nanočesticom (He, i dr., 2020).

## 5. Literatura

- 1) Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2016). Nanoparticles in the clinic. *Bioengineering & Translational Medicine*, 1, 10-29. doi:10.1002/btm2.10003
- 2) Arslan, M., Karadag, D., & Kalyoncu, S. (2019). Protein engineering approaches for antibody fragments: directed evolution and rational design approaches. *Turkish Journal of Biology*, 43, 1-12. doi:10.3906/biy-1809-28
- 3) Chattopadhyay, S., Chen, J.-Y., Chen, H.-W., & Hu, C.-M. J. (2017). Nanoparticle Vaccines Adopting Virus-like Features for. *Nanotheranostics*, 1(3), 244-260. doi:10.7150/ntno.19796
- 4) Facciola, A., Visalli, G., Lagana, P., La Fauci, V., Squeri, R., Pellicano, G., . . . Di Pietro, A. (2019). The new era of vaccines: the “nanovaccinology”. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 23, 7163-7182.
- 5) He, L., de Val, N., Morris, C. D., Vora, N., Thinnes, T. C., Kong, L., . . . Zhu, J. (2016). Presenting native-like trimeric HIV-1 antigens. *Nature communications*, 7:12041. doi:10.1038/ncomms12041
- 6) He, L., Kumar, S., Allen, J. D., Huang, D., Lin, X., Mann, C. J., . . . Zhu, J. (2018). HIV-1 vaccine design through minimizing envelope metastability. *Science advances*, 4. doi:10.1126/sciadv.aau6769
- 7) He, L., Tzarum, N., Lin, X., Shapero, B., Sou, C., Mann, C. J., . . . Zhu, J. (2020). Proof of concept for rational design of hepatitis C virus E2 core nanoparticle vaccines. *Science advances*, 6(eaaz6225). doi:10.1126/sciadv.aaz6225
- 8) Irvine, D. J., Hanson, M. C., Rakhra, K., & Tokatlian, T. (2015). Synthetic Nanoparticles for Vaccines and Immunotherapy. *Chemical reviews*, 115, 11109-11146. doi:10.1021/acs.chemrev.5b00109
- 9) Kheirollahpour, M., Mehrabi, M., Dounighi, N. M., Mohammadi, M., & Masoudi, A. (2020). Nanoparticles and Vaccine Development. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 8, 6-21. doi:10.2174/2211738507666191024162042
- 10) Lopez-Sagaseta, J., Malito, E., Rappuoli, R., & Bottomley, M. J. (2016). Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 14, 58-68.
- 11) Nikalje, A. P. (2015). Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Medicinal chemistry*, 5(2). doi:10.4172/2161-0444.1000247
- 12) Sangiao-Torres, E., Holban, A., & Gestal, M. C. (2016). Advanced Nanobiomaterials: Vaccines, Diagnosis and. *Molecules*, 21. doi:doi:10.3390/molecules21070867

- 13) Tostanoski, L. H., & Jewell, C. M. (2017). Engineering self-assembled materials to study and direct. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 114, 60-78. doi:10.1016/j.addr.2017.03.005
- 14) WHO. (7. April 2021). *New Hepatitis Data Highlight Need for Urgent Global Response*. Dohvaćeno iz World Health Organization: [www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitisreport2017/](http://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitisreport2017/)
- 15) Yan, Y., Wang, X., Lou, P., Hu, Z., Qu, P., Li, D., . . . Huang, Z. (2020). A nanoparticle-based HCV vaccine with enhanced potency. *The Journal of Infectious Diseases*, 221, 1304-1313. doi:10.1093/infdis/jiz228
- 16) Yetisgin, A. A., Cetinel, S., Zuvun, M., Kosar, A., & Kutlu, O. (2020). Therapeutic Nanoparticles and Their Targeted. *Molecules*, 25(2193). doi::10.3390/molecules25092193
- 17) Zhu, M., Wang, R., & Nie, G. (2014). Applications of nanomaterials. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 10(9), 2761-2774.