

Онколитические аденовирусы

(Adenoviridae)

С.В.Нетёсов

Новосибирский государственный
университет

Таксономическая ситуация внутри семейства Adenoviridae

Род Mastadenovirus

- Аденовирусы типов 1-51 (и более) человека, обезьян, мышей, коров, коз, собак, лошадей, овец, и т.д.

Род Aviadenovirus (вирусы птиц)

Род Atadenovirus (вирусы овец – название дано по причине первооткрытия этого типа вирусов у овец; встречаются также у рептилий, птиц, коз и опоссумов)

Род Siadenovirus (вирусы лягушек, индюков, других амфибий и птиц)

Род Ichtadenovirus (вирусы рыб)

Частица аденоовириуса в электронном микроскопе

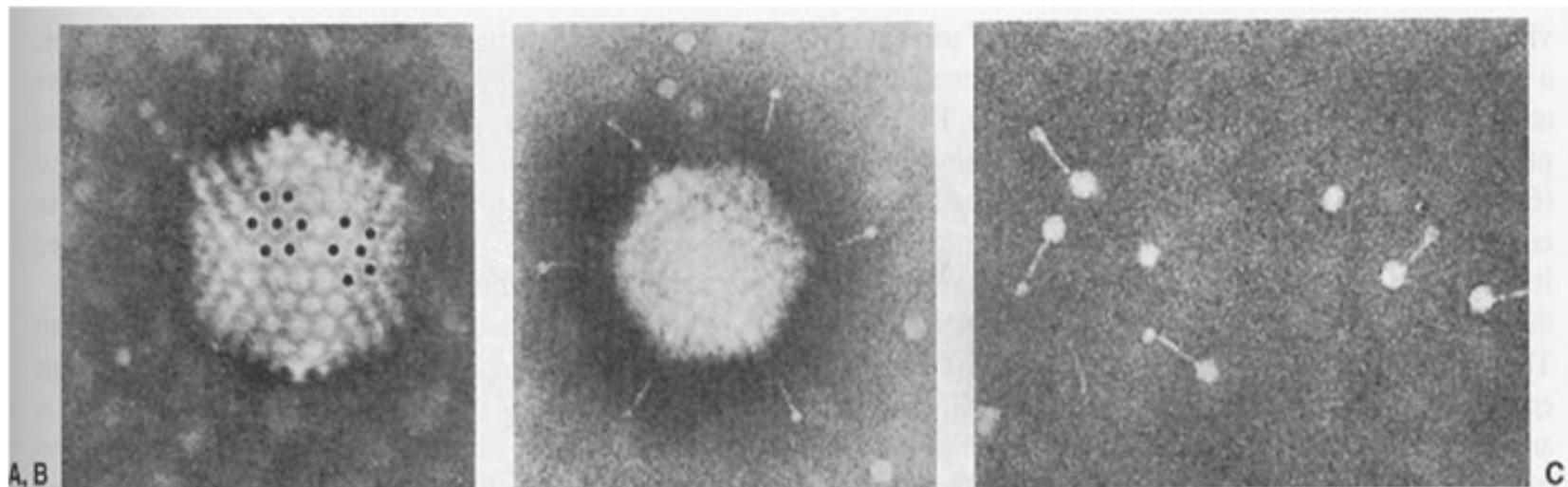
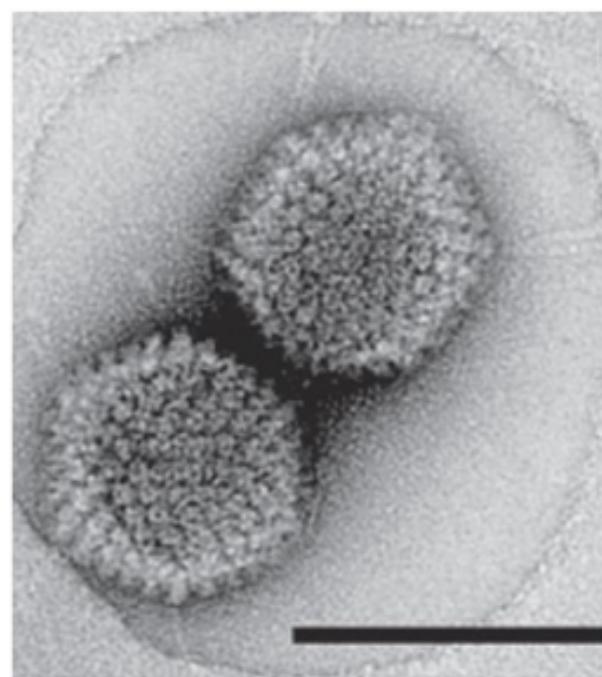
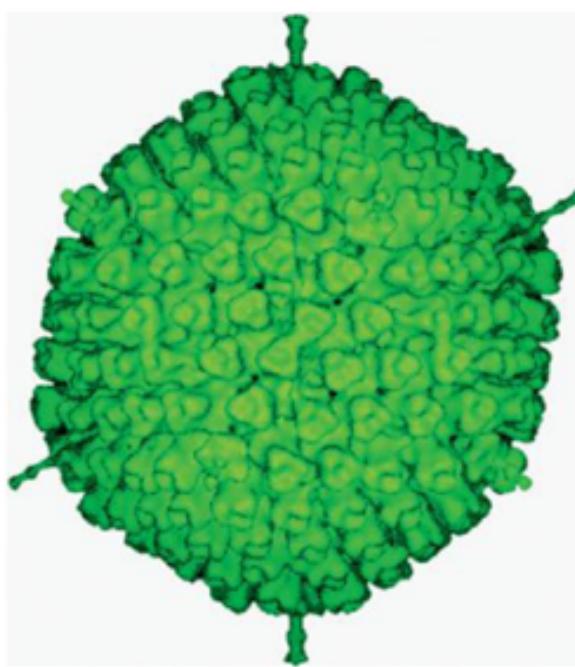


FIG. 1. Adenovirus type 5. A: The virion is an icosahedron. One of the 240 hexon capsomeres surrounded by 6 hexons and one of the 12 penton capsomeres surrounded by 5 hexons are marked (*dots*). B: Six of the twelve fibers that are present on each virus particle are shown projecting from penton capsomeres located at the vertices of the icosahedral capsid. C: Free penton capsomeres containing penton base and fiber. ($\times 285,000$.) From Valentine and Pereira (459), with permission.

Компьютерная модель и электронная микрофотография аденоовириуса



Характеристики вирионов

- Вирионы имеют икосаэдрическую форму с размерами от 70 до 90 нм
- Они НЕ ИМЕЮТ липидной оболочки
- Они состоят из белковой оболочки, окружающей ДНК-содержащую основу – Core
- Белковая оболочка состоит из 252 субъединиц\капсомеров, из которых 240 – гексонов и 12 пентонов. Как следует из их названий, пентон окружен 5 соседями, а гексон, соответственно, шестью.
- Каждый пентон состоит из основы (Base) и файбера (Fiber)
- Вирионы слабочувствительны к слабым кислотам и нечувствительны к растворителям липидов
- Вирионы могут быть инактивированы обработкой формалином, бета-пропиолактоном, гидроксиламином и окислителями

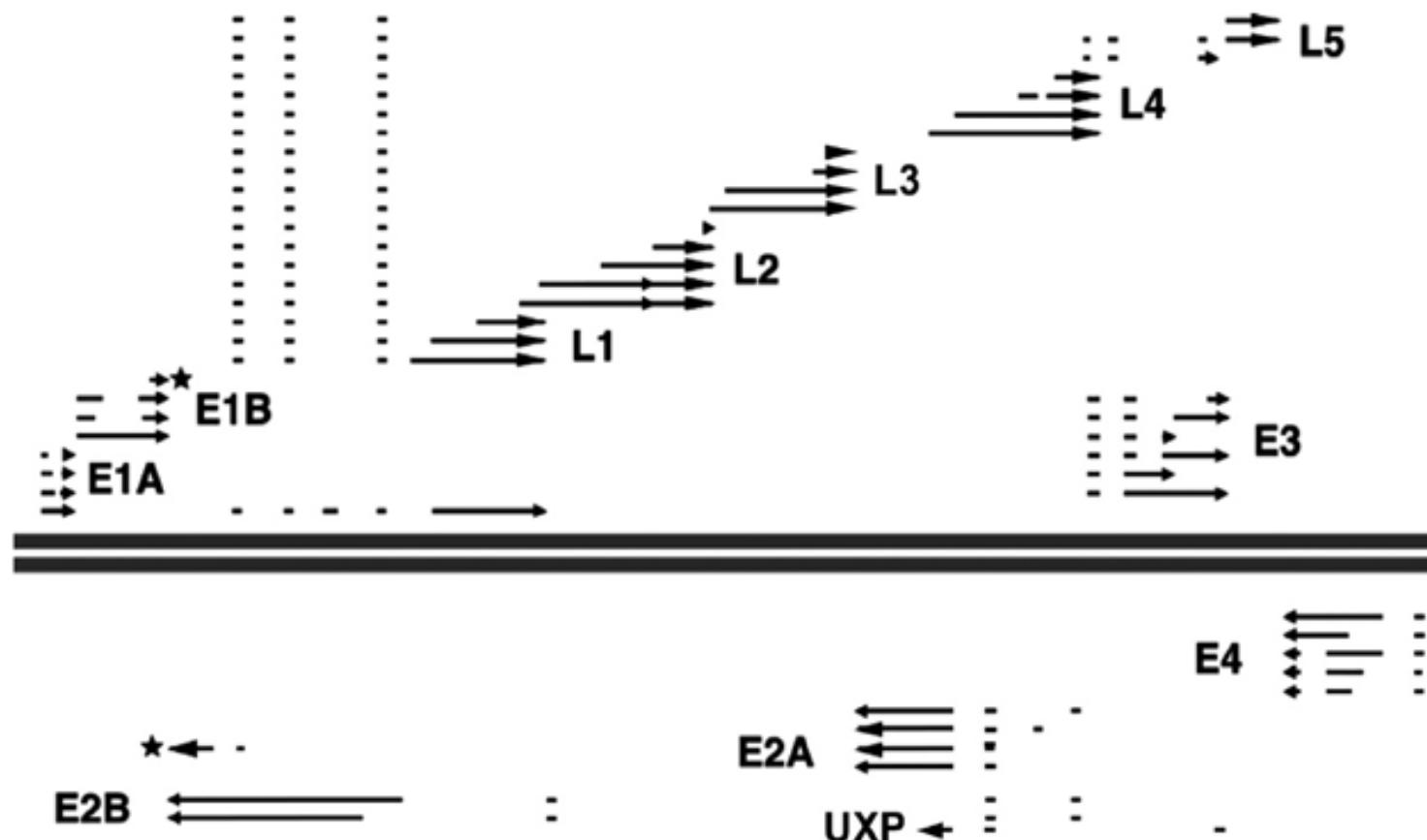
Белки аденоовирусов

- Согласно данным сравнения эл-форетического анализа белков и рамок считываания в геноме, в аденоовирусных вирионах около 11 белков
- Основу Гексона составляют три молекулы полипептида II (967 а-к). Полипептиды VI (217 а-к), VIII (134 а-к) и XI (139 а-к) ассоциированы с гексоновым белком, как и полипептид IIIa (566а-к).
- Пять молекул полипептида III образуют пентон. Полипептид IV (582 а-к) образует тримерный файбер, связывающий пентоновое основание (base) и вершину икосаэдрона. Комбинация пентона и файбера называется *пентоновым капсомером*.
- Кор вириона содержит, кроме геномной ДНК, 4 известных белка, три из которых : полипептиды V (368 а-к), VII (174 а-к) и Мю - (368 а-к). Все эти белки – основные, аргинин-богатые. Белок VII – основной белок Кора, похож на гистон; вокруг него как бы намотана\обернута ДНК. Функции белка Мю пока неизвестны.
- Четвертым белком Кора является «терминальный» белок. Его мол. Вес – 55 кД, и он ковалентно связан с 5'-оксигруппой цепи ДНК дизэфирной связью с сериновой бета-гидроксигруппой (остаток 562) терминального белка. Этот белок присутствует в вирионе в виде только 2 копий и является праймером для репликации ДНК. Он является так называемым «циркуляризующим» белком, поскольку опосредует циркуляризацию (закручивание) вирусной ДНК путем нековалентного, протеаза-чувствительного процесса.

Геном аденоовирусов

- Линейная двуцепочечная ДНК длиной между 26163 и 48395 оснований, зависит от серотипа.
- Содержит два сайта репликации, которые расположены в инвертированных терминальных повторах от 36 до 371 пар оснований каждый
- Вирусная хромосома содержит пять ранних транскрипционных единиц (E1A, E1B, E2, E3, E4), две «средне-поздних» единицы (IX и IVa) и одну - «основную позднюю».
- Транскрипция производится РНК-полимеразами II и III хозяина
- Репликация происходит в ядрах клеток

Схематическая картина транскрипции герома аденоовириуса типа 2. Параллельные линии показывают геном в 36 000 пар оснований. Точки, пунктиры и стрелки показывают сплайсированные структуры мРНК белков E1A, E1B, E2A, E2B, E3 и E4 – ранних белков. Большинство генов транскрибируются после генов белков E1B и белка IX цепи ДНК, считываемой вправо., и включает гены белков L1, L2, L3, L4 и L5. Промежуточные гены белков IX и IVa2 маркированы звездочкой (адаптировано из Wold, W.S. and Gooding, L.R. (1991). *Virology*, **184, 1–8.)**



Аденовирусы и вызываемые ими болезни

- Названы они так, потому что были впервые обнаружены в тканях аденоидов
- Инфицирование этим вирусом обычно происходит респираторным путем
- Очень много асимптоматических случаев инфекции
- Некоторые аденоны вызывают острое лихорадочное респираторное заболевание, но не являются причиной «простуды» - насморка
- Они ответственны только примерно за 5-10% респираторных заболеваний у детей и за еще меньшую долю их же у взрослых
- Кроме того, аденоны крайне редко вызывают эпидемические конъюнктивиты и детские гастроэнтериты
- Аденоны вызывают также болезни у животных
- Некоторые аденоны способны вызывать опухоли у мышей; у людей такие случаи неизвестны

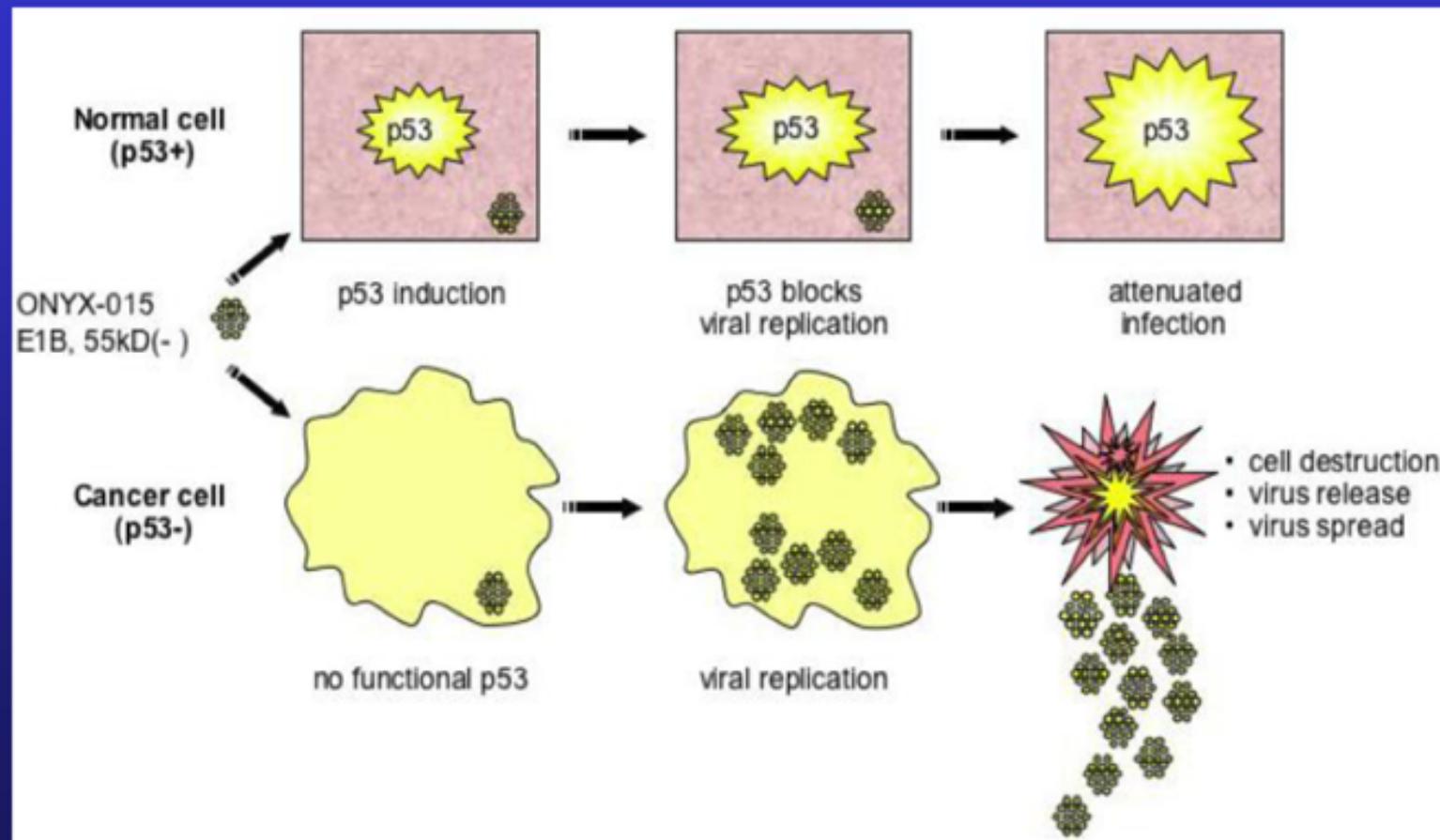
История ONYX 015

- Белок E1B, который производится адено вирусом, блокирует действие клеточного белка p53, вызывающего апоптоз, и не дает клетке погибнуть до размножения вируса.
- ONYX 015 был впервые разработан в 1987 году как мутант с делетированным геном E1B, неспособный выключать функцию p53. В 1996 году выяснилось, что он гораздо лучше размножается в клетках с дефектным p53, нежели в нормальных клетках. И тогда его запатентовали как потенциальный противораковый препарат, потому что в более чем 60% опухолевых клетках нарушена функция p53.
- В ряде клинических испытаний I и II фаз в США была показана его ограниченная эффективность при самостоятельном применении, но в то же время явный синергетический эффект при применении после хемотерапии или радиотерапии. Однако, в 2001 году финансирование клинических испытаний в США фирмой Пфайзер было прекращено по причине финансовых затруднений.
- В 2011 году испытания Гендицина - производного ONYX 015 – было начато фирмой Мерк, США.

История Н101 (Китай)

- Компания Shanghai Sunway Biotech, Китай была создана в 1997 году китайским ученым Hu Fang ,M.D., бывшим постдоком Университета Калифорнии. Ученые компании немного модифицировали вирус ONYX 015 путем делеции части E3 гена, кодирующего аденоовирусный белок смерти ADP, который в том числе отвечает и за иммунный ответ, и получили патент в Китае на него, назвав новый штамм Н101.
- Успех его клинических испытаний судя по всему в значительной степени был связан с отказом от лечения вирус-опосредованной лихорадки в фазе III, потому что Hu Fang решил после фазы II, что высокая температура поможет репликации вируса и усилению противоракового иммунного ответа, и что с ней не надо бороться. Последующие исследования в США поддержали его предположение. В Фазе III было пролечено 140 пациентов, с хорошим ответом на лечение. К сожалению, не удалось получить достоверные данные по их средней продолжительности жизни – пациенты были из отдаленных районов Китая.
- 17 ноября 2005 года китайская FDA разрешила применение Н101 в комбинации с хемотерапией для лечения поздних стадий рефракторного назофарингеального рака

ONYX-015 селективно реплицируется и убивает p53 дефектные опухолевые клетки



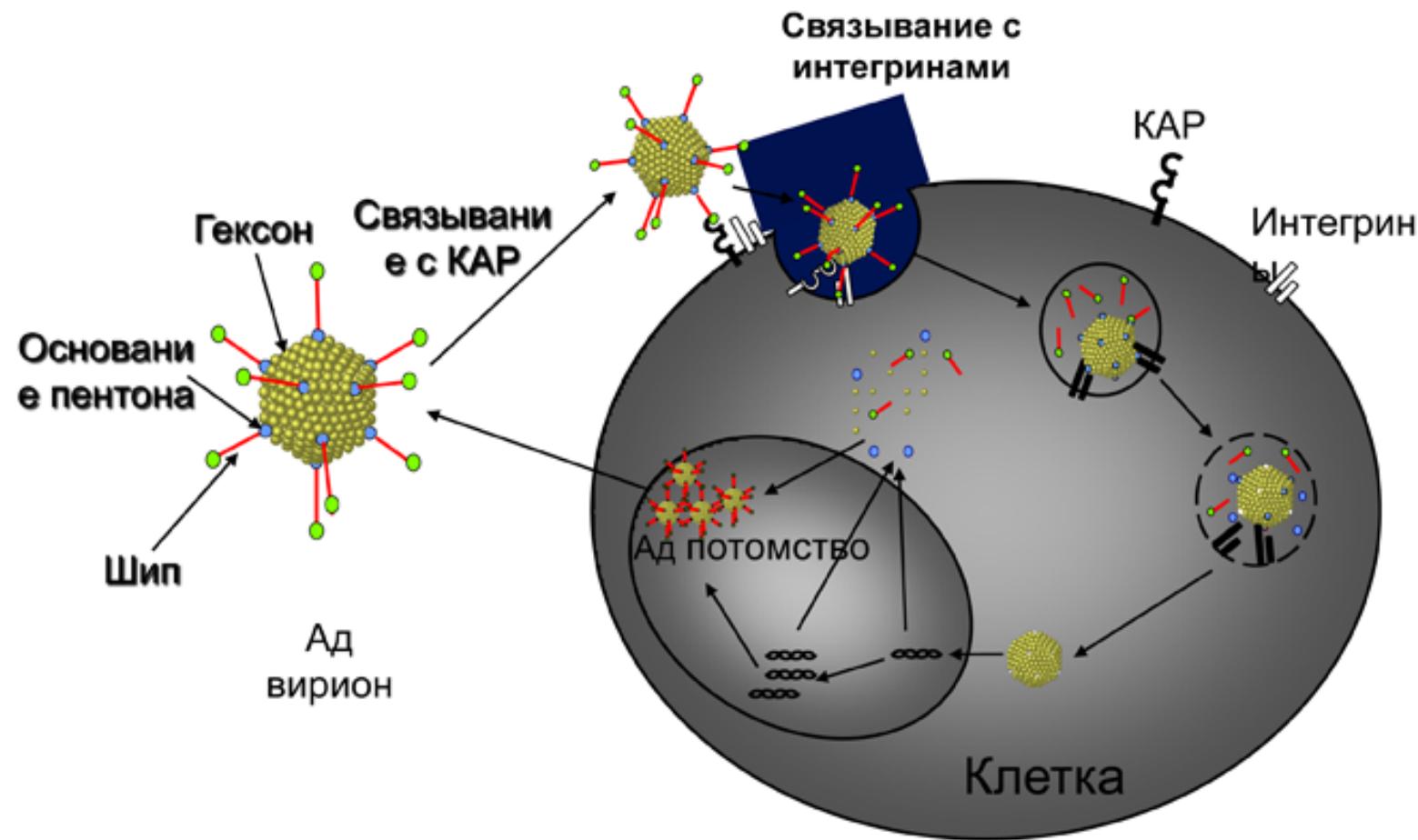
Аденовирусы - онколитики и их мишени

Вирус	Дефекты в вирусных генах	Вид терапии	Опухоли	Фаза клинических испытаний	Год
Ad: ONYX-015	E1B-55kD делеция	В сочетании с 5-фторуридином	Голова, шея	I,II и начало III, которая в США не была закончена	1997-2003
Ad – H101 (Китай)	E1B-55kD делеция И E3 делеция	В сочетании с 5-фторуридином	Голова, шея, назофарингеальный рак	I,II и III	2006
Ad+ wild type p53 gene	Replication defective Ad	Комбинация с радиотерапией – 60 Gy	Non-small cell lung cancer, non-operable	II фаза. Увеличение СПЖ	2003
Ad+HSV TK gene	Replication defective Ad	После резекции опухоли	Операбельная глиома	II-III фазы испытаний, СПЖ увел. В 2 раза	2004
Ad+HSV TK gene+Цит-деаминаза	Replication defective Ad	В комбинации 5-фтор-цит и 76Gy	Неметастазирующй рак простаты	I фаза, из 9 пациентов у 8 биопсия отрицательная	2007
Ad+HSV TK gene	Replication defective Ad	Комбинация с радиотерапией – 76 Gy	56 пациентов с низко- и высоко-рисковым раком простаты	I-II, все пациенты без воспалений л-узлов не имели осложнений в течение 2 лет	2004

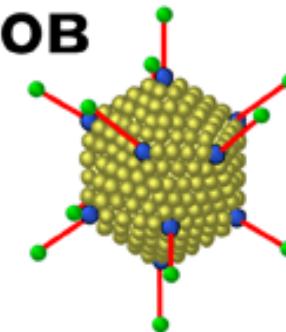
Аденовирусы - онколитики и их мишени – 2

Вирус	Дефекты в вирусных генах	Вид терапии	Опухоли	Фаза клинических испытаний	Год
Adenovirus INGN/ VRX-007	Нет дефектов; суперэкспр. E3- ADP-gene			Пока нет – идут доклинические испытания	2010
Ad типа ONYX015 со встройкой дикого p53	E1B-55kD делеция	Интраперитоне альное введение	Рак яичников	I и II фазы	2003-2004
Ad5+ wild type CMV-p53 gene	Нет дефектов. Экспрессия дикого p53	5 циклов введений	Неоперабельная эзофагеальная сквамозная карцинома, стойкая к хемо-радиотерапии	I и II фазы. Из 10 пациентов у 9 наступила стабилизация состояния	2006
rAd-p53	Нет дефектов. Экспрессия дикого p53	1x8 недель введение вместе с радиотерапией	Назофарингеальная сквамозная карцинома без метастазов	II-III фазы испытаний (82 пациента), СПЖ увеличилась на 25%	2009
rAd-p53	Нет дефектов. Экспрессия дикого p53	Две группы: инъекции в опухоль и в бр. Артерию либо просто в БА	3-4 стадии немелкоклеточного неоперабельного рака легкого	II фаза испытаний, 58 пациентов. Положительный ответ – при разных режимах – 47,3 и 38,4%	2009
Gendicine (Ad+wt-p53)	Нет дефектов. Экспрессия дикого типа p53	Комбинация с хемо- и радиотерапией	Все злокачественные опухоли	IV фаза испытаний в Китае . Фирмы Shengen SiBiono и Merck&Co	2012

Инфекционный цикл Ад5



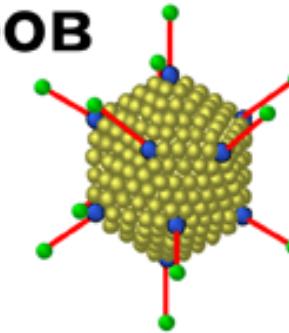
Аденовирусы в качестве векторов для генной терапии



Достоинства

- Способны инфицировать как делящиеся, так и покоящиеся клетки
- Позволяют встраивать протяжённые фрагменты ДНК (до 36 т.п.н.)
- Стабильны при введении *in vivo*
- Могут быть наработаны в высоких титрах
- Не являются онкогенными
- Обеспечивают высокий уровень экспрессии трансгена

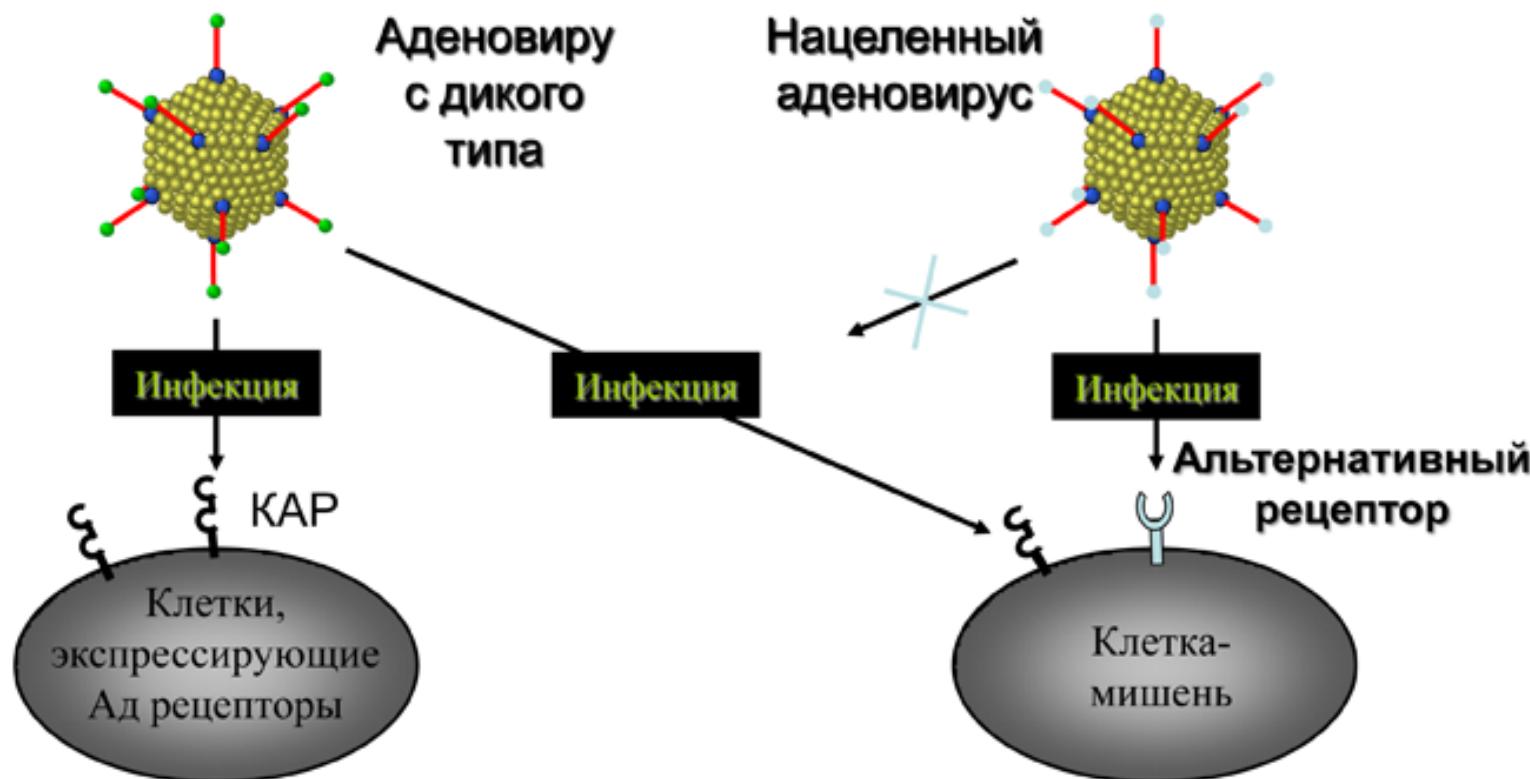
Аденовирусы в качестве векторов для генной терапии



Недостатки

- Неспецифичная трансдукция нормальных тканей
- Неспособность инфицировать определённые типы тканей

Концепция нацеленного аденоовирусного вектора – модификация шипа



Структура шипа Ад5



Хвостовой домен (ХД):

- содержит сигнал ядерной локализации
- взаимодействует с основанием пентона

Центральный домен (ЦД):

- содержит 22 псевдоповтора
- выносит глобулярный домен от поверхности вириона

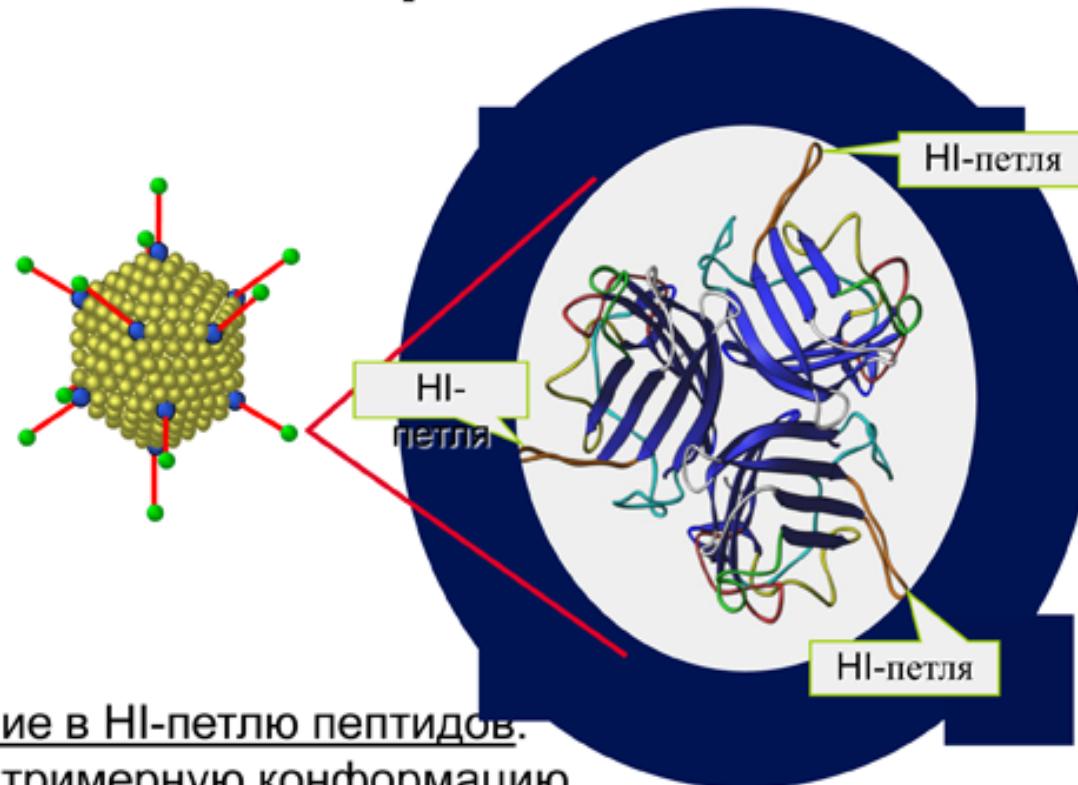
Глобулярный домен (ГД) :

- отвечает за тримеризацию шипа
- обеспечивает связывание с КАР

Стратегии нацеливания Ад векторов:

- I. Модификация глобулярного домена шипа**
- II. Замещение шипа химерными молекулами**

НI-петля глобулярного домена шипа – сайт для встраивания пептидов

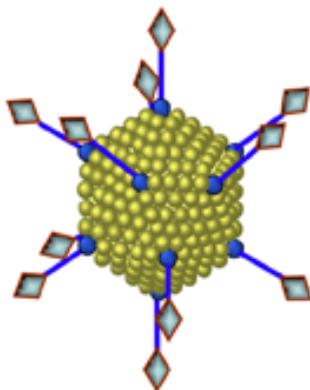


Встраивание в НI-петлю пептидов.

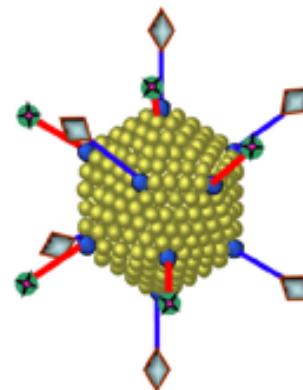
- не нарушает тримерную конформацию шипа
- нацеливает вирус к альтернативному рецептору

Мозаичные вирионы, включающие шипы двух типов

Гипотеза: химерный белок не является полноценной заменой шипа дикого типа, потому что его функции, вероятно, не ограничиваются только связыванием с клеткой



Вектор, включающий
шип-фибритин-CD40L химеру



Вектор, включающий химерный
белок и полноразмерный шип Ад с
мутацией в сайте связывания с КАР

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ВЫВОДЫ

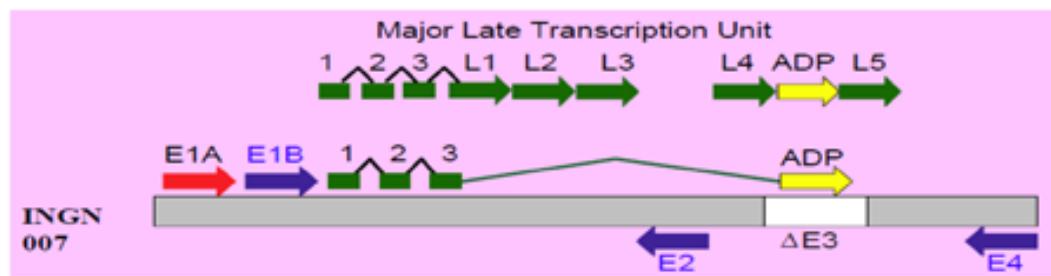
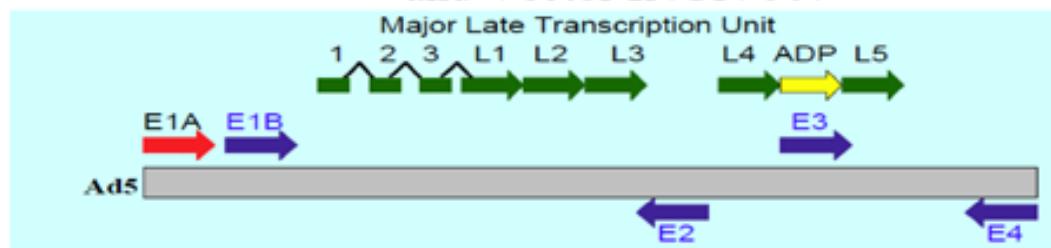
1. Получена серия Ад векторов, содержащих в НI-петле глобулярного домена шипа встройки полипептидных последовательностей длиною от 13 до 111 а.о. Выявлено, что увеличение размера глобулярного домена не оказывает существенного влияния на продуктивность, инфекционность или связывание вируса с КАР, хотя, в целом, наблюдается обратная корреляция между размером встройки и этими параметрами.
2. Установлено, что RGD-трипептид в составе удлинённых НI-петель способен эффективно взаимодействовать с интегринами и функционировать как нацеливающий вирус лиганд.
3. Выявлено, что вазоактивный полипептид тонкого кишечника, будучи встроенным в удлинённые НI-петли шипа Ад5, не связывается со своими природными рецепторами, но способен вступать в заряд-обусловленное взаимодействие с неидентифицированными молекулами на поверхности клеток.
4. С целью замещения шипа в Ад капсиде, сконструирована химерная молекула, состоящая из амино-концевого фрагмента шипа Ад5, фибритина бактериофага T4 и лиганда. Установлено, что фибритин способен поддерживать стабильную тримерную конформацию всего химерного белка и, что химера эффективно встраивается в Ад вирионы.

5. Продемонстрировано, что химерные шипы в составе Ад обеспечивают эффективную КАР-независимую, опосредованную лигандом трансдукцию клеток.
6. Установлено, что замещение шипа дикого типа на химерный не влияет на продуктивность вирусной инфекции и протеолитический процессинг капсидных белков.
7. Выявлено, что инфекционность вектора, несущего химерный шип, может быть увеличена за счёт включения в его капсид дополнительного полноразмерного шипа Ад5, неспособного связываться с КАР.
8. Продемонстрировано, что вирус с химерным шипом, содержащим в качестве нацеливающего лиганда ФНО-подобный домен CD40L человека, в 4-1000 раз более эффективно, чем вирус с шипом дикого типа, трансдуцирует CD40-положительные дендритные и раковые клетки человека.

Новые тенденции: Отказ от излишней аттенуации ОВ

на начальной стадии работ по разработке онколитических вирусов приоритет отдавался их безопасности. Репликативную активность ОВ ограничивали опухолевыми клетками посредством модификации вирусного генома. Однако, те же модификации приводили к сниженной репликации онколитического вектора в опухолевых клетках в сравнении с диким типом вируса. В настоящее время считается, что глубокой аттенуации ОВ не требуется.

Genome Structure of Natural Adenovirus (Ad5) and Vector INGN 007



ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕПЛИКАЦИОННО-ДЕФЕКТНЫХ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ЭЛИМИНАЦИИ КЛЕТОК ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

Онколитические аденоовириусы, способные реплицироваться в клетках опухоли

- 1) экспрессия чужеродных цитотоксических белков или повышение экспрессии собственных цитотоксических белков аденоовириусов.**
- 2) экспрессия генов, повышающих токсичность пролекарств**
- 3) экспрессия генов цитокинов и других иммуномодуляторов**
- 4) экспрессия суперантителогенов**
- 5) экспрессия антиангиогенных факторов**

МЕХАНИЗМЫ СПЕЦИФИЧНОСТИ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ АДЕНОВИРУСОВ И СПОСОБЫ ИХ УСИЛЕНИЯ

- 1) ДЕЛЕЦИЯ ВИРУСНЫХ ГЕНОВ
- 2) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОПУХОЛЕВО- ИЛИ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ПРОМОТОРОВ
- 3) ИЗМЕНЕНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ
- 4) МЕТОДЫ БИОСЕЛЕКЦИИ
- 5) ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ АДЕНОВИРУСОВ
- 6) ИЗМЕНЕНИЕ ОПУХОЛЕВОГО МАТРИКСА
- 7) ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДОПОЛНИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ ДОСТАВКИ

Использование аденоовирусов животных

Преодолимые трудности

- Сейчас уже несколько групп в мире развивают данное направление. Основным возражением пока что является адаптивный иммунный ответ на вводимый вирус: сможет ли вирус убить опухоль раньше чем иммунная система поборет вирусы? Есть два способа с этим бороться : подавить иммунный ответ иммуносупрессорами или использовать последовательно разные онколитические вирусы.
- Также до сих пор стоят вопросы безопасности при применении вирусов. Все помнят пенсильванского юношу Jesse Gelsinger, который умер при попытке генной терапии с помощью adenovirusa в 1999 году. Но недавно разработанные онколитические вирусы, включая Onyx15, даже избыточно безопасны, и при их введении далеко не достигаются непереносимые дозы, а, кроме того, схема введения предусматривает сейчас тест на переносимость.
- Успех китайских ученых и врачей в части испытаний H101 резко изменил ситуацию, и в последние 5 лет наблюдается бурный рост разработок в этой области

Заключение

- В многочисленных клинических исследованиях (см. Clinical trials.gov) показана относительная безопасность и переносимость подавляющего большинства разрабатываемых онколитических вирусов.
- Эффективность онколитических вирусов имеет несомненную клиническую перспективу, хотя как средство монотерапии их пока применять рано. Проведенные к настоящему времени клинические исследования свидетельствуют о перспективности их использования после хемо- и радиотерапии, поскольку в этом случае иммунный ответ опухолевых клеток и организма ослаблен.
- Получает все большее распространение тенденция к конструированию онколитических вирусов, сочетающих в себе сразу несколько механизмов, обеспечивающих и высокую селективность, и увеличение эффективности воздействия по отношению к опухолевым клеткам
- Сейчас разрабатываются не только сами вирусы-онколитики, но и средства их специализированной доставки, а также схемы применения.