

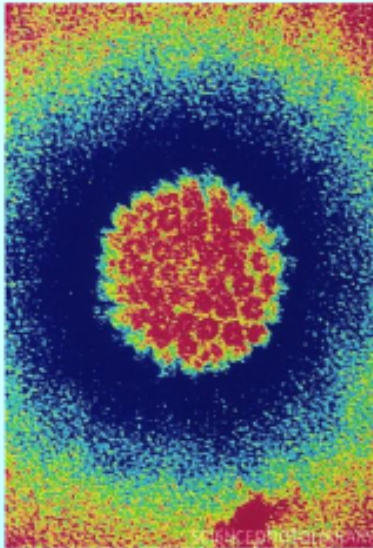
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕРПЕСВИРУСОВ В ОНКОТЕРАПИИ

Кочнева Г.В., д.б.н.

**Зав. лабораторией ФБУН ГНЦ ВБ
«Вектор»**



Герпесвирусы



- **Herpes - от греч. «Ползучий»**
- **Широко распространены**
- **среди высших эукариот**
практически все подвержены
инфекции герпесвирусами
- **Инфицированность среди**
людей – около 95%

International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV Herpesvirus Study Group

Вместо семейства *Herpesviridae* был создан более
высокий таксон – порядок *Herpesvirales*, который
включает 3 семейства:

1. *Herpesviridae* (млекопитающие, птицы и рептилии)

α-герпесвирусы (alphaherpesvirinae)

β-герпесвирусы (betaherpesvirinae)

γ-герпесвирусы (gammaherpesvirinae)

подсемейство неклассифицируемых вирусы

2. *Alloherpesviridae* (амфибии)

3. *Malacoherpesviridae* (прочие)

В природе насчитывается восемь типов вирусов из семейства
Herpesviridae , вызывающих болезнь человека .

Немного истории

1911г. - обнаружен Varicella zoster virus, являющийся возбудителем ветряной оспы и опоясывающего герпеса, H.Aragao.

1912г. - впервые выделен вирус простого герпеса W. Gruter.

1956г. - впервые изолирован цитомегаловирус.

1964г. - обнаружен вирус Эпштейна-Барр канадскими учеными M. Epstein, B. Achong и J.Barr при электронной микроскопии культуры лимфобластов больного лимфомой Беркитта.

1986г. - выделен герпесвирус 6-го типа Salahuddin и соавторами из лимфоцитов периферической крови пациентов с различными лимфоретикулярными заболеваниями и зараженных ВИЧ.

1994г. - методом ПЦР обнаружен герпесвирус человека 8-го типа у больных с различными типами саркомы Капоши.

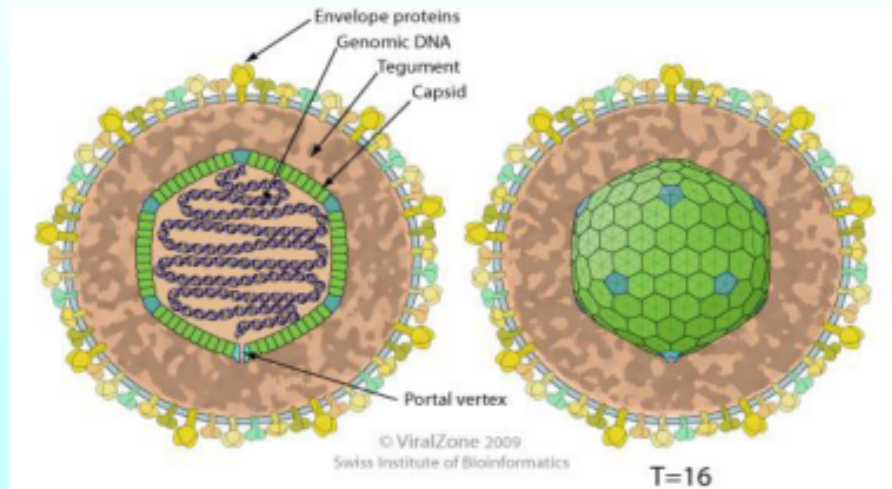
Вирусы герпеса человека

Тип	Вид	Заболевание
Human Herpes Virus type 1 (HHV-1)	Вирус простого герпеса 1 (HSV-1, ВПГ-1)	Оральный и генитальный герпес, чаще оральный (герпетический стоматит, губной герпес)
Human Herpes Virus type 2 (HHV-2)	Вирус простого герпеса 2 (HSV-2, ВПГ-2)	Оральный и генитальный герпес, но чаще генитальный и вагинальный
Human Herpes Virus type 3 (HHV-2)	Вирус ветряной оспы VZV, ВЗВ	Ветряная оспа (варицелла), опоясывающий лишай (зостер)
Human Herpes Virus type 4 (HHV-4)	Вирус Эпштейна-Барр EBV, ВЭБ	Инфекционный мононуклеоз, лимфома Беркитта, лимфомы ЦНС у больных с иммунодефицитным синдромом, посттрансплантанный лимфопролиферативный синдром (PTLD), назофарингиальная карцинома
Human Herpes Virus type 5 (HHV-5)	Цитомегаловирус CMV, ЦМВ	Инфекционный мононуклеоз, ретинит, гепатит
Human Herpes Virus type 6 (HHV-6)	Розеоловирус	Детская розеола (розеола инфантум) и экзантема (экзантема сибитум)
Human Herpes Virus type 7 (HHV-7)	Розеоловирус	Синдром хронической усталости (СХУ) (?), часто выявляется в виде микста с HHV-6
Human Herpes Virus type 8 (HHV-8)	Герпес вирус , ассоциированный с саркомой Капоши (KSHV)	Саркома Капоши, первичная лимфома серозных полостей, некоторые разновидности болезни Кастельмана

Вирусы герпеса человека

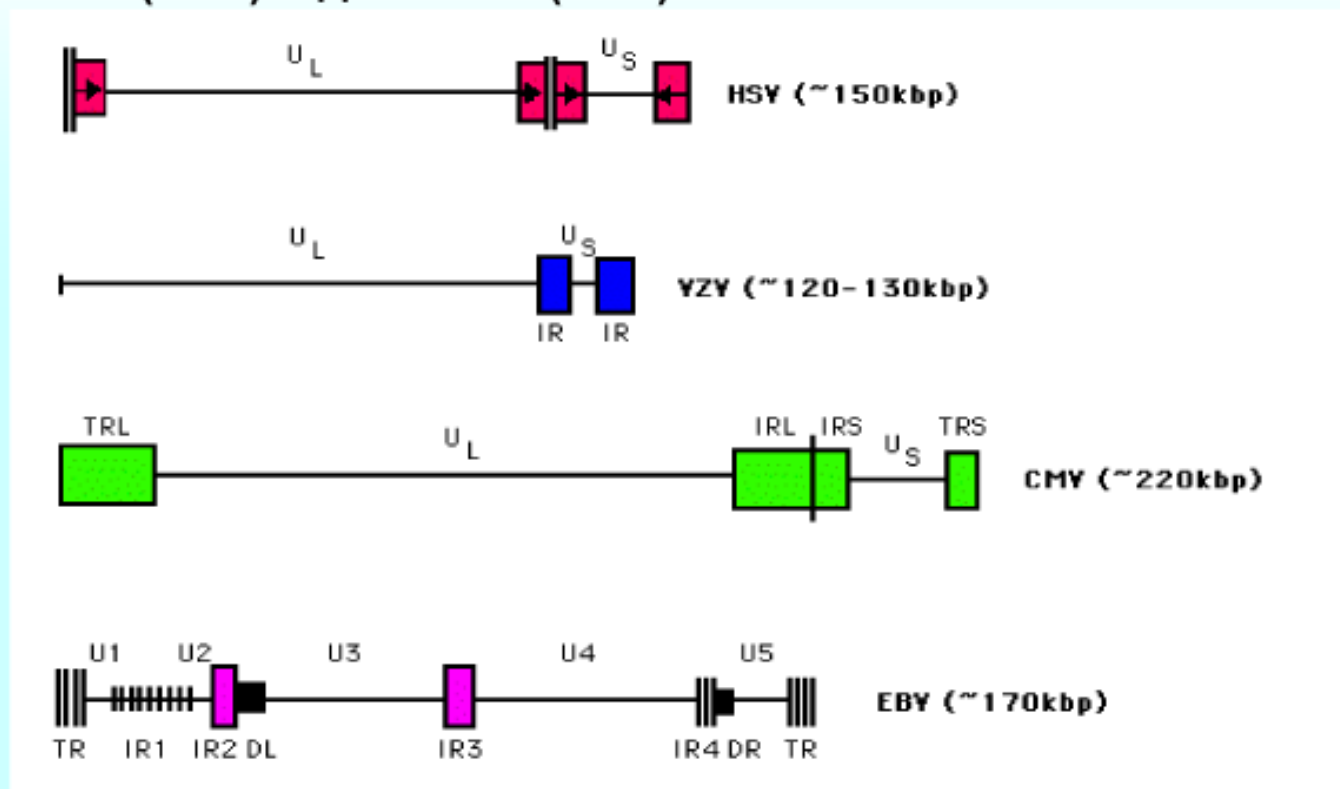
- ***α -подсемейство*** : ВПГ 1-2, ВЗВ
 - быстрый репродуктивный цикл
 - быстрое распространение в клеточной культуре
 - лизис зараженных клеток
- ***β -подсемейство*** : ЦМВ, ВГЧ-6,7
 - продолжительный репродуктивный цикл
 - медленное распространение в клеточной культуре
 - зараженные клетки часто увеличиваются в размере (цитомегалия)
 - легко возникает и поддерживается персистентная инфекция в культуре
- ***γ -подсемейство*** : ВЭБ, ВГЧ-8
 - инфекционный процесс часто останавливается на прелитической или на литической стадии, латентная инфекция

Структура герпесвирусов

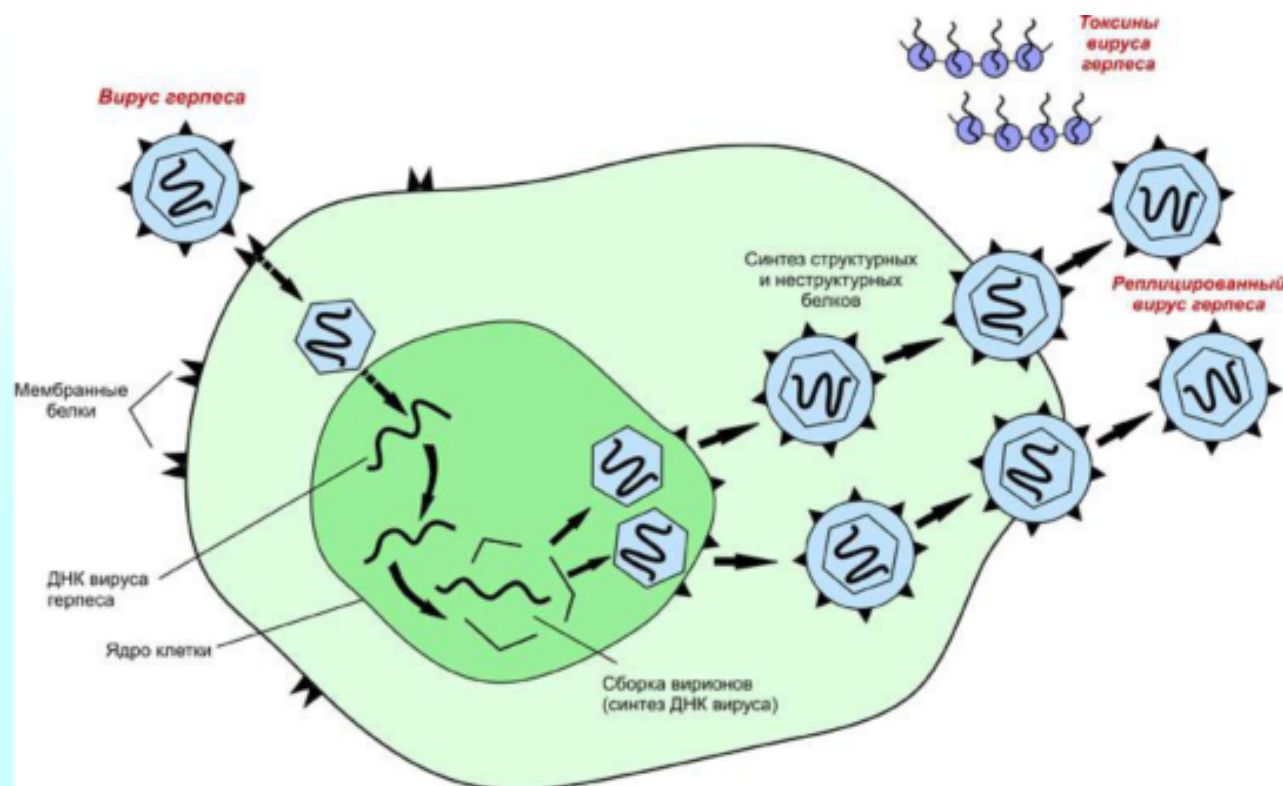


- Вирионы имеют сферическую форму диаметром около 300 нм. Внутри зрелой вирусной частицы содержится 35—45 различных белковых молекул.
- В центре вириона - икосаэдрический капсид размером около 125 нм. Капсид состоит из 162 капсомеров, сборка его происходит в ядре зараженной клетки.
- Вокруг капсида – аморфный белковый «тегумент» – суперкапсидная оболочка.
- Наружная оболочка вириона, образующаяся из мембраны зараженной клетки и содержащая поверхностные гликопротеины вируса.

Геном герпесвирусов представлен двунитевой линейной молекулой ДНК (124-230 т.п.н.), кодирует более 90 генов, содержит короткий (18%) и длинный (82%) компоненты.



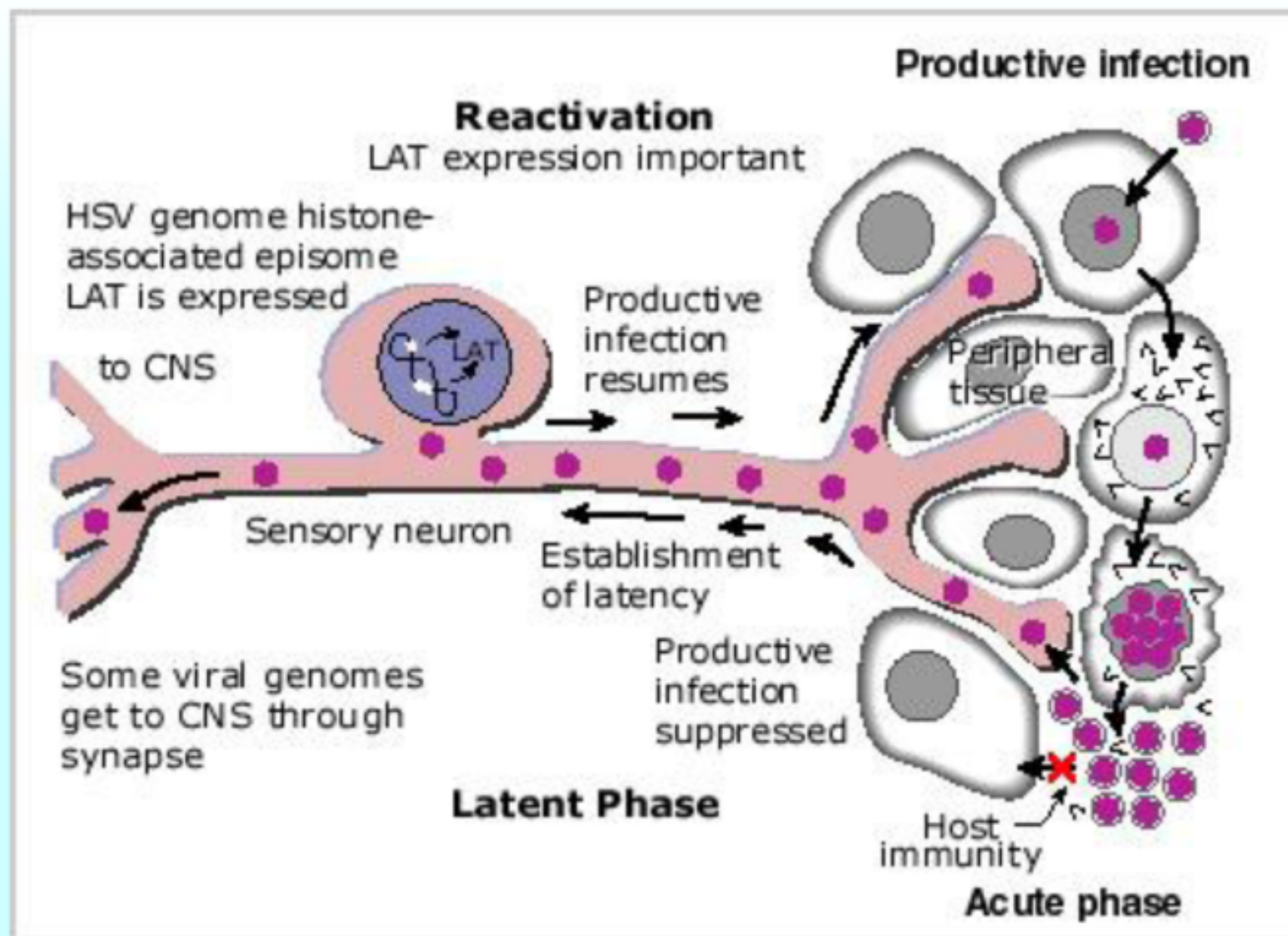
Большинство геномов имеют длинную (U_L) и короткую (U_S) последовательности, ограниченные инвертированными повторами. Повторы делают возможными перестановки уникальных районов и геномы могут представлять собой смесь до 4 изомеров, различающиеся ориентацией U_L и U_S районов.



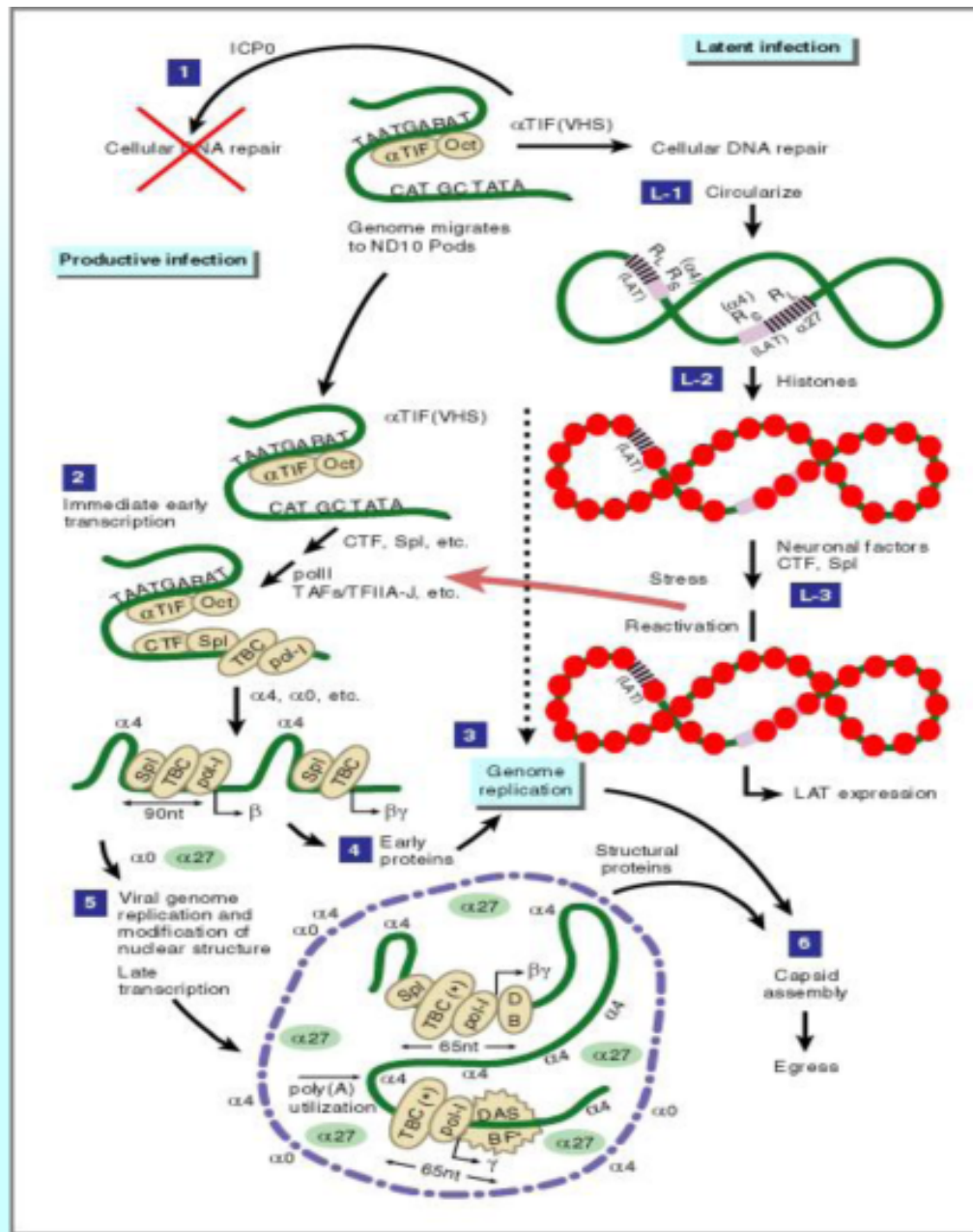
Механизм размножения вируса герпеса (продуктивная инфекция)

Проникновение вируса герпеса в клетку происходит путем взаимодействия вируса с рецепторами на мембране клетки. Соединяясь с рецептором, вирус герпеса теряет часть своих оболочек, "раздевается" и уже в таком виде двигается в клетке, цель его передвижения - ядро клетки. На мембране ядра герпесвирус полностью "раздевается", оставляя снаружи ядра еще одну оболочку. В ядре происходит собственно размножение вируса - репликация ДНК. Вирус как бы заставляет клетку хозяина работать на себя, т.е. участвовать в образовании новых вирусов. Одна клетка дает несколько миллионов вирусов. После сборки новых ДНК происходит синтез оболочек вируса - тегумента и суперкапсида. Для их построения вирус использует мембрану ядра пораженной клетки, нарушая ее целостность.

Продуктивная и латентная фазы развития вируса



Продуктивная и латентная фазы развития вируса



Особенности ВПГ, позволяющие использовать его для получения генно-терапевтических векторов

- ❖ ВПГ обладает широким «кругом хозяев» за счет использования большого количества клеточных белков в качестве рецепторов для проникновения в клетки
- ❖ ВПГ высоко инфекционен и лизирует клетки с высокой скоростью
- ❖ Почти половина из около 90 известных вирусных генов несут существенные для роста в тканевых культурах и к тому же могут быть делетированы для создания места в геноме для экзогенных трансгенов и удаления функций, существенных для вирусной вирулентности и токсичности *in vivo*
- ❖ Разработаны схемы получения рекомбинантных ВПГ, несущих гены биологически активных пептидов
- ❖ Латентный режим вируса может быть использован для стабильной долговременной экспрессии терапевтических трансгенов в нейронах

Гены вирулентности ВПГ

ген	Белок	функция
UL39 UL40	рибонуклеотид редуктаза (RR)	конверсии rNTPs в dNTPs в нейронах, обеспечение репликации в неделящихся клетках (нейронах)
UL41	virion-host shut off (vhs)	дестабилизирует RNAs хозяина и останавливает трансляцию
RL1 (2 копии в геноме)	ICP34.5, фактор вирулентности	обеспечивает избирательную трансляцию вирусных РНК, ингибитор аутофагии
UL23	тимидинкиназа (ТК)	обеспечение репликации в неделящихся клетках (нейронах)

Удаление этих генов приводит к аттенуации ВПГ и избирательной репликации в активно делящихся клетках – опухолях. Именно ТК- мутанты ВПГ впервые показали возможность направленной модификации вирусного генома с целью адресного лизиса опухолевых клеток (Martuza, 1991).

ТК ген-убийца и продраг-терапия

- ТК ген вируса простого герпеса + ганцикловир. Тимидинкиназа фосфорилирует нуклеозидный аналог ганцикловир, который включается в растущую цепь ДНК во время клеточного деления и терминирует ее, тем самым обеспечивая гибель раковой клетки.
- Показано, что если хотя бы 10% опухоли содержат ТК-ген ВПГ, то может быть достигнута полная элиминация опухоли. Это обусловлено наличием у ТК ВПГ эффекта соседа («bystander effect») – передача фосфорилированного ганцикловира в соседние клетки через клеточные контакты.
- Для получения суицидального эффекта в аттенуированные за счет делеции ТК-гена ВПГ вводится гетерологичный ТК-ген: в ВПГ-1 вводится ген ВПГ-2 и наоборот. Такое конструирование не приводит к возвращению исходной нейровирулетности вируса, но обеспечивает гибель раковых клеток при введении ганцикловира и предотвращает репликацию вируса в случае осложнений.

Онколитические препараты на основе репликативно-компетентных ВПГ векторов – все получены путем генно-инженерной модификации генома

Штамм ВПГ	Модификация	Стадия испытаний
R7020 (NV1020)	Делеция одной копии гена ICP34.5 + делеция gG, D, I и E	Фаза I и II клинических испытаний (США), рак печени, метастазы колоректального рака
G207	Делеция обеих копий ICP34.5 + разрушение UL39 (RR)	Фаза I, IB и II клинических испытаний(США) глиома, рецидивирующий рак мозга, астроцитомы, глиобластома
OncoVex GMCSF	Делеция обеих копий ICP34.5 + делеция гена ICP47 (встройка гена ГМ-КСФ)	Фаза II/III клинических испытаний, рак молочной железы, рак головы и шеи, меланома

ICP47 - ингибирует МНС class I путь презентации вирусных антигенов предупреждением связывания антигена с ТАР

Онколитические препараты на основе репликативно-компетентных ВПГ векторов (1)

- Первый препарат - штамм NV1020 (раньше R7020) , который был создан как вакцинный на основе ВПГ-1 в конце 1980-х – начале 1990-х годов путем делеции одной копии гена ICP34.5 и замены области генома, кодирующая гликопротеины G, D, I и E гомологичным регионом из ВПГ-2.
- Штамм NV1020 в настоящее время находится в фазе I и II клинических испытаний для пациентов с раком кишечника, который имеет метастазы в печень и имеет проверенную устойчивость к химиотерапии.
- Это первый штамм, показавший эффективность при внутрисосудистом введении для остановки метастазирования в печени.
- На его основе получен ряд других онколитических штаммов:
 - NV1023 – дополнительно заменены два gP ВПГ-1 на ВПГ-2 - эффективен в комбинации с ионизирующим излучением в линиях холангиосаркомы человека, рака поджелудочной железы;
 - OncSyn и OncdSyn – введены мутации в гены gp – редуцируют опухоли молочной железы в доклинических испытаниях.

Онколитические препараты на основе репликативно-компетентных ВПГ векторов (2)

- Штамм G207 – следующий по хронологии перспективный онколитический герпесвирусный штамм. Содержит делецию в обоих ICP34.5 локусах и вставку lac-Z гена в RR гене. Эти множественные мутации предотвращают реверсию к дикому типу.
- Штамм G207 поддерживает чувствительность к стандартной анти-HSV терапии, такой как ацикловир, так как TK ген остается неповрежденным.
- В настоящее время штамм G207 внесен в официальные списки для следующей фазы Ib/II испытаний как противоопухолевый агент при злокачественных глиомах.
- В доклинических испытаниях штамм G207 также был эффективен против рецидивирующий рака мозга, астроцитомы, глиобластомы.

Онколитические препараты на основе репликативно-компетентных ВПГ векторов (3)

- Наиболее успешным онколитическим препаратом на основе ВПГ является OncoVexGMCSF, получен из клинического изолята F ВПГ-1. Обладает повышенной онколитической активностью.
- В геноме этого вируса сохранен ТК-ген для проведения, в случае необходимости, лекарственной терапии, но удалены обе копии ICP34.5 гена, и встроен ген ГМ-КСФ в район ICP47, продукт которого ингибирует MHC class I путь презентации вирусных антигенов предупреждением связывания антигена с TAP.
- OncoVexGMCSF в настоящее время проходит II/III стадии клинических испытаний для лечения меланомы, рака молочной железы, солидных опухолей головы и шеи.

Недостатки ВПГ как противоопухолевого агента

- Онколитический потенциал модифицированных штаммов вируса герпеса во многих случаях при клинических испытаниях оказался недостаточным для остановки роста опухолей.
- Это связано со слабой способностью ВПГ к диссеминации в опухолевой массе и
- Отсутствием способности диссеминации к отдаленным пораженным местам от места начального введения и метастазам.
- В связи с этим остается необходимость проведения дополнительной радио- и химиотерапии, но при этом
- На фоне иммуносупрессии повышается вероятность генерализации герпетической инфекции и поражения здоровых тканей мозга.

Дальнейшие пути усовершенствования ВПГ как противоопухолевого агента

- **Изменение вирусного тропизма за счет модификации поверхностных белков – рецепторов вируса.**
- **Введение трансгенов, увеличивающих противоопухолевую активность – ИЛ-4, ИЛ-12, факторы слияния мембран.**
- **Введение анти-онкомаркеров в вирусную оболочку (например anti-HER2 single-chain antibody в gD) для селективного связывания с определенным типом опухолевых клеток.**
- **Использование опухолевых или ткане-специфических промоторов, обеспечивающих адресную экспрессию трансгенов.**
- **Недостатком этой стратегии является то, что промоторы не активируются одновременно во всех опухолевых клетках и что не все клетки будут инфицированы. Как результат, подгруппа (подкласс) опухолевых клеток будет иметь преимущественный селективный рост, и выжившие клетки приведут к рецидиву опухоли.**

Заключение

Для успеха виротерапии рака наиболее целесообразно применять этот метод в дополнение к уже разработанным и применяемым методам хирургического удаления опухолей, химио- и радиолучевой терапии или совместно с ними.

Кроме того, наиболее эффективно, по-видимому, в каждом случае использовать несколько вирусных препаратов с разным механизмом действия.

Спасибо за внимание

