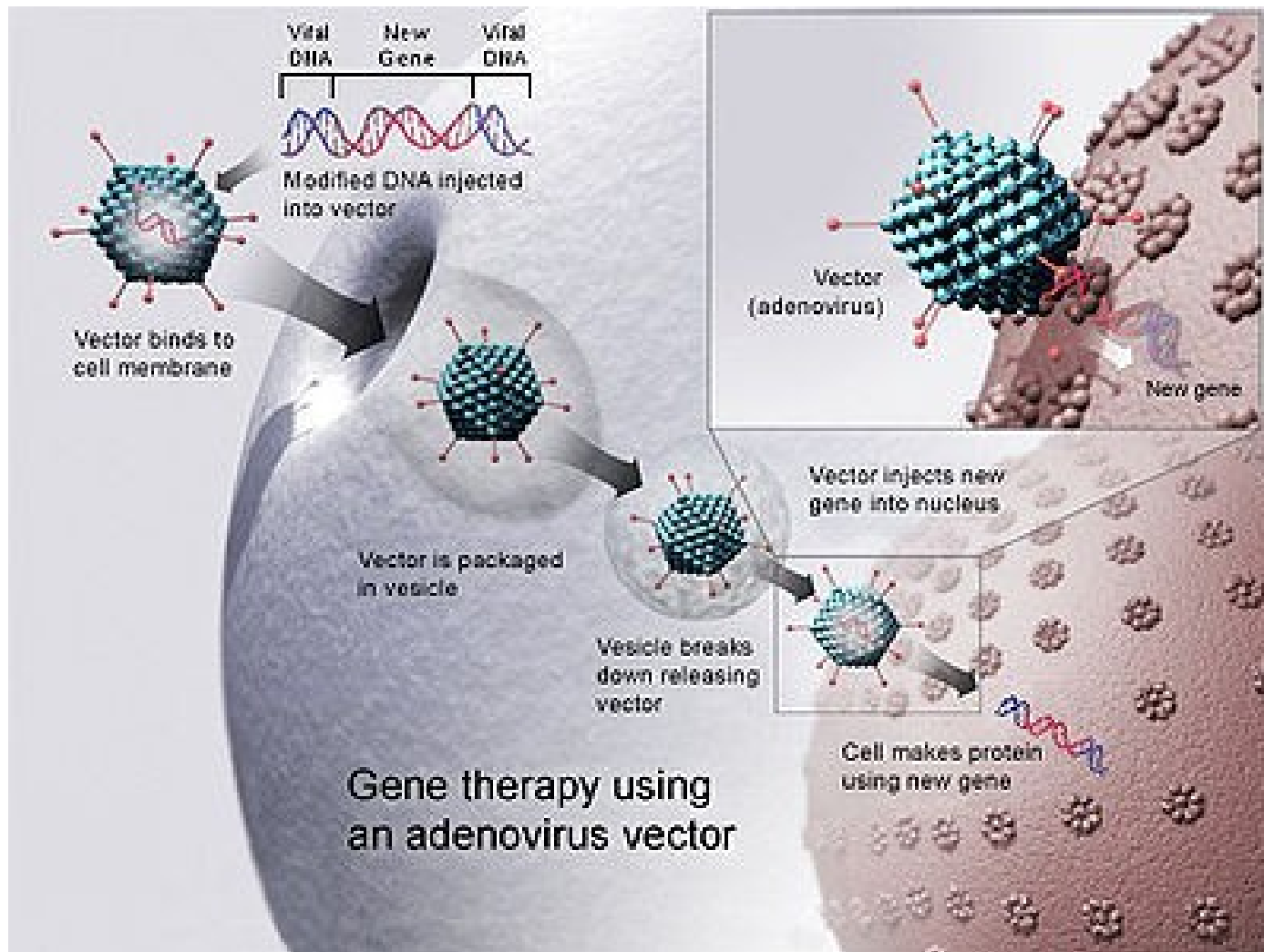
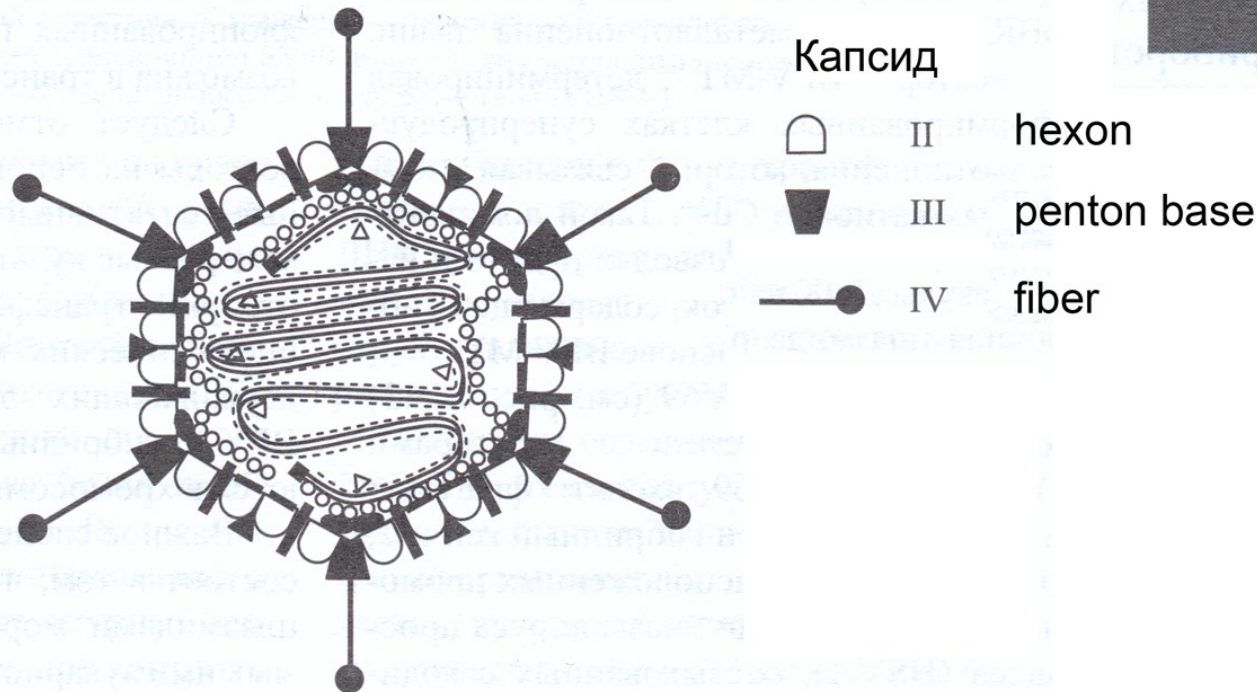
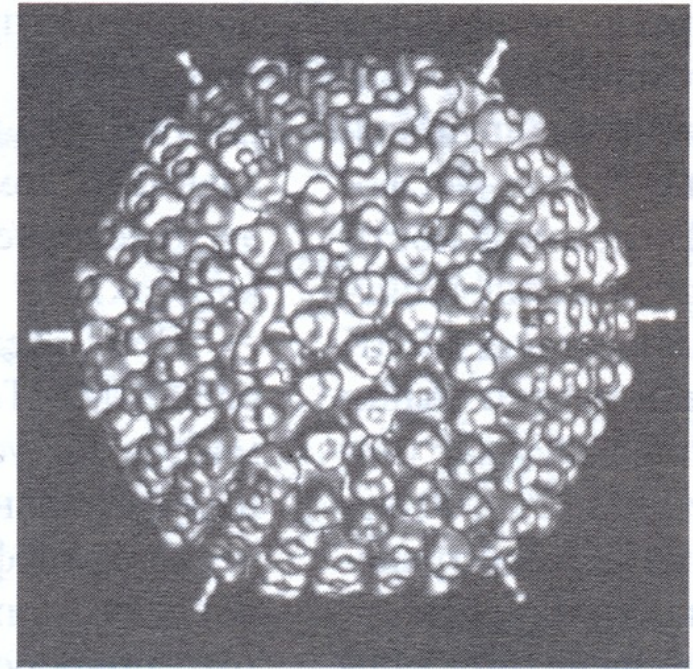


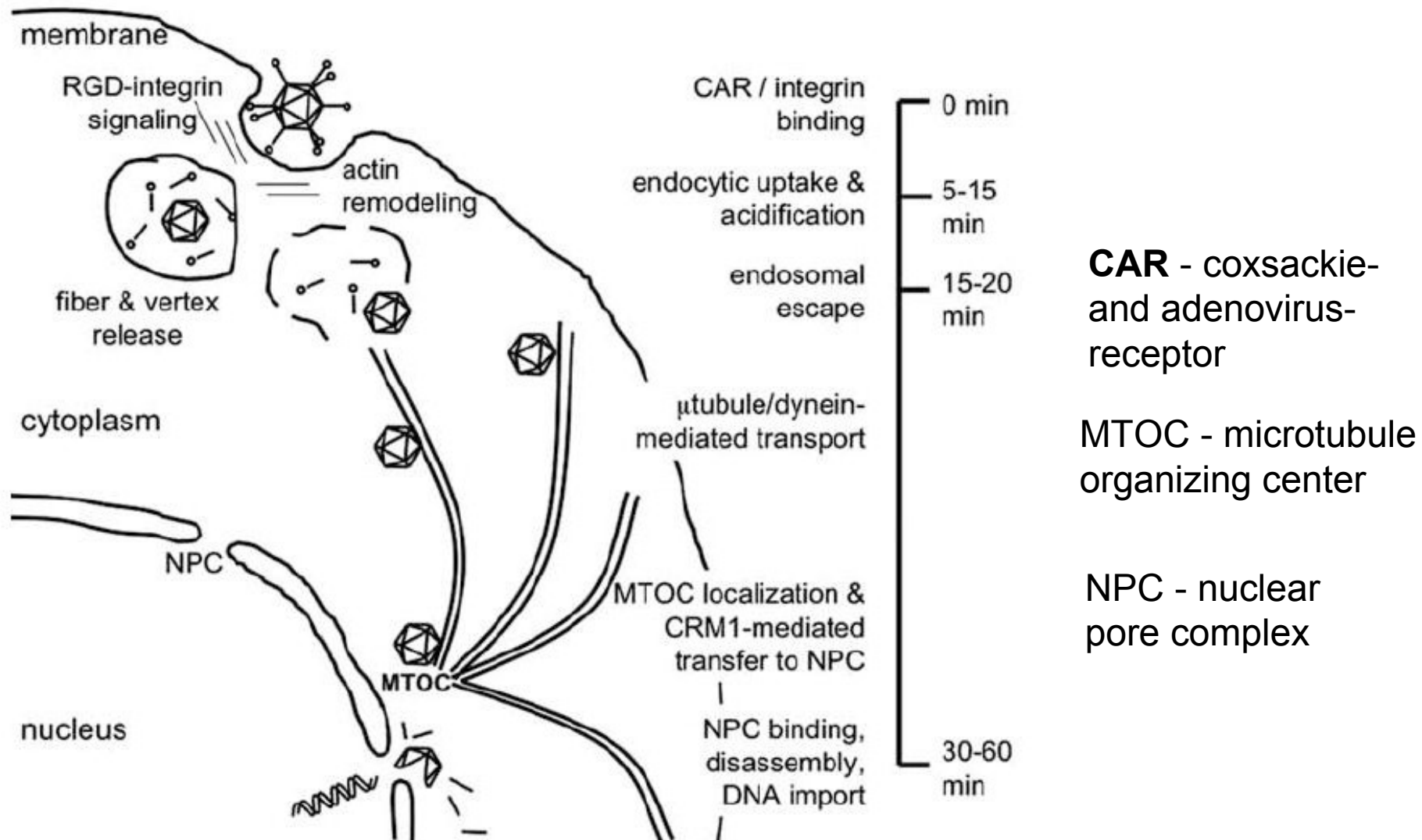
Аденовирусные векторы



Вирион аденовируса –
икосаэдрический белковый
капсид, в который упакован
геномсодержащий кор (core)



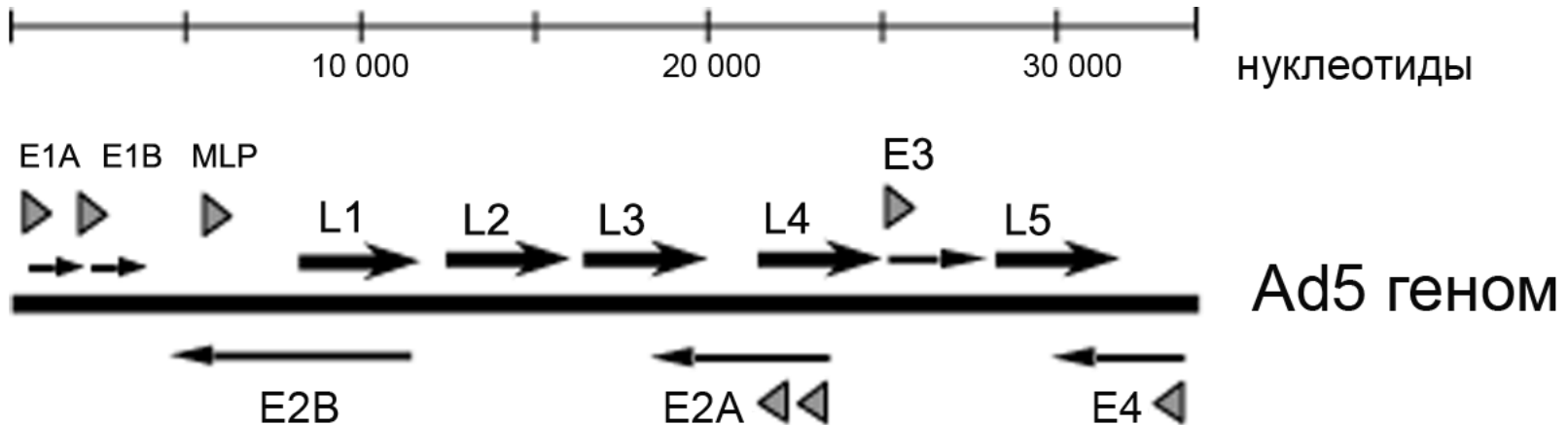
Жизненный цикл аденовируса



Жизненный цикл аденовируса

- Взаимодействие шипа (fiber) капсида аденовируса с рецептором **CAR** (coxsackie- and adenovirus-receptor);
- RGD-мотив капсидного белка penton base взаимодействует с интегринами на клеточной поверхности. Это служит сигналом для **эндоцитоза**.
- Эндосома – переход вирусной частицы в цитоплазму - разборка капсида – транспорт с участием микротрубочек вирусного кора к ядру – эффективный транспорт в ядро.
- **Репликация** зависит от **ITR** (inverted terminal repeats, 100-140 b.p.). Праймером для репликации Ad2 служит вирусный белок 80 kD с присоединенным dCTP.
- Поочередная репликация цепей (без образования фрагментов Оказаки). Белок 80 kD расщепляется вирусной протеазой, на концах ДНК остается ковалентно связанный **TP** (terminal protein) 55 kD.
- Сборка вириона происходит в ядре.
- Лизис с высвобождением 10^4 - 10^5 вирусных частиц на каждую клетку через 30-40 часов после инфекции.

Геном аденовируса



E1A – активатор транскрипции ранних генов E1B, E2A, E2B, E3, E4;

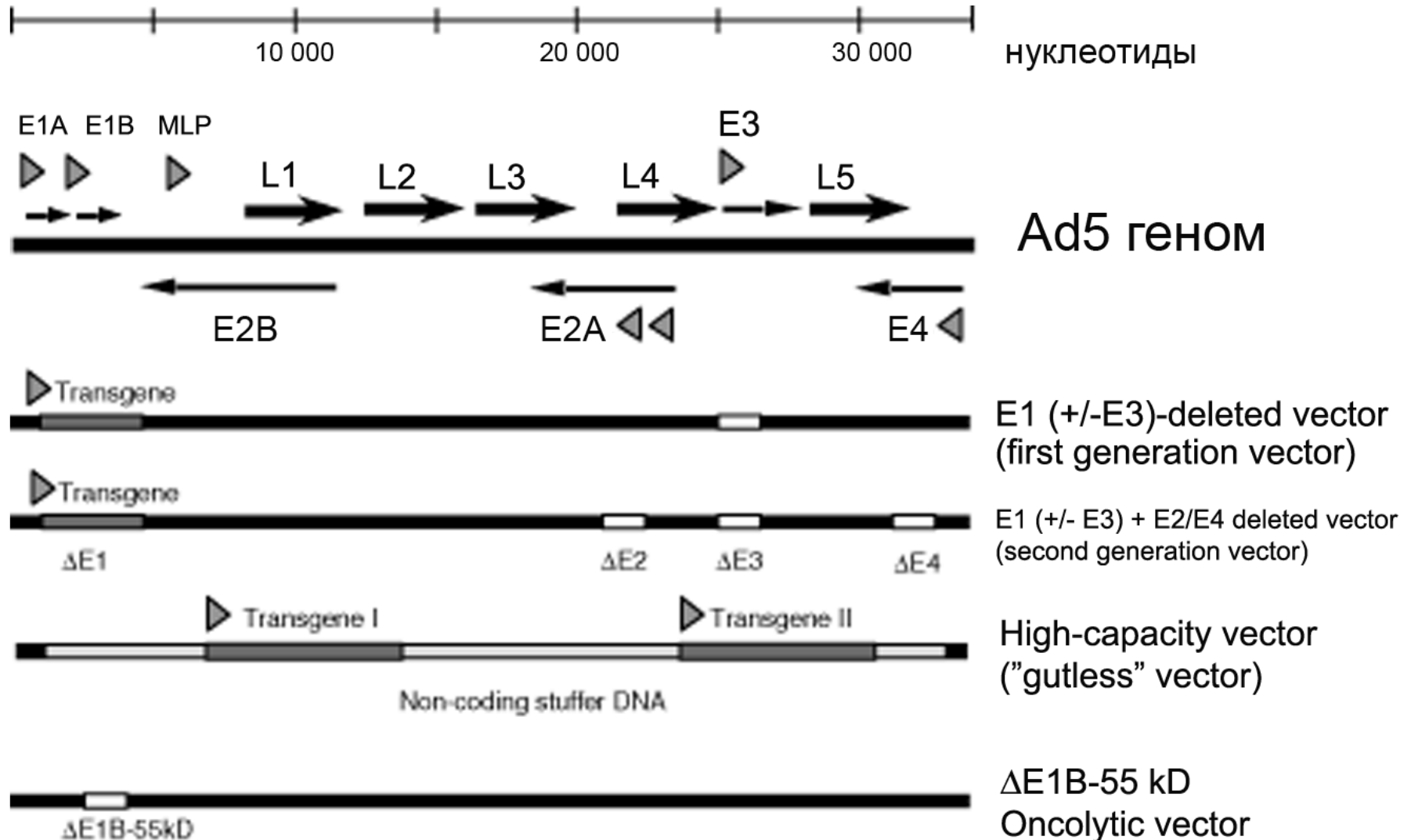
E1A, E1B – трансформирующая активность;

E2 – белки репликации (ДНК-полимераза, ДНК-связывающий белок, предшественник терминального белка TP)

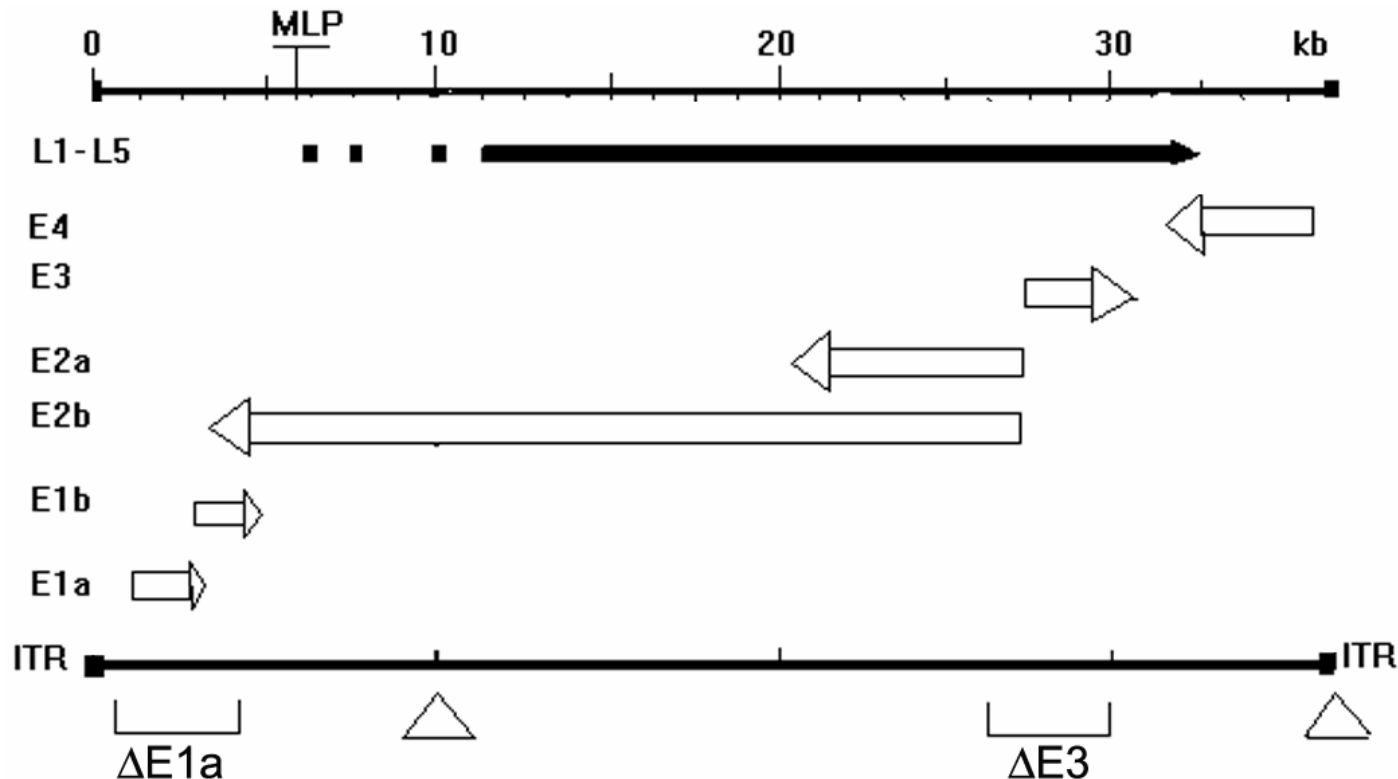
E3 – белки молекулярной мимикрии (предотвращают транспорт антигенов МНС на поверхность инцизированной клетки). Снижение иммунного ответа.

MLP (major late promoter) – промотор поздних генов.

Основные виды аденовирусных векторов



Структура аденовирусного вектора, независимого от хелперного вируса



MLP – Major Late Promotor

E1-E4 – ранние гены;

L1-L5 – поздние гены;

ITR - Inverted Terminal Repeats;

Скобки – области генома, которые могут быть заменены чужеродной ДНК

Свойства хелпер-независимых аденовирусных векторов

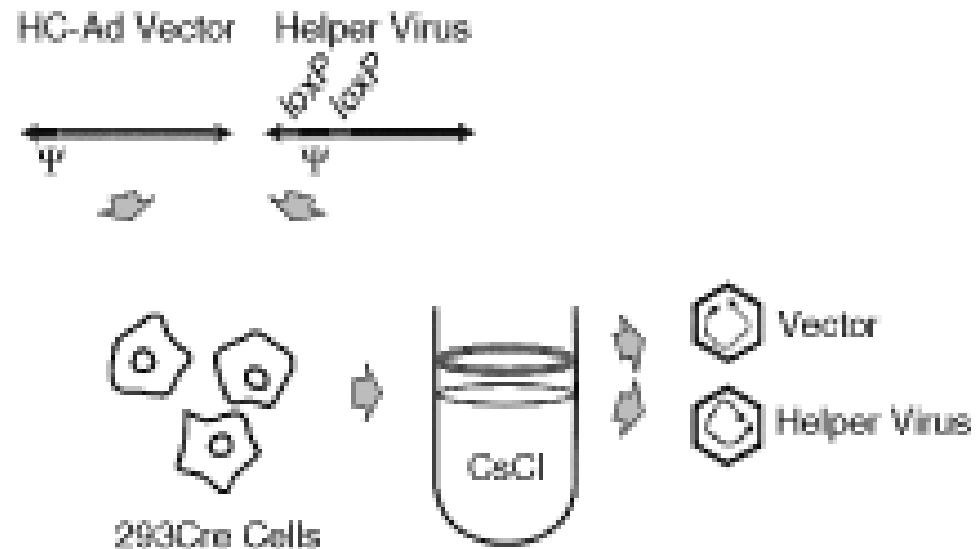
- Замена E1 на трансген. Дополнительная делеция E3. Емкость 8 kb.
- Так как удалены транс-активирующая и трансформирующая активности E1, то вектор не реплицируется в клетках-мишенях.
- Для продукции вектора необходимо экспрессировать E1 in trans в упаковочной клеточной линии (HEK293);
- Преимущества:
- Высокий титр 10^{12} - 10^{13} частиц на мл;
- Трансдуцируются как делящиеся, так и не делящиеся клетки.
- Находится в ядре в виде эписомы. Минимальный риск инсерционного мутагенеза.
- Недостатки:
- Токсичность и иммуногенность продуктов вирусных генов;
- Низкая емкость.
- Векторы второго поколения – дополнительные делеции или инаktivация продуктов генов E2 и/или E4.

Зависимые от хелпера «выпотрошенные» (“gutless”) Ad векторы с высокой емкостью

- Содержат только **ITR** на концах и сигнал упаковки (Ψ).
- Емкость до 36 kb (упаковывается ДНК длиной 28-36 kb).
- Для продукции вектора используют хелперный вирус, содержащий все вирусные гены кроме E1, и частично дефектный сигнал упаковки (рекомбинантная векторная ДНК с сигналом упаковки дикого типа имеет преимущество в образовании вирусных частиц).
- Недостатки:
- Низкая эффективность производства хелперного вируса;
- Амплификация сигнала упаковки в хелперном вирусе приводит к снижению выхода упакованного вектора и его загрязнению хелперным вирусом.

Удаление сигнала упаковки хелперного вируса с помощью сайт-направленной рекомбинации

- Сигнал упаковки хелперного вируса фланкируют сайтами ***loxP*** или ***frt***.
- Рекомбинантный вектор производят в клетках **HEK293**, конститутивно экспрессирующих рекомбиназу **Cre** или **Flp**.
- После коинфекции этих клеток хелперным вирусом, его сигнал упаковки вырезается посредством рекомбинации.
- Хелперный вирус теряет способность упаковываться.
- После нескольких раундов амплификации **HC-Ad** вектор может быть дополнительно очищен от примеси хелперного вируса центрифугированием в градиенте плотности **CsCl**.



Клинические применения

- 1993 г. – первый пациент, для которого использована генная терапия с участием Ad вектора.
- Сотни примеров для лечения рака (I и II стадии), моногенных заболеваний (cystic fibrosis), несколько онколитических векторов для терапии рака (III стадия).
- Терапевтический эффект оказался довольно скромным.
- Основные недостатки – низкая эффективность доставки генов к клеткам-мишеням и короткое время их экспрессии.
- Достаточная безопасность.
- Однако, в 1999 г. 18-летний пациент с дефицитом орнитин транскарбамилазы (ОТС) умер после приема высокой дозы Ad вектора второго поколения, несущего функциональный ген ОТС.
- Причиной стал шок вызванный каскадом цитокинов вследствие системного введения вектора.

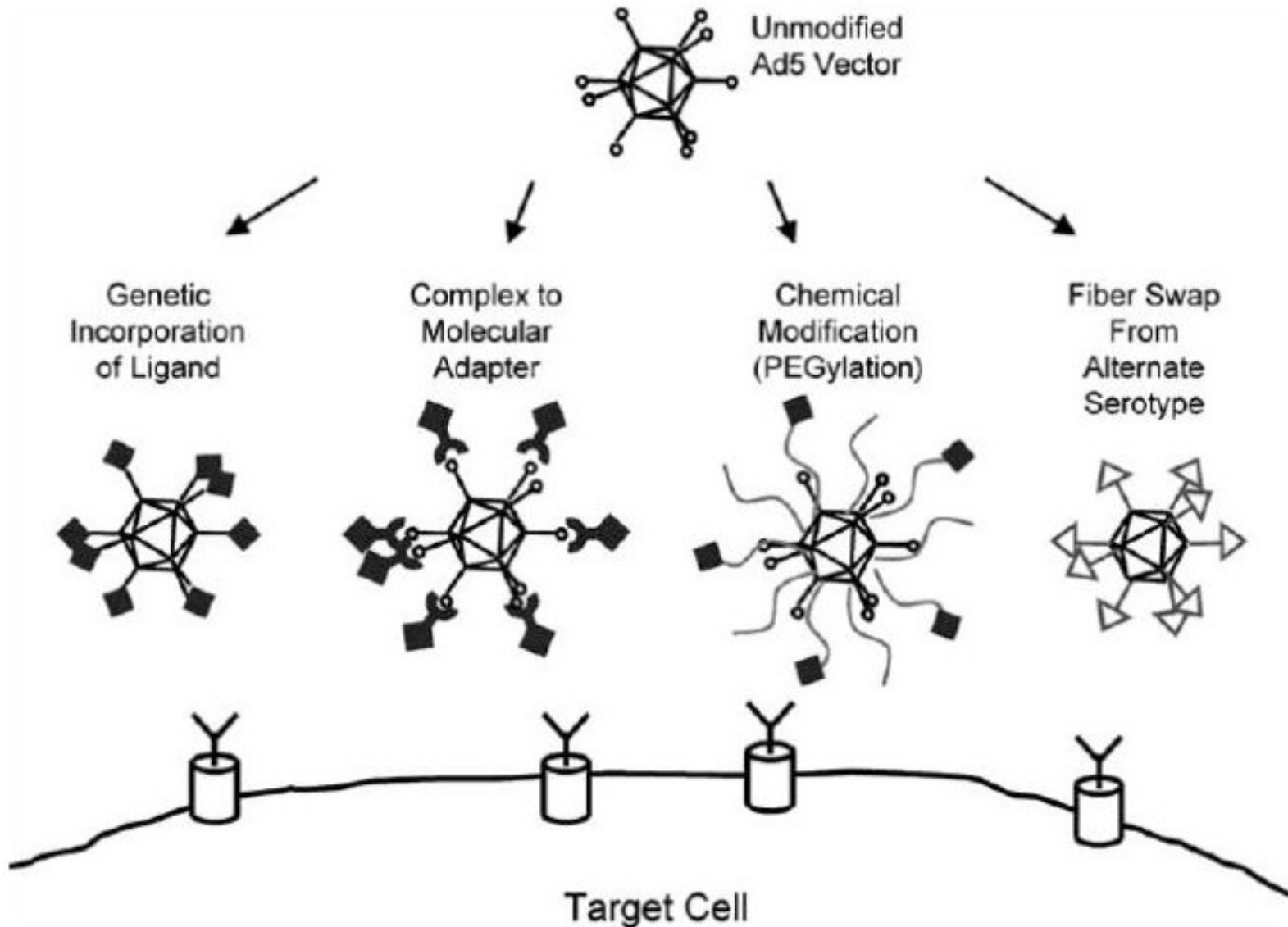
Проблемы токсичности, безопасности и иммуногенности

- **1. Рекомбинация** между левой частью ДНК Ad вектора первого поколения или хелперного вируса с частично перекрывающимися E1 последовательностями генома клеток HEK293 может привести к появлению E1-положительного **репликативно-компетентного аденовируса**. Для усиления безопасности создаются более современные упаковочные клеточные линии, содержащие не перекрывающиеся фрагменты области E1.
- **2.** Помимо клеточного иммунного ответа на вирус-специфические белки (7 дней после введения вируса), при **системном введении вируса** возникает острый ответ (первые часы) за счет поглощения макрофагами печени (**Kupffer cells**) и обильной экспрессии цитокинов.
- Способ борьбы – временное удаление Kupffer cells перед введением аденовируса посредством бифосфонатных лекарств.
- **3.** Ткане-специфические нейтрализующие антитела могут мешать повторному введению Ad вектора.
- Способы борьбы – последовательное использование векторов, основанных на аденовирусах **разных серотипов**, а также использование **аденовирусов животного происхождения** для повторного введения.

Стратегии долговременной экспрессии в пролиферирующих клетках

- Долговременная экспрессия Ad вектора в неделящихся клетках достигается путем использования «выпотрошенного» вектора **HC-Ad**. Однако, он быстро элиминирует из пролиферирующих клеток.
- Для **контролируемой эписомальной репликации** рекомбиназа **Cre** была экспрессирована с Ad вектора с целью вырезания фланкированного элементами **loxP** фрагмента ДНК, содержащего **трансген, oriP и EBNA-1** вируса Эпштейна-Барр in cis или in trans. После циркуляризации содержащая трансген эписома была способна автономно реплицироваться синхронно с клеточным циклом.
- **Химерный вектор аденовирус-ретровирус.**
- Пролиферирующие клетки превратили во временные продуценты ретровирусных частиц. Их трансдуцировали двумя Ad векторами, которые содержали гены упаковочных белков (**gag-pol-env**) и LTR-фланкированную последовательность **ретровирусного вектора**, содержащего трансген. Секретируемые ретровирусные частицы инфицировали соседние клетки, что приводило к интеграции в хромосому экспрессионной кассеты трансгена.
- Эукариотическая **транспозаза** (“Sleeping Beauty”) была использована для стабильной интеграции трансгена из **HC-Ad** в хромосому клеток-мишеней.

Стратегии направления Ad векторов к определенным клеткам-мишеням

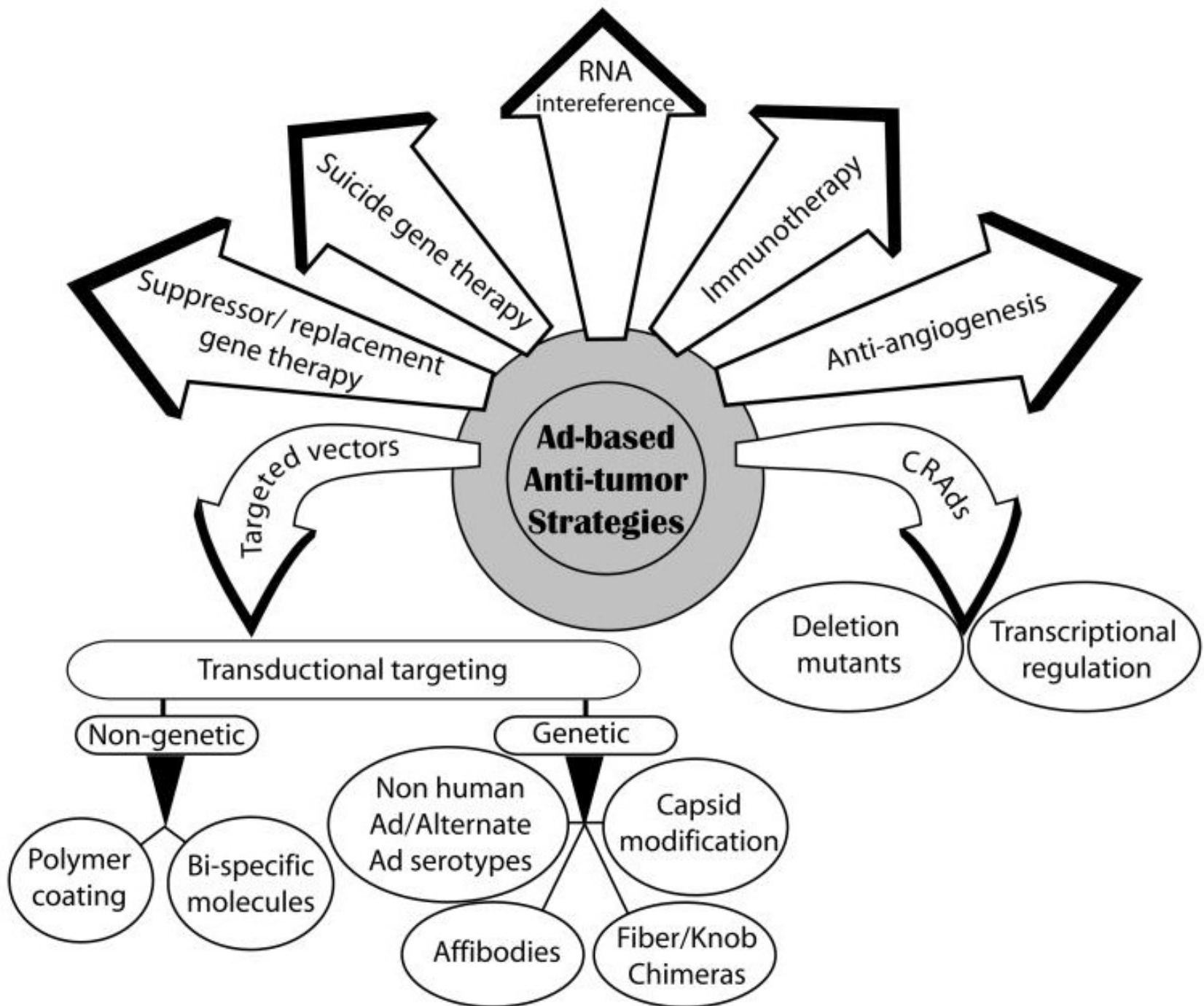


Анти-раковая терапия с участием аденовирусных векторов

- **Ограничения:**
- Многие типы раковых клеток экспрессируют низкий уровень CAR и устойчивы к трансдукции аденовирусом.
- Доминантный тропизм Ad к клеткам печени.
- Нейтрализация Ad вектора предсуществующими антителами.
- Некоторые свойства, негативные для долговременной генной терапии, оказываются **преимуществами для анти-раковой терапии:**
- Сильный иммунный ответ позволяет использовать Ad вектор как адъювант, усиливающий иммунитет к раковым клеткам.
- Быстрое удаление клеток, инфицированных Ad вектором, дает возможность защитить здоровые клетки от продолжительного действия токсичных агентов. Для анти-ракового эффекта достаточно их кратковременного действия.

Основные направления развития антираковой терапии с участием Ad векторов

- 1. Онколитические аденовирусы - CRAbs (conditionally replicating adenoviruses);
- 2. Доставка генов опухолевых супрессоров или суицидных генов с помощью аденовирусных векторов;
- 3. Таргетинг аденовирусных векторов к опухолевым клеткам;
- 4. Тканеспецифическая экспрессия терапевтических генов в опухолевых клетках;
- 5. Комбинация Ad-опосредованной генной терапии с другими видами анти-раковой терапии.

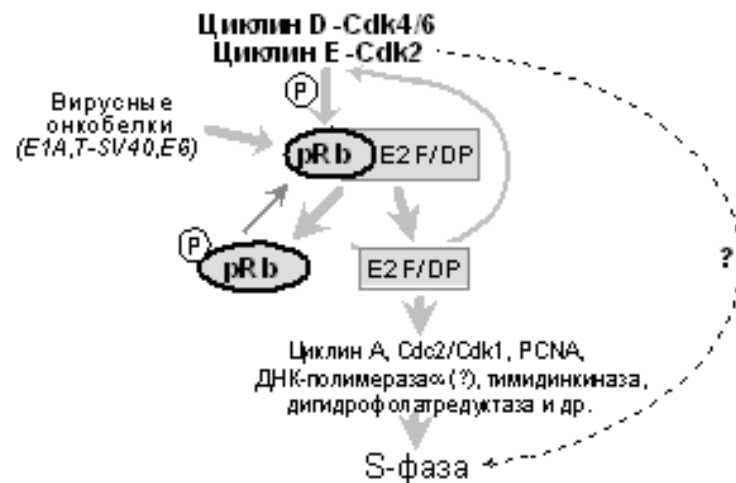


Терапия с помощью генов онкосупрессоров

- В большинстве опухолей инактивированы гены **онкосупрессоров**.
- Опухолевый супрессор **p53** мутирован в 50% опухолей и является идеальной мишенью для замещающей терапии.
- Восстановление экспрессии **p53** дикого типа с помощью неспособного реплицироваться Ad вектора приводит к существенному противоопухолевому эффекту.
- “**Bystander effect**” – уничтожение и/или ингибирование роста не трансдуцированных клеток за счет ингибирования ангиогенеза и индукции иммунного ответа против раковых клеток.
- Повышение чувствительности к **химиотерапии и радиотерапии** за счет восстановления апоптотического сигналинга.
- Первый коммерческий продукт **Gendicine** (Ad вектор с экспрессионной кассетой p53 вместо E1 гена) одобрен SFDA Китая для генной терапии рака.
- Аналогичный вектор **INGN 201, ADVEXIN** проходит клинические испытания в США и Европе.
- Разрабатываются также Ad векторы для экспрессии **pRb, p14ARF, p21, PTEN** и других онкосупрессоров, а также индукторов апоптоза - белков семейства **Bcl-2**.

Онколитические векторы (теоретические предпосылки)

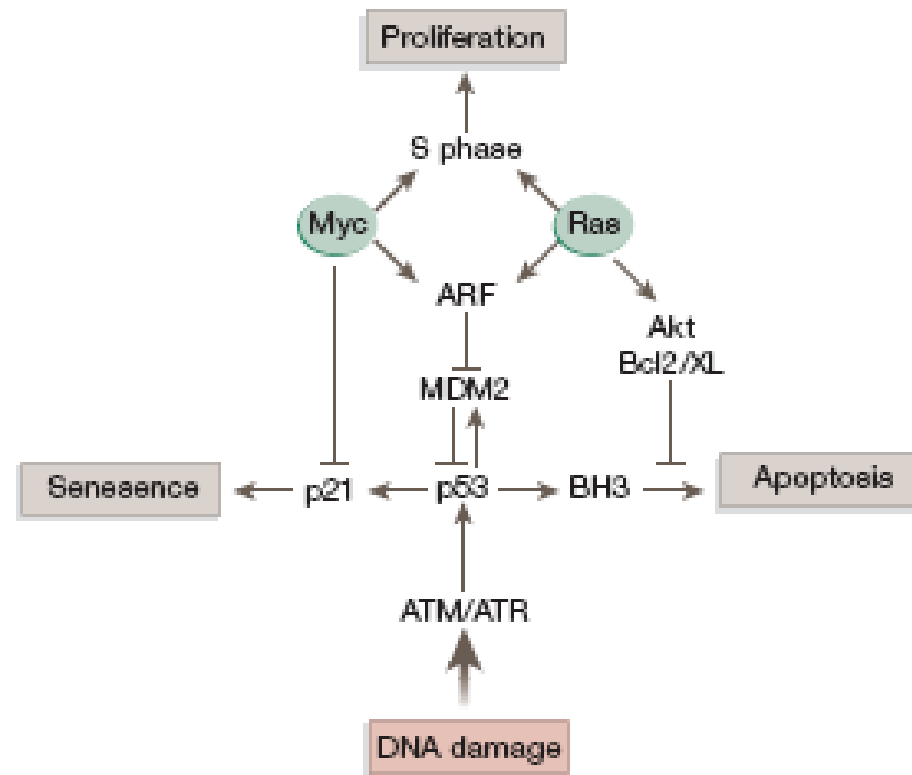
- Некоторые аденовирусы онкогенны для человека. Их онкогенность связана с вирусными генами, но у **v-onc** ДНК-содержащих вирусов нет нормальных клеточных гомологов. Их онкогенность связана с взаимодействием с опухолевыми супрессорами.
- **Ad E1A** взаимодействует с клеточным белком **pRb**. Это приводит к активации транскрипционного фактора **E2F**, запускающего экспрессию генов, необходимых для S-фазы клеточного цикла. **Ad** используют клеточный аппарат репликации для размножения.



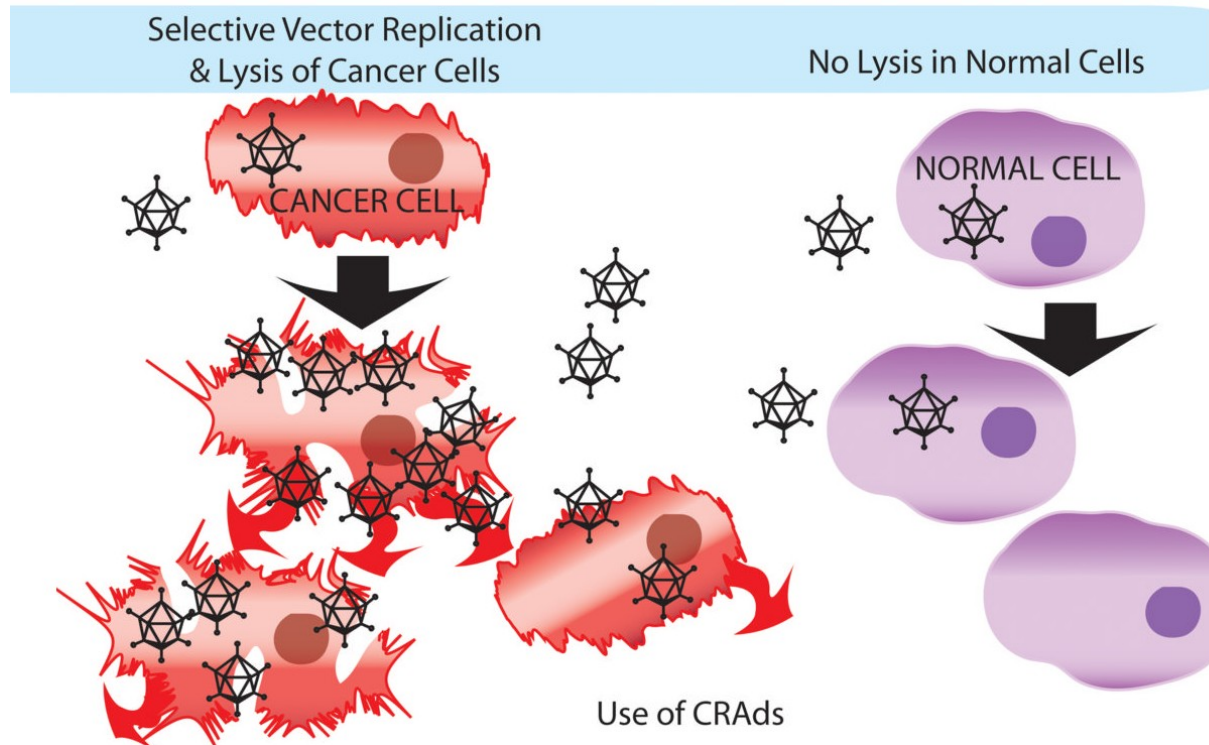
E2F трансаktivирует **p14ARF**, что приводит к возрастанию уровня опухолевого супрессора **p53**, вызывающего **апоптоз** или **остановку клеточного цикла**. Это препятствует репликации вируса.

Онкогены активируют p53 через опухолевый супрессор p14 ARF

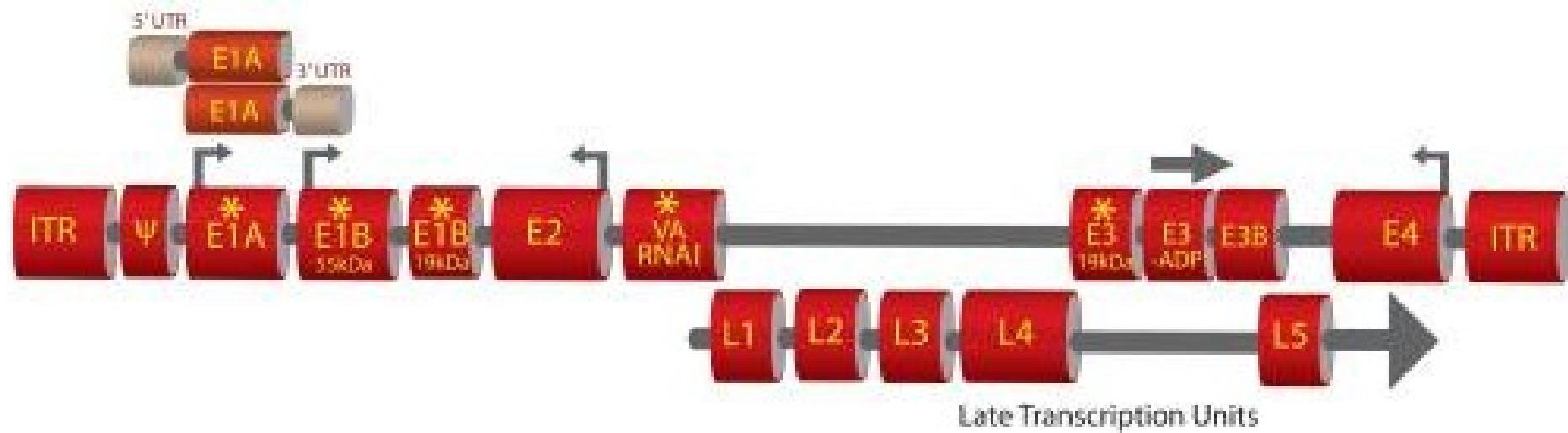
- **p14 ARF** активирует **p53** в ответ на действие вирусных и клеточных **онкогенов**.
- Неадекватные пролиферативные сигналы ведут к индукции **p14 ARF**, сопровождающейся **p53**-зависимым арестом клеточного деления или индукцией **апоптоза**.
- **p14 ARF** связывается с ингибитором p53, белком **Mdm2**. В результате ARF предотвращает экспорт комплекса **Mdm2-p53** из ядра в цитоплазму, а также подавляет убиквитин-лигазную активность Mdm2 в отношении p53.
- Белок аденовируса **E1B 55kD** связывается с **p53** и инактивирует его, запуская клеточный цикл, что дает возможность аденовирусу реплицироваться.



CRAAd (conditionally replicating adenovirus)



- Создан мутантный по гену белка **E1B 55kD** аденовирус **ONYX-015**, который селективно реплицируется в опухолевых клетках с инактивированным p53, но не в нормальных клетках с функциональным p53.



Онколитические векторы (инактивация E1B 55 kD)

- Белки **p53** и/или **pRb** инаktivированы в большом проценте опухолей.
- Создан мутантный по гену белка **E1B 55kD** аденовирус **ONYX-015**, который селективно реплицируется в опухолевых клетках с инаktivированным p53, но не в нормальных клетках с функциональным p53.
- **ONYX-015** – это первый **CRAd** (conditionally replicating adenovirus), который проходит клинические испытания для многих видов рака.
- Аналогичный мутантный по гену белка E1B 55kD аденовирус **H101** создан в Китае. Он одобрен SFDA Китая для лечения **nasopharyngeal carcinoma** в комбинации с химиотерапией и стал первым коммерческим продуктом **CRAd** для антираковой генной терапии.
- Терапевтический эффект **CRAd** самого по себе оказался не очень сильным, но при **комбинировании с химиотерапией** дает обнадеживающий анти-раковый эффект.
- Например, положительный эффект комбинированной терапии 72,7% против 40,4% для химиотерапии только.
- Недостатки: эффективность репликации **ONYX-015** в опухолевых клетках хуже, чем вируса дикого типа (E1B 55kD нужен для трансляции и экспорта из ядра поздних вирусных РНК, а также ингибирования трансляции клеточных мРНК).

Онколитические векторы (инактивация E1A)

Получены **Ad E1A** мутантные векторы с делециями в участке связывания **pRb**, которые преимущественно реплицируются в раковых клетках с нарушениями в сигнальном пути **pRb**.

Делеции в участке связывания **pRb** не ингибируют репликацию вектора в раковых клетках, поэтому такие векторы имеют преимущество перед векторами с deletированным **E1B 55kD**.

Однако, репликация таких векторов происходит также в активно пролиферирующих нормальных клетках.

Дальнейшее улучшение – включение **tumor-specific promoters** (для контроля экспрессии важных вирусных генов или добавление **targeting ligands** для направленной доставки векторы к опухолевым клеткам.

Tumor-specific promoters:

PSA (prostate-specific antigen)-derived минимальный энхансер/промотор, Элементы регуляции транскрипции **TRE** промоторов **hTERT** (human telomerase reverse transcriptase), транскрипционного фактора **E2F**, α -fetoprotein (**AFP**).

Онколитические векторы

(мутирование VA RNA1, делеция E1B 19 kD)

- При вирусных инфекциях **dsRNA** индуцирует интерфероновый ответ, ведущий к активации протеинкиназы R (PKR). **PKR** фосфорилирует трансляционный фактор **eIF-2**, что приводит к ингибированию трансляции вирусных белков и, как следствие, репликации вирусов.
- Аденовирусы создали способ преодоления активации **PKR** посредством вирус-ассоциированных **VA RNA1** и **VA RNA2**, которые связывают и инактивируют **PKR**.
- Активность **PKR** дополнительно ингибирована в опухолевых клетках активированным сигнальным путем **Ras**, что дает возможность вирусу реплицироваться.
- Это позволило создать **CRAd** вектор с мутированной **VA RNA1**, репликация которого была аттенуирована в нормальных клетках, но не в раковых клетках с активным **Ras**.
- **E1B 19 kD** (белок семейства **bcl-2**) ингибирует **E1A**-индуцируемый апоптоз и **TNF**-индуцируемый апоптоз. Вектор с делетированным **E1B 19 kD** в присутствии **TNF** селективно реплицируется в раковых клетках с нарушенной регуляцией апоптоза, в то время как нормальные клетки погибают от апоптоза.

Перспективы

- 1. **Хелпер-независимые векторы** первого и второго поколений будут применяться для **вакцинации** против инфекционных болезней и для **анти-раковой терапии** (короткое время действия, иммуногенность является плюсом).
- **НС-Ad** будут применяться для терапии **моногенных заболеваний**, когда нужна длительная экспрессия терапевтического гена, включая очень крупные гены.
- Примеры: перенос генов фактора VIII или $\alpha 1$ -антитрипсина в печень, гена дистрофина в мышцы, генов защитных белков в глаз.
- Предполагается оптимизировать “Staffer DNA” с целью добиться долговременной экспрессии, оптимизировать стратегии таргетинга и системы продукции векторов без загрязнения хелперными вирусами.
- **Онколитические CR-Ad** векторы будут применяться для анти-раковой терапии.