

Received: 2004.11.30  
 Accepted: 2005.02.14  
 Published: 2005.03.22

## Współczesne osiągnięcia dotyczące badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko WZW C

### Modern achievements in research on hepatitis C vaccine

Aneta Baryluk, Małgorzata Polz-Dacewicz, Marta Sendicka, Marta Piecyk-Sidor

Zakład Wirusologii Akademii Medycznej w Lublinie

#### Streszczenie

Wirusowe zapalenie wątroby typu C stanowi ogromny problem zdrowotny i epidemiologiczny w całym świecie, jednak obecnie nie ma jeszcze możliwości skutecznego zapobiegania rozwojowi tej choroby za pomocą szczepienia. Dostępne metody leczenia, takie jak zastosowanie interferonu  $\alpha$  i rybawiryny, nie u wszystkich pacjentów dają w pełni zadowalające rezultaty i wiążą się z występowaniem działań niepożądanych. Odkąd odkryto HCV, dokonał się znaczny postęp w dziedzinie wiedzy na temat budowy i epidemiologii wirusa, a także mechanizmów odpornościowych, zachodzących w organizmie człowieka w wyniku zakażenia HCV. Poznano znaczenie niektórych elementów struktury wirusa w indukcji odpowiedzi komórkowej i humoralnej, a także wpływ poszczególnych etapów reakcji immunologicznej na proces namnażania wirusa w żywym organizmie. Dzięki temu możliwe było prowadzenie wielokierunkowych badań, zmierzających do opracowania skutecznej szczepionki. Testowano modele szczepionek, w których materiałem do immunizacji były białka, sekwencje DNA, wirosomy. Jako wektory zdolne do przenoszenia fragmentów DNA, stosowano plazmidy oraz rekombinowane adenowirusy. Wieloletnie badania zaowocowały stworzeniem modelu szczepionki terapeutycznej, zawierającej białka E1 otoczki HCV. Obecnie są przeprowadzane badania kliniczne, zmierzające do ustalenia właściwego dawkowania i schematu podawania szczepionki. Szacuje się, że w najbliższej przyszłości szczepionka taka będzie dostępna jako jeden z elementów terapii u chorych na wirusowe zapalenie wątroby typu C. Są prowadzone również wyężone badania, zmierzające do opracowania szczepionki profilaktycznej, której podanie pozwoli zapobiegać rozwojowi zakażenia HCV.

#### Słowa kluczowe:

wirusowe zapalenie wątroby typu C • HCV • szczepionka przeciwko WZW typu C

#### Summary

Hepatitis C is an immense health and epidemiological problem; its effective prevention by vaccination, however, is still impossible. The available methods of treatment, e.g. using interferon  $\alpha$  and ribavirin, do not lead to fully satisfactory results in all patients and are associated with side effects. Knowledge of the virus's structure and epidemiology, as well as the immune mechanisms, which occur in the human organism due to HCV infection, has progressed substantially. The importance of some structural elements of the virus in inducing cellular and humoral responses and the effects of individual stages of the immune reaction on the process of viral multiplication have been determined, which has enabled multi-directional studies on an effective vaccine. The studies tested vaccine models in which proteins, virosomes, and sequences of DNA were used for immunization. Plasmids and recombinant adenoviruses served as vectors capable of transferring the DNA fragments. This long-term research resulted in a model of a therapeutic vaccine containing HCV envelope E1 proteins. At present, clinical trials are being carried out to determine the proper dosage and administration mode of the vaccine. It is estimated that in the

nearest future such a vaccine will be available as an element of therapy in patients with hepatitis C. Furthermore, intensive studies have been undertaken to develop a prophylactic vaccine to prevent the development of HCV infection.

**Key words:** hepatitis C • HCV • HCV vaccine

**Full-text PDF:** [http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol\\_59/7168.pdf](http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_59/7168.pdf)

**Word count:** 3441

**Tables:** –

**Figures:** –

**References:** 43

**Adres autorki:** lek. med. Aneta Baryluk, Zakład Wirusologii AM w Lublinie, Collegium Uniwersum, ul. Chodźki 1, 20-093 Lublin, e-mail: a-baryluk@tlen.pl

## WIRUS HCV I EPIDEMIOLOGIA WIRUSOWEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C

Wirus zapalenia wątroby typu C (*Hepatitis C virus* – HCV), po raz pierwszy został wyizolowany w 1989 r. [4,7]. Jest klasyfikowany jako *Hepacivirus* i należy do rodziny *Flaviviridae* [21]. Genom wirusa jest zbudowany z pojedynczej, dodatnio spolaryzowanej nici RNA, zawierającej około 9,5 tys. nt. W genomie wyróżnia się wysoce konserwatywny region 5' niekodujący oraz część kodującą poliproteinę, z której powstają białka strukturalne (białko rdzenia C i 2 białka otoczkowe E1 i E2/NS1) oraz niestrukturalne (NS2, NS3 a/b, NS4 a/b, NS5 a/b) [3,4,21,26,36].

HCV jest czynnikiem wywołującym wirusowe zapalenie wątroby (WZW) początkowo określane jako zapalenie wątroby nie-A, nie-B, a obecnie znane jako WZW typu C. Szacuje się, że wirusem zapalenia wątroby typu C zakażonych jest w całym świecie około 170 mln ludzi [2], częstość zakażeń w krajach rozwiniętych waha się w granicach 1-3% populacji, a w niektórych uboższych regionach świata dochodzi nawet do ponad 20% [24]. HCV może powodować zarówno ostre, jak i przewlekłe zapalenie wątroby. Pierwotne zakażenie często ma przebieg bezobjawowy. Według różnych źródeł u 50–85% zakażonych osób stwierdza się przewlekłą obecność wirusa w organizmie, a w konsekwencji również przewlekłe zapalenie wątroby, które z kolei jest główną przyczyną marskości wątroby (1/3 chorych z WZW C), raka wątroby, a nawet śmierci z powodu zaawansowanych zmian chorobowych i niewydolności wątroby [17,21,24,26,31,36].

Do zakażenia HCV może dochodzić poprzez kontakt z zakażoną krwią oraz – znacznie rzadziej – przez kontakty seksualne. W krajach, gdzie badania w kierunku obecności przeciwciał anti-HCV oraz RNA wirusa są powszechnie dostępne, udało się zmniejszyć liczbę zakażeń drogą transfuzji krwi lub preparatów krwiopochodnych [35]. Nadal jednak narażone są osoby uzależnione od środków narkotycznych podawanych dożylnie, a także partnerzy seksualni osób zakażonych, pracownicy służby zdrowia, osoby wymagające hemodializy, czy noworodki urodzone przez kobiety-nosicielki HCV. Przyczyną częstszych zakażeń w niektórych biedniejszych krajach świata może być wielokrotne używanie zanieczyszczonego wirusem sprzętu medyczne-

go oraz brak możliwości badania dawców krwi w kierunku nosicielstwa wirusa [1,17,22,26]. Jedynym dostępnym obecnie leczeniem w WZW C jest stosowanie interferonu  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) w monoterapii lub w połączeniu z rybawiryną. Jest to leczenie drogie, skuteczne jedynie u około 50% pacjentów i obarczone ryzykiem wystąpienia objawów niepożądanych [36]. Dlatego bardzo ważne jest opracowanie szczepionki, która mogłaby skutecznie zapobiegać zakażeniu HCV lub rozwojowi przewlekłego zakażenia i związanym z nim konsekwencjom [1,35,36].

## ODPOWIEDŹ IMMUNOLOGICZNA W ZAKAŻENIU WIRUSEM HCV

Skuteczne zwalczanie HCV w zakażonym organizmie jest związane z odpowiednio nasiloną reakcją limfocytów T CD4+ (pomocniczych) i CD8+ (cytotoksycznych). Szczególnie odpowiedź komórek CD8+, skierowana przeciwko różnym epitopom wirusa, jest decydująca w opanowaniu zakażenia [8,23,35]. Ta swoista odpowiedź komórkowa nasila się szybko (6–8 tyg.) po ekspozycji na zakażenie wirusem, jednak zmienia się w czasie i zazwyczaj nie jest wystarczająca do eliminacji wirusa. Po wnikięciu HCV do organizmu, jego antygeny, jako białka egzogenne, łączą się z kompleksami MHC klasy II na powierzchni komórek prezentujących antygen, gdzie są rozpoznawane przez limfocyty CD4+. Jest to możliwe wówczas, gdy prawidłowo dojrzewające komórki dendrytyczne wykazują dużą ekspresję cząstek MHC klasy I i II na swojej powierzchni. Jednak zakażenie HCV może osłabiać zdolność dojrzewania komórek dendrytycznych, a także hamować syntezę IL-12, odgrywającej decydującą rolę w stymulacji odpowiedzi komórkowej. Pełne zwalczenie ostrego zakażenia jest z tego powodu znacznie utrudnione i rozwija się przewlekła wiremia [5,8]. Indukowane limfocyty CD4+ mają dwojaką funkcję. Pobudzają limfocyty B do wytwarzania przeciwciał neutralizujących, jednak odpowiedź humoralna jest ograniczona do określonego fenotypu wirusa i odgrywa mniejszą rolę w eliminacji HCV [1,17,26]. Kolejnym istotnym zadaniem komórek CD4+, jest stymulowanie limfocytów cytotoksycznych CD8+ (CTL). Do pełnej indukcji limfocytów cytotoksycznych, potrzebna jest dodatkowo prezentacja antygenów wirusowych, pochodzących z retikulum endoplazmatycznego zakażonych komórek, w połączeniu z MHC klasy I na ich powierzchni. Dzięki temu komórki zaatakowane przez wirus, rozpoznawane są przez

CTL i możliwa jest ich eliminacja [26]. W ostrej fazie zakażenia obserwuje się znaczną aktywność limfocytów cytotoksycznych o fenotypie CD38+ i brak wytwarzania IFN- $\gamma$ , natomiast eliminacja zakażenia jest obserwowana, gdy obecne są limfocyty o fenotypie CD38- i zaznacza się wytwarzanie IFN- $\gamma$ . U pacjentów z przewlekłym zakażeniem stwierdzano wyraźną obecność komórek T CD8+ zdolnych do pobudzania syntezy IFN- $\gamma$  [10,19,27], odgrywającego istotną rolę w ograniczaniu namnażania wirusa [5]. Epitopy białek HCV mogą być rozpoznawane przez CTL u zakażonych osób wykazujących ekspresję różnych części HLA I, szczególnie bardzo rozpowszechnionych w populacji HLA-A2 (obecnych u 45% osób rasy kaukaskiej) [21]. CTL mogą występować we krwi obwodowej oraz jako pula limfocytów wewnątrzwątrobowych (IHL). Ich rolą jest eliminacja wirusa, co niekiedy może wiązać się z uszkodzeniem komórek wątroby. IHL są typowymi aktywowanymi prozapalnie komórkami efektorowymi, nie dzielą się i giną w obrębie wątroby, dlatego utrzymanie stałej puli IHL zależy od migracji z obszarów pozawątrobowych. Limfocyty wewnątrzwątrobowe mogą nasilać stan zapalny i uszkodzenie hepatocytów przy próbie eliminacji komórek zakażonych wirusem [1].

#### PRACE NAD SZCZEPIONKĄ

Prowadzenie efektywnych badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko WZW C wymaga zastosowania skomplikowanych technik laboratoryjnych, m.in. inżynierii genetycznej, i pokonania pewnych praktycznych niedogodności. Problem stanowi wysoka mutageność białek wirusowych, możliwość wykrywania RNA wirusa w organizmach żywych jedynie metodą PCR (polimerase chain reaction). Brakuje także sposobu hodowli tkankowych i komórkowych wirusa celem jego namnażania oraz obserwowania replikacji i reakcji na różne czynniki [1]. Ograniczoną możliwością śledzenia cyklu życiowego wirusa dają linie komórek ludzkich, zdolne do pobudzenia ekspresji całej otwartej ramki odczytu HCV, wytwarzane z użyciem systemu ekspresji genów regulowanych tetracykliną [21]. Poza tym do syntezy cząstek HCV-podobnych, używanych do badań, wykorzystuje się hodowle komórek owadów [3]. W dalszym ciągu nie ma również możliwości zakażenia i obserwacji jego rozwoju u małych zwierząt, może z wyjątkiem myszy transgenicznych, u których można badać jedynie pewne elementy procesów immunologicznych, zachodzących w zakażonym organizmie [4,10,19,27,31]. Jedynym dostępnym, w pełni zadowalającym modelem zwierzęcym jest szympan. Zwierzęta te są podatne na zakażenie wszystkimi głównymi genotypami HCV, które atakują człowieka, a zakażenie, podobnie jak u ludzi, ma charakter hepatotropowy. Dobrze odzwierciedlony jest również przebieg choroby i reakcji odpornościowej, ponieważ jednak szympan predysponowany jest do przewlekłej wirerii, bez zapalenia wątroby, dlatego uszkodzenie tego narządu jest zwykle łagodniejsze, niż u człowieka. Jednak wysokie koszty, wymagany duży nakład pracy i aspekty etyczne, ograniczają w znacznym stopniu badania na szympanach [1,21,35,39]. Prześledzenie reakcji immunologicznej w ostrej fazie zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C u ludzi, było możliwe dzięki prospektywnym badaniom osób zakażonych HCV i ich partnerów seksualnych [23].

Jak wspomniano wyżej, charakterystyczną cechą HCV jest jego ogromna różnorodność genetyczna, a także zmienność

geograficzna. Wyróżnia się 11 genotypów i ponad 100 opisywanych obecnie podtypów [24], a zdolność do mutacji szacuje się na  $10^{-3}$  zmian na miejsce w ciągu roku [21]. W Europie i Stanach Zjednoczonych Ameryki najbardziej rozpowszechniony jest podtyp 1b, który niestety, wykazuje największą oporność przy próbach leczenia. Opisane zostały pewne elementy struktury wirusa, które mogą być interesujące dla badań nad szczepionką, ze względu na ich stabilność lub zdolność wywoływania silniejszej reakcji immunologicznej. Możemy tu wymienić glikoproteinę E1, glikoproteinę E2 (wraz z wysoce zmiennym regionem HVR1), białka NS3, NS5b [1,21,36,42].

#### SZCZEPIONKI OPARTE NA PEPTYDACH

Glikoproteina E2, wraz z jej wysoce zmiennym regionem HVR1, należy do składowych osłonki wirusa i ma zdolność wiązania się z komórkami ludzkimi poprzez receptory CD81 na powierzchni tych komórek [42]. Przeciwciała przeciwko gpE2 wykazują zdolność hamowania wiązania rekombinantowych E2, a więc prawdopodobnie również całego wirusa, do komórek ludzkich [1,21], co określa się jako neutralization-of-binding (NOB) [18]. Badania chorych przewlekle zakażonych wirusem HCV wykazywały małe stężenie przeciwciał neutralizujących lub ich brak [1], natomiast u osób, u których doszło do samoistnej eliminacji wirusa, notowano duże stężenie przeciwciał neutralizujących, w tym przeciwciał anti-HVR1, utrzymujące się przez długi okres [1,8]. Szczepienie szympanów rekombinowanymi białkami osłonki (heterodimery E1/E2), zapobiegało rozwojowi przewlekłego zakażenia u większości badanych zwierząt [1,6], a utrzymywanie się dużego stężenia przeciwciał anti-HVR1 decydowało o skuteczności szczepienia szympanów za pomocą rekombinowanych protein E1, E2 i peptydów HVR1. Surowica zawierająca przeciwciała neutralizujące, osłabiała rozwój zakażenia u szympanów zakażonych podobnymi genotypowo wirusami HCV [11,21,24], jednak przeciwciała anti-HVR1, choć wykazują pewną reaktywność krzyżową z heterologicznymi genotypami HCV, nie mają zdolności do krzyżowej eliminacji wirusa [12,25,35]. Białko E1 osłonki wirusa wykazuje znacznie mniejsze zróżnicowanie i lepszą reaktywność krzyżową pomiędzy różnymi genotypami HCV, w porównaniu do E2. Dlatego obecnie właśnie proteina E1 jest preferowana jako składnik modeli szczepionek peptydowych przeciwko HCV [25].

Ludzka immunoglobulina wykazywała pewną skuteczność w zapobieganiu przenoszenia HCV w przypadku transfuzji, przeszczepów, czy kontaktów seksualnych z osobą zakażoną [18]. Istnieją również doniesienia, świadczące o braku odporności u badanych zwierząt po podaniu immunoglobuliny, przy kolejnej próbie zakażenia HCV [21,35].

Kolejnym ciekawym osiągnięciem jest możliwość syntezy cząstek podobnych do HCV (HCV-LP) w komórkach owadów *in vitro*. HCV-LP zawierają białka rdzenia C oraz osłonki E1 i E2, o strukturze przestrzennej prawdopodobnie zbliżonej do autentycznego wirionu HCV. Cząsteczki HCV-podobne nie są zakaźne i mogą być syntetyzowane w dużych ilościach, a co najważniejsze, wykazują dużą immunoreaktywność z przeciwciałami anti-HCV w surowicy osób zakażonych różnymi genotypami HCV oraz są immunogenne w badaniach na zwierzętach [3,38]. Po

uodpornieniu myszy o genotypie Balb/c oczyszczonymi cząsteczkami HCV-LP, stwierdzano obecność przeciwciał przeciwko białkom rdzenia (obszarem immunodominującym odpowiedź anty-HCV był obszar N-końcowy) oraz przeciwciała anty-E2 (o szczególnie ciekawej reaktywności przeciwko obszarowi C-końcowemu E2). Wydaje się, że cząsteczki HCV-podobne syntetyzowane w komórkach owadów, mogą stanowić ciekawy kierunek badań nad szczepionką przeciwko HCV [3]. Przydatne wydają się także do lepszego poznania funkcjonowania przeciwciał odpornościowych przeciwko HCV [38].

Badano również inne białka HCV jako cząstki zdolne do stymulowania reakcji immunologicznych. Zarówno pojedyncze epitopy białek NS3, NS4, NS5, C, E2, E1, jak i różne ich zestawienia, oceniano pod kątem zdolności wiązania do rekombinowanych cząstek HLA-A2.1, aktywowania limfocytów cytotoksycznych i limfocytów B, indukcji wytwarzania IFN- $\gamma$ . Modelem zwierzęcym zastosowanym do badań były transgeniczne myszy HLA-A2.1 [4,19,31]. Białkami zawierającymi szczególnie immunogenne epitopy okazały się E2, NS3 i NS5b, w połączeniu z NS4b i białkami rdzenia (C). Ważną cechą NS4b jest zdolność do stymulacji komórek T wytwarzających IFN- $\gamma$ , a niewykazujących wyraźnej aktywności litycznej. Dodatkowo zaobserwowano, że powyższe białka wykazują dużą stabilność [19]. Warto zaznaczyć, że odpowiedź immunologiczną przeciwko tym antygenom opisywano również u pacjentów przewlekle zakażonych HCV.

Ważnym zagadnieniem okazuje się także znalezienie korzystnego nośnika dla podawanych w szczepionce peptydów. W tym celu mogą być stosowane wirosomy – cząstki wytworzone w 1975 roku, a budową przypominające strukturę wirusa. Umieszczone w centrum wirosomu peptydy (np. białka rdzenia HCV), są otoczone otoczką fosfolipidową, na powierzchni której znajdują się cząstki neuraminidazy i hialuronidazy. Użycie wirosomów umożliwia przeniesienie antygenów do wnętrza komórek i prezentację w połączeniu z MHC klasy I, co stymuluje odpowiedź komórkową. Dzięki umieszczeniu białek także na powierzchni wirosomów, może dodatkowo być aktywowana odpowiedź humoralna [21].

Okazuje się również, że cząstki będące połączeniem fragmentów białek HCV (białka C) z lipoproteina, stanowiącą składnik błony komórkowej bakterii Gram-ujemnych, silnie indukują dojrzewanie komórek dendrytycznych *in vitro*. Taki model szczepionki, pozwala na uzyskanie silniejszej odpowiedzi immunologicznej, szczególnie komórkowej [8].

Obiecujące wyniki (wyraźną odpowiedź limfocytów T CD4 i CD8) w badaniach prowadzonych na małpach, dawało umieszczenie białek rdzenia na nośniku o nazwie ISCOMATRIX [21,33]. Cząsteczki tego nośnika zawierają saponinę, cholesterol i fosfolipidy, a białka przyłączają się do ich powierzchni na skutek działania sił elektrostatycznych. Istnieją przypuszczenia, że skład i budowa przestrzenna nośnika ułatwia rozpoznawanie cząstek szczepionki przez układ immunologiczny oraz ich szybką fagocytozę, jak również umożliwia im bezpośrednie przechodzenie przez błony komórkowe. Konieczne są dalsze badania w celu oceny skuteczności proponowanej szcze-

pionki, także w przypadku jednoczesnego szczepienia białkami osłonki HCV [33].

Ciekawym sposobem immunizacji myszy białkiem NS5, było zastosowanie impulsów elektrycznych w miejscu domięśniowego podania szczepionki. Pozwalało to na bezpośrednio wprowadzenie antygeny HCV do cytoplazmy komórek i prezentację egzogenego białka z kompleksem MHC klasy I. U zaszczepionych myszy, u których zastosowano impulsację elektryczną, stwierdzono wyraźną odpowiedź limfocytów cytotoksycznych przeciwko komórkom zawierającym podany antygen wirusowy. Ponadto znacznie bardziej wyraźne nasilenie aktywności CTL stwierdzano, jeśli w szczepionce użyto dodatkowo sekwencji cDNA dla białka stymulującego B7-1 lub też plazmidu zawierającego sekwencję immunostymulującą [40].

Synteza białek regionu HVR1 obserwowana była w komórkach roślinnych (tytoniu) [28], a ekspresja genu oczyszczonych, nieglikozylowanych białek osłonki E2 okazała się możliwa w komórkach *Escherichia coli* [42]. Może to wyznaczać jeszcze inne kierunki dalszych badań nad szczepionką anty-HCV.

#### PRÓBY ZASTOSOWANIA DNA JAKO MATERIAŁU DO IMMUNIZACJI

Doświadczenia dotyczyły również zastosowania w charakterze szczepionki sekwencji DNA, odpowiadających poszczególnym antygenom HCV. DNA występowało w tych badaniach jako samodzielna struktura lub w połączeniu z różnymi nośnikami. Jako wektorów używano np. plazmidów: gpWiz [19], pCI (zawierający promotor z wirusa cytomegalii) [4,20], pEF (zawierający tzw. ludzki czynnik wydłużający EF  $\alpha$ -1) [30], pRC [15,31], a także rekombinowanych cząsteczek wirusowych: wirusa ospy kanarków, wirusa krowianki [31], wirusa Semliki Forest (SFV) z rodziny *Togaviridae* [4,13,41], rabdowirusów [36]. Zauważono też możliwość wykorzystania komórek dendrytycznych oraz komórek bakterii *Listeria monocytogenes*, jako nośnika dla fragmentów DNA wirusa, z możliwością ekspresji wybranych antygenów [34,37].

Porównywano zdolność antygenów kodowanych przez poszczególne fragmenty DNA wirusa do wywoływania odpowiedzi immunologicznej, głównie komórkowej, ale także humoralnej, skierowanej przeciwko różnym epitopom genomu HCV [13,19,27]. Stwierdzono, że rodzaj nośnika ma mniejsze znaczenie dla skuteczności szczepionki, niż wybranie najbardziej pożądanego zestawienia fragmentów DNA, kodujących odpowiednie antygeny. Odpowiedź komórkowa jest silniejsza, jeśli stosuje się łączoną immunizację szczepionką DNA i rekombinowanym adenowirusem [19,32]. Również zestawienie szczepionki na bazie DNA z dawką przypominającą w postaci rekombinowanego wirusa ospy kanarków, kodującego pożądanego białka HCV, pozwalało na uzyskanie silniejszej odpowiedzi komórkowej, która jednak utrzymywała się krócej niż w przypadku stosowania jedynie szczepionki DNA [31]. SFV kodujący białka HCV indukuje odpowiedź immunologiczną porównywalną z odpowiedzią po zastosowaniu szczepionki DNA [3], jednak w innych badaniach wykazano małą przydatność tego wektora dla potrzeb ewentualnej szczepionki przeciwko HCV [41]. Stosując rekombinowane, zabite lub zdolne do replikacji cząsteczki rabdowirusa (RV), jako wektor



dla sekwencji kodujących gpE2 wirusa zapalenia wątroby typu C, uzyskiwano odpowiedź immunologiczną, głównie humoralną u badanych zwierząt. Stwierdzano, iż zastosowanie szczepienia za pomocą rekombinowanych cząstek E2, daje silniejszą odpowiedź humoralną, co ma znaczenie w ograniczeniu wnikania wirusa do komórek gospodarza. Połączenie tej metody szczepienia z podaniem szczepionki DNA, może być krokiem do osiągnięcia zadowalającego poziomu odpowiedzi immunologicznej [18]. Używanie plazmidu zawierającego promotor E $\alpha$ -1 jako nośnika, pozwalało na wywołanie zadowalającej odpowiedzi komórkowej u badanych myszy [24]. Zastosowanie w szczepieniu plazmidów, kodujących białka osłonki wirusa (E1 lub E2), powodowało wystąpienie u myszy odpowiedzi humoralnej i komórkowej [43].

Przedłużenie czasu trwania i zwiększenie skuteczności reakcji immunologicznej, okazało się możliwe dzięki podawaniu wraz ze szczepionką DNA, zmodyfikowanej interleukiny (IL-23), zawierającej wybrane elementy IL-12 [16].

#### **ZAAWANSOWANE BADANIA NAD OPRACOWANIEM TERAPEUTYCZNEJ SZCZEPIONKI PRZECIWKO WZW TYPU C**

U większości chorych na przewlekłe zapalenie wątroby typu C, zaobserwowano brak lub bardzo słabą odpowiedź immunologiczną przeciwko białkom E1 osłonki HCV. Natomiast wysokie miano przeciwciał anti-HCV E1 i dobra odpowiedź limfocytów T, swoistych wobec białka E1 występowała u chorych z przewlekłym WZW C, którzy dobrze zareagowali na leczenie interferonem  $\alpha$  oraz u pacjentów, u których doszło do samoistnego przezwyciężenia zakażenia. Spostrzeżenia te wyznaczyły dalszy kierunek badań, prowadzonych przy współpracy kilku ośrodków naukowych w Belgii. Zaowocowały one stworzeniem modelu szczepionki, zawierającej oczyszczone białka E1 HCV (podtyp 1b) [25].

Celem dokładnej oceny właściwości leku, zawsze jest konieczne przeprowadzenie badań przedklinicznych (w tym prób u szympanów) i odpowiednio zaplanowanych badań klinicznych. W fazie I prac klinicznych, ocenia się bezpieczeństwo i tolerancję szczepionki u zdrowych, niezakażonych dorosłych osób, a uzyskane informacje na temat immunogenności, można porównać z wynikami badań przedklinicznych. Etap II ma na celu dobór optymalnej dawki, częstości szczepień i drogi podawania szczepionki. Czynniki te mogą być decydujące dla powodzenia całego procesu szczepienia [21]. Jeśli wyniki przeprowadzonych prób świadczą o dobrej skuteczności, rozpoczyna się etap III, obejmujący badania w dużej grupie osób zakażonych lub z populacji wysokiego ryzyka zakażenia wirusem [1].

Na etapie badań przedklinicznych, nowo opracowany preparat podawano szympanom z przewlekłym WZW typu C. U zwierząt wykonano wiele badań surowicy krwi i biopsje wątroby. Obserwowano, że wzrost poziomu przeciwciał przeciwko białkom E1, utrzymywał się przez prawie 1 rok, po czym miano ich spadało do wartości minimalnych lub nieoznaczalnych. Dawka przypominająca szczepionki powodowała ponowny, szybki wzrost stężenia przeciwciał anti-E1. Stężenie RNA HCV we krwi nie zmieniało się w istotnym stopniu w wyniku szczepienia, jednak malała znacznie liczba antygenów wirusa w komórkach wątroby.

Ocena histopatologiczna preparatów z kilkakrotnie wykonanych biopsji wątroby wskazywała, że podanie szczepionki powodowało znaczne ograniczenie procesu zapalnego w wątrobie, czego odzwierciedleniem był również spadek stężenia enzymów wątrobowych (aminotransferazy alaninowej – ALAT i gammaglutamylotransaminazy – gGt) w surowicy. Wraz z obniżeniem stężenia przeciwciał anti-E1 w surowicy, stan zapalny w tkance wątrobowej ponownie nasilał się, a po podaniu dawki przypominającej szczepionki, znów ulegał zahamowaniu. Badania przedkliniczne dały więc obiecujące wyniki i wykazały terapeutyczne działanie proponowanej szczepionki [9].

W 2000 roku rozpoczęto badania kliniczne nad zastosowaniem szczepionki na bazie białek E1 u ludzi. W etapie I szczepieni byli zdrowi ochotnicy, którym podawano domięśniowo 3 dawki preparatu po 20  $\mu$ g, w odstępach trzytygodniowych, a następnie dawkę przypominającą po około 26 tygodniach od pierwszej iniekcji. U badanych osób, po podaniu szczepionki, stwierdzono stymulację odpowiedzi immunologicznej (humoralnej i/lub komórkowej) przeciwko białkom E1 HCV. Spośród objawów niepożądanych, u niewielkiej części badanych obserwowano jedynie nieznacznie nasilony odczyn w miejscu podania szczepionki [25].

Kolejny etap II badań rozpoczęto w 2001 roku. Szczepieniu poddano pacjentów z przewlekłym, aktywnym zapaleniem wątroby typu C. Zastosowano 5 dawek po 20  $\mu$ g w kolejnych tygodniach: 0, 4, 8, 12, 24, a po około roku – następny cykl 6 szczepień w odstępach trzytygodniowych. W grupie kontrolnej stosowano placebo. U badanych chorych wykonano wiele badań laboratoryjnych oraz biopsje wątroby. Podanie szczepionki zawierającej białko E1 wirusa HCV powodowało silne pobudzenie proliferacji limfocytów T i wzrost stężenia przeciwciał anti-E1 w surowicy. Miano RNA wirusa nie ulegało istotnym zmianom. Ocena próbek z biopsji wątroby wykazała, że zastosowanie szczepionki terapeutycznej opartej na białkach E1, może zahamować postęp marskości wątroby, a nawet polepszyć stan tkanki wątrobowej, czego odzwierciedleniem było również obniżenie poziomu ALAT w surowicy krwi [29].

Proponuje się, aby w przyszłych badaniach zastosować bardziej rygorystyczne, a jednocześnie powtarzalne kryteria kwalifikacji zmian w tkance wątrobowej [14].

Dalsze badania kliniczne, mają za zadanie potwierdzenie korzystnego działania terapeutycznego szczepionki, a także ustalenie dawkowania i właściwego schematu podawania leku [29].

#### **POSTĘPY PRAC NAD STWORZENIEM SZCZEPIONKI PROFILAKTYCZNEJ PRZECIWKO WZW TYPU C**

Mechanizmy decydujące o skutecznym zwalczaniu infekcji HCV przez ludzki organizm, nie zostały dotychczas w pełni poznane. Szeroka wiedza na ten temat jest jednak niezbędna, aby można było prowadzić dalsze efektywne badania nad stworzeniem profilaktycznej szczepionki przeciwko WZW C. Pojawiły się pierwsze doniesienia o udanych próbach immunizacji szympanów za pomocą różnorodnych modeli szczepionek, których efektywność wcześniej oceniano u myszy. Ponieważ przebieg procesów odpornościowych po zakażeniu wirusem HCV, jest bardzo podob-

ny u szympanów i u ludzi, poczynione obserwacje mogą wnieść wiele cennych informacji, pozwalających właściwie ukierunkować dalsze badania.

Zastosowanie protein E1 i E2 jako szczepionek profilaktycznych, a także fragmentów DNA kodujących białko E2, wywoływało u szympanów na tyle skuteczną reakcję układu odpornościowego, że dochodziło do zwalczania zakażenia homologicznym szczepem HCV w początkowym stadium [35].

W jednym z doświadczeń udało się dość wnikliwie ocenić, które elementy wirusa są istotne do wywołania odpowiedzi immunologicznej, skutecznie zwalczającej infekcję HCV. W badaniach tych zastosowano szczepienia wstępne za pomocą fragmentów DNA odpowiadających białkom wirusa: E1, E2, NS3, C, a następnie dawki przypominające, zawierające właściwe, rekombinowane proteiny.

Stwierdzono przede wszystkim, że szczepienie profilaktyczne może chronić przed rozwojem zakażenia heterologicznym podtypem wirusa HCV. W zwalczeniu zakażenia największą rolę odgrywa odpowiedź komórkowa [23,35], a szczególnie pojawienie się w krótkim czasie po zakażeniu, dużej liczby limfocytów T pomocniczych (Th1), wytwarzających IFN- $\gamma$ , ukierunkowanych przeciwko odpowiednim antygenom wirusa [35].

Najbardziej immunogenne spośród składników proponowanej szczepionki profilaktycznej, okazują się białka E1 i NS3. Wyraźnie indukują odpowiedź komórkową limfo-

cytów Th1, swoistych dla tych białek i związane z tym wytwarzanie IFN- $\gamma$  i IL-2. Istnieje wyraźna korelacja pomiędzy wystąpieniem takiej właśnie odpowiedzi immunologicznej po zakażeniu HCV, a możliwością zwalczania wirusa we wczesnej fazie infekcji. Słabo zaznaczona odpowiedź immunologiczna przeciwko białkom rdzenia i E2 osłonki wirusa, sugeruje, że na obecnym etapie wiedzy, raczej nie będą one przydatne jako składniki szczepionki profilaktycznej.

Konieczne jest podjęcie dalszych doświadczeń, celem potwierdzenia skuteczności proponowanego modelu szczepionki i głównej roli białek E1 i NS3 w wywoływaniu odpowiedzi komórkowej przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C [35].

## PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę zaawansowanie prac badawczych, oczekuje się, że w ciągu kilku lat, będzie można stosować w praktyce lekarskiej skuteczną szczepionkę terapeutyczną, która stanie się, oprócz interferonu  $\alpha$  i rybawiryny, jednym z elementów leczenia pacjentów chorujących na wirusowe zapalenie wątroby typu C. Sądzi się, że terapeutyczne działanie szczepionki zawierającej białka E1 otoczki wirusa, ograniczy postęp stanu zapalnego i marskości wątroby, a więc jest szansa, że zmniejszy się zagrożenie życia osób zakażonych wirusem HCV. Potrzebne są jednocześnie dalsze wyężone prace nad opracowaniem szczepionki profilaktycznej, która pozwoli na ograniczenie rozwoju wirusa w organizmie, zanim wywoła on zmiany chorobowe.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Abrignani S., Houghton M., Hsu H.H.: Perspectives for a vaccine against hepatitis C virus. *J. Hepatol.*, 1999; 31(Suppl.1): 259–263
- [2] Alter M.J.: Epidemiology of hepatitis C. *Hepatology*, 1997; 26: 62S–65S
- [3] Baumert T.F., Vergalla J., Sato J., Thomson M., Lechmann M., Herion D., Greenberg H.B., Ito S., Liang T.J.: Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology*, 1999; 117: 1397–1407
- [4] Brinster C., Chen M., Boucreux D., Paranhos-Baccala G., Liljestrom P., Lemmonier F., Inchauste G.: Hepatitis C virus non-structural protein 3-specific cellular immune responses following single or combined immunization with DNA or recombinant Semliki Forest virus particles. *J. Gen. Virol.*, 2002; 83: 369–381
- [5] Cecere A., Marotta F., Vangieri B., Tancredi L., Gattoni A.: Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection is related to altered cellular immune response and to different cytokine profile. *Panminerva Med.*, 2004; 46: 171–187
- [6] Choo Q.L., Kuo G., Ralston R., Weiner A., Chien D., Van Nest G., Han J., Berger K., Thudium K., Kuo C., Kansopon J., McFarland J., Tabrizi A., Ching K., Moss B., Cummins L.B., Houghton M., Muchmore E.: Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91: 1294–1298
- [7] Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.: Isolation of a DNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 1989; 244: 359–362
- [8] Chua B.Y., Healy A., Cameron P.U., Stock O., Rizkalla M., Zeng W., Torresi J., Brown L.E., Fowler N.L., Gowans E.J., Jackson D.C.: Maturation of dendritic cells with lipopeptides that represent vaccine candidates for hepatitis C virus. *Immunol. Cell Biol.*, 2003; 81: 67–72
- [9] Depla E.: Therapeutic vaccination of chronically infected chimpanzees with the hepatitis C virus E1 protein. *Antivir. Ther.*, 1999; 4(Suppl.4): 12
- [10] Engler O.B., Schwendener R.A., Dai W.J., Wolk B., Pichler W., Moradpour D., Brunner T., Cerny A.: A liposomal peptide vaccine inducing CD8(+) T cells in HLA-A2.1 transgenic mice recognise human cells encoding hepatitis C virus (HCV) proteins. *Vaccine*, 2004; 23: 58–68
- [11] Esumi M., Rikihisa T., Nishimura S., Goto J., Mizuno K., Zhou Y.H., Shikata T.: Experimental vaccine activities of recombinant E1 and E2 glycoproteins and hypervariable region 1 peptides of hepatitis C virus in chimpanzees. *Arch. Virol.*, 1999; 144: 973–980
- [12] Esumi M., Zhou Y.H., Tanoue T., Tomoguri T., Hayasaka I.: *In vivo* and *in vitro* evidence that cross-reactive antibodies to C-terminal of hypervariable region 1 do not neutralize heterologous hepatitis C virus. *Vaccine*, 2002; 20: 3095–3103
- [13] Frelin L., Ahlen G., Alheim M., Weiland O., Barnfield J., Liljestrom P., Sallberg M.: Codon optimization and mRNA amplification effectively enhances the immunogenicity of the hepatitis C virus nonstructural 3/4A genotype. *Gene Ther.*, 2004; 11: 522–533
- [14] Ghany M.G., Kleiner D.E.: E1 Therapeutic vaccination for chronic hepatitis C: all that glitters is not gold. *Hepatology*, 2003; 38: 1092–1094
- [15] Gordon E.J., Bhat R., Liu Q., Wang Y.F., Tackney C., Prince A.M.: Immune responses to hepatitis C virus structural and nonstructural proteins induced by plasmid DNA immunizations. *J. Infect. Dis.*, 2000; 181: 42–50
- [16] Ha S.J., Kim D.J., Baek K.H., Yun Y.D., Sung Y.C.: IL-23 induces stronger sustained CTL and Th1 immune responses than IL-12 in hepatitis C virus envelope protein 2 DNA immunization. *J. Immunol.*, 2004; 172: 525–531
- [17] Hassoun Z., Gores G.J.: What surgeons should know about viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Surg. Oncol. Clin. N. Amer.*, 2003; 12: 1–11
- [18] Heile J.M., Fong Y.L., Rosa D., Berger K., Saletti G., Campagnoli S., Bensi G., Capo S., Coates S., Crawford K., Dong C., Winger M., Baker G., Cousens L., Chien D., Ng P., Archangel P., Grandi G., Houghton M., Abrignani S.: Evaluation of hepatitis C virus glycoprotein E2 for vaccine design: an endoplasmic reticulum-retained recombinant protein is superior to secreted recombinant protein and DNA-based vaccine candidates. *J. Virol.*, 2000; 74: 6885–6892

- [19] Himoudi N., Abraham J.D., Fournillier A., Lone Y.C., Joubert A., Op De Beek A., Freida D., Lemonnier F., Kiény M.P., Inchauspe G.: Comparative vaccine studies in HLA-A2.1-transgenic mice reveal a clustered organization of epitopes presented in hepatitis C virus natural infection. *J. Virol.*, 2002; 76: 12735–12746
- [20] Hu G.J., Wang R.Y., Han D.S., Alter H.J., Shih J.W.: Characterisation of the humoral and cellular immune responses against hepatitis C virus core induced by DNA-based immunization. *Vaccine*, 1999; 17: 3160–3170
- [21] Hunziker I., Zurbriggen R., Glueck R., Engler O.B., Reichen J., Dai W.J., Pichler W.J., Cerny A.: Perspectives: towards a peptide-based vaccine against hepatitis C virus. *Mol. Immunol.*, 2001; 38: 475–484
- [22] Inchauspe G., Feinstone S.: Development of a hepatitis C virus vaccine. *Clin. Liver Dis.*, 2003; 7: 243–259
- [23] Kamal S.M., Amin A., Madwar M., Graham C.S., He Q., Al Tawil A., Rasenack J., Nakano T., Robertson B., Ismail A., Koziel M.J.: Cellular immune responses in seronegative sexual contacts of acute hepatitis C patients. *J. Virol.*, 2004; 78: 12252–12258
- [24] Koff S.: Hepatitis vaccines: recent advances. *Int. J. Parasitol.*, 2003; 33: 517–523
- [25] Leroux-Roels G., Depla E., Hulstaert F., Tobback L., Dincq S., Desmet J., Desombere I., Maertens G.: A candidate vaccine based on the hepatitis C E1 protein: tolerability and immunogenicity in healthy volunteers. *Vaccine*, 2004; 22: 3080–3086
- [26] Liang T.J., Rehermann B., Seeff L.B., Hoofnagle J.H.: Pathogenesis, natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann. Intern. Med.*, 2000; 132: 296–305
- [27] Martin P., Parroche P., Chatel L., Barretto C., Beck A., Trepo C., Bain C., Lone Y.C., Inchauspe G., Fournillier A.: Genetic immunization and comprehensive screening approach HLA-A2 transgenic mice lead to the identification of three novel epitopes in hepatitis C virus NS3 antigen. *J. Med. Virol.*, 2004; 74: 397–405
- [28] Nemchinov L.G., Liang T.J., Rifaat M.M., Mazyad H.M., Hadidi A., Keith J.M.: Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch. Virol.*, 2000; 145: 2557–2573
- [29] Nevens F., Roskams T., Van Vlierberghe H., Horsmans Y., Sprengers D., Elewaut A., Desmet V., Leroux-Roels G., Quinaux E., Depla E., Dincq S., Vander Stichele C., Maertens G., Hulstaert F.: A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2003; 38: 1289–1296
- [30] Nishimura Y., Kamei A., Uno-Furuta S., Tamaki S., Kim G., Adachi Y., Kuribayashi K., Matsuura Y., Miyamura T., Yasutomi Y.: A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1- $\alpha$  promoter elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). *Vaccine*, 2000; 18: 675–680
- [31] Pancholi P., Perkus M., Tricoche N., Liu Q., Prince A.M.: DNA immunization with hepatitis C virus (HCV) polycistronic genes or immunization by HCV DNA priming-recombinant canarypox virus boosting induces immune responses and protection from recombinant HCV-vaccinia virus infection in HLA-A2.1-transgenic mice. *J. Virol.*, 2003; 77: 382–390
- [32] Park S.H., Yang S.H., Lee C.G., Youn J.W., Chang J., Sung Y.C.: Efficient induction of T helper 1 CD4+ T-cell responses to hepatitis C virus core and E2 by a DNA prime-adenovirus boost. *Vaccine*, 2003; 21: 4555–4564
- [33] Polakos N.K., Drane D., Cox J., Ng P., Selby M.J., Chien D., O'Hagan D.T., Houghton M., Paliard X.: Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in *Rhesus macaques* by a nonclassical ISCOM vaccine. *J. Immunol.*, 2001; 166: 3589–3598
- [34] Racanelli V., Behrens S.E., Aliberti J., Rehermann B.: Dendritic cells transfected with cytopathic self-replicating RNA induce crosspriming of CD8+ T cells antiviral immunity. *Immunity*, 2004; 20: 47–58
- [35] Rollier C., Depla E., Drexhage J.A., Verschoor E.J., Verstrepen B.E., Fatmi A., Brinster C., Fournillier A., Whelan J.A., Whelan M., Jacobs D., Maertens G., Inchauspe G., Heeney J.L.: Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J. Virol.*, 2004; 78: 187–196
- [36] Siler C.A., McGettigan J.P., Dietzschold B., Herrine S.K., Dubuisson J., Pomerantz R.J., Schnell M.J.: Live and killed rhabdovirus-based vectors as potential hepatitis C vaccines. *Virology*, 2002; 292: 24–34
- [37] Simon B.E., Cornell K.A., Clark T.R., Chou S., Rosen H.R., Barry R.A.: DNA vaccination protects mice against challenge with *Listeria monocytogenes* expressing the hepatitis C virus NS3 protein. *Infect. Immun.*, 2003; 71: 6372–6380
- [38] Steinmann D., Barth H., Gissler B., Schurmann P., Adah M.I., Gerlach J.T., Pape G.R., Depla E., Jacobs D., Maertens G., Patel A.H., Inchauspe G., Liang T.J., Blum H.E., Baumert T.F.: Inhibition of hepatitis C virus-like particle binding to target cells by antiviral antibodies in acute and chronic hepatitis C. *J. Virol.*, 2004; 78: 9030–9040
- [39] Torresi J., Bharadwaj M., Jackson D.C., Gowans E.J.: Neutralising antibody, CTL and dendritic cell responses to hepatitis C virus: a preventative vaccine strategy. *Curr. Drug Targets*, 2004; 5: 41–56
- [40] Uno-Furuta S., Tamaki S., Takebe Y., Takamura S., Kamei A., Kim G., Kuromatsu I., Kaito M., Adachi Y., Yasutomi Y.: Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes by *in vivo* electric administration of peptides. *Vaccine*, 2001; 19: 2190–2196
- [41] Vidalin O., Fournillier A., Renard N., Chen M., Depla E., Boucreux D., Baumert T., Nakano I., Fukuda Y., Liljestrom P., Trepo C., Inchauspe G.: Use of conventional or replicating nucleic acid-based vaccines and recombinant Semliki forest virus-derived particles for the induction of immune responses against hepatitis C virus core and E2 antigens. *Virology*, 2000; 276: 259–270
- [42] Yurkova M.S., Patel A.H., Fedorov A.N.: Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus. *Protein Expr. Purif.*, 2004; 37: 119–125
- [43] Zhu L.X., Liu J., Ye Y., Xie Y.H., Kong Y.Y., Li G.D., Wang Y.: A candidate DNA vaccine elicits HCV specific humoral and cellular immune responses. *World J. Gastroenterol.*, 2004; 10: 2488–2492