

Cjepiva protiv genitalnog herpesa

dr. sc. Zorka Mikloška, Lada Brkić, dipl. ing., Lucija Slavica, dipl. ing., Željka Mačak-Šafranko, dipl. ing.
Zavod za molekularnu medicinu, Institut "Ruđer Bošković"

Genitalni herpes učestala je spolno prenosiva bolest za koju ne postoji učinkovito cjepivo. Protuviralna terapija za ovu bolest vrlo je skupa i nije učinkovita. Na Institutu "Ruđer Bošković" radi se na pronalasku cjepiva koje bi bilo učinkovito za većinsku populaciju ljudi. U tu svrhu istražuje se imunodominantnost glavnih djelića virusa za prepoznavanje od imunokompetentnih T-limfocita u većinskoj populaciji muškaraca i žena, te najbolji adjuvansi za dodatak cjepivu. Kako bi se razvilo cjepivo primjenjivo za najširu populaciju, potrebna je pomoć stručne zdravstvene javnosti, što je ključno za ostvarenje ovog cilja

Genitalni herpes, kojeg uzrokuje infekcija virusom Herpes simplex (HSV) tipa 2 ili 1, učestala je spolno prenosiva bolest, a infekcija tim virusima pomaže prenošenju infekcije virusom humane imunodeficijencije (HIV).¹ Nakon infekcije kože ili sluznice, virus HSV se prenosi do neurona korijena ledne moždine u kojima se replicira i uspostavlja doživotnu latentnu infekciju (dormantno stanje virusa). Nakon prikladnog podražaja, kao što su UV zračenje, fizički ili emocionalni stres, mjesečnica i slično, virus se prenosi natrag da bi reinficirao kožu ili sluznicu i izazvao epizodu ponavljajućeg herpesa.² Najdjelotvorniji u zalječenju ponavljajućeg herpesa su citotoksični T-limfociti i u manjoj mjeri neutralizirajuća protutijela na virus.³ Česte asimptomatske lezije na koži ili sluznici predstavljaju stalnu opasnost za horizontalni prijenos infekcije. Kako još nije razvijeno uspješno cjepivo protiv genitalnog herpesa, anti-virusna terapija ostaje za sada jedino rješenje. Na Institutu "Ruđer Bošković" radi se na pronalasku cjepiva protiv genitalnog herpesa.

Općenito, u svijetu je više zaraženih u zemljama u razvoju nego u razvijenim zemljama, u urbanim nego u ruralnim područjima, kod žena nego kod muškaraca, naročito među mladima.⁴

Oko 20-60% spolno aktivnih muškaraca i žena u svijetu ima protutijela na HSV-2, a 40-90% protutijela na HSV-1.⁵ Godišnje se oko 2 milijuna ljudi zarazi ovim virusom.⁶ Epidemiološka studija za Hrvatsku ne postoji, ali uočen je vrlo visoki porast ove zaraze.

Potruga za cjepivom protiv genitalnog herpesa traje desetljećima. Jedino djelomično djelotvorno cjepivo, koje je razvio GlaxoSmithKline, pokazalo se vrlo djelotvornim u žena koje nisu već zaražene herpesom.⁷ Prethodna infekcija s virusom HSV-1 izgleda da djelomično štiti od infekcije virusom HSV-2. Lijek protiv genitalnog herpesa ne postoji, a na tržištu su dostupna samo protuviralna sredstva koja ometaju razmnožavanje virusa, čime se samo umanjuju simptomi te skraćuje trajanje epizoda genitalnog herpesa. No, protuviralna terapija protiv HSV je samo kratkotrajno i djelomično djelotvorno rješenje.

Globalna strategija za kontrolu infekcije HSV-1 i 2 jest razvoj učinkovitog cjepiva koje bi trebalo smanjiti frekvenciju i ozbiljnost reaktivacija, rizik oboljenja novorođenčadi, te rizik od infekcije virusom HIV-1 (TABLICA 1). Budući da je većina zaraženih asimptomatična, dakle nema očiglednih simptoma zaraze, jedan od glavnih ciljeva cjepiva bila bi zaštita nezaraženih osoba, ili sprječavanje širenja virusa sa zaraženih partnera, što je realističniji cilj.

Prepreke razvoju učinkovitog cjepiva su latentno stanje virusa, izbjegavanje imunog odgovora te svojstvo širenja infekcije prema periferiji, gdje je imunološki sustav spor i slabije učinkovit.⁸ Važni faktori za razvoj uspješnog cjepiva protiv genitalnog herpesa uključuju odabir odgovarajućih imunodominantnih proteina virusa HSV, imunopotentirajućih spojeva (adjuvansa) i imunomodulirajućih molekula (citokina), te novih vektora za izradu DNA cjepiva, rekombinantnih virusnih cjepiva i specifičnih HSV mutanta. Vrlo je važan

i način unošenja cjepiva (supkutano ili preko sluznice), te protokol korištenja cjepiva (*prime* i *boost* strategija).⁸

Razvoj cjepiva protiv genitalnog herpesa počeo je prije 70-ak godina. Profilaktička i terapijska cjepiva testirana su u kliničkim uvjetima. Cjepiva protiv HSV-2 uključuju proteinske podjedinice, mrtvi virus, živi rekombinantni ili atenuirani virus (oslabljeni), te virusnu DNK (TABLICA 2).

Umrtrljeni virus. Cjepiva bazirana na umrtrljenom virusu uspješno su testirana na životinjskim modelima, a korištena su i u imunoterapiji. Virus se umrtrljuje obradom inficiranog tkiva s fenolom ili izlaganjem virusa dobivenog iz stanične kulture UV svjetlu. Testiranja su pokazala da imaju kratkoročan učinak kod zaraženih ljudi, slično učinku koji se postiže protuvirusnim sredstvom acyclovirom.⁹

Cjepiva s inaktiviranim virusnim patogenima. Ispitivano je cjepivo koje se sastojalo od smjese glikoproteina virusne ovojnice (gD2, gB2 i dr.). Međutim, nije zabilježen zaštitni učinak od infekcije virusom HSV-2.¹⁰

Frakcionirana virusna cjepiva. Priprema takvih cjepiva protiv virusa HSV-2 temelji se na inaktivaciji virusa u staničnoj kulturi te pročišćavanju frakcija virusnih glikoproteina ovojnice. Ti glikoproteini su ekstrahirani pomoću deterdženta i pročišćeni na gradijentu saharoze. Klinička testiranja su bila prekinuta zbog slabe imunogeničnosti i nedovoljne aktivacije staničnog imunog odgovora.¹¹

Podjedinično cjepivo. Najviše truda uloženo je u razvoj podjediničnih cjepiva protiv HSV-2. Ta vrsta cjepiva je sigurna, kemijski definirana, selektivna i stabilna. Sastoji se od rekombinantnih glikoproteina koji su najjači izazivači imunog odgovora na HSV-2.

Tablica 1. Ciljevi idealnog profilaktičkog cjepiva protiv HSV

Klinički ciljevi	Biološki ciljevi
Oslabiti/ukloniti bolest (genitalni herpes)	Oslabiti/ukloniti virusnu replikaciju u sluznici genitalnog područja
Oslabiti/spriječiti neonatalni herpes	Spriječiti ulazak u neurone
Oslabiti/spriječiti širenje genitalnog herpesa	Spriječiti uspostavljanje latencije
Oslabiti/spriječiti infekciju s HSV-2	Spriječiti reaktivaciju virusa iz stanja latencije

Tablica 2. Cjepiva razvijena protiv virusa herpes simplex (HSV)

Neuspješne strategije	Trenutačni kandidati za cjepivo
Umrtrljeni virus	Rekombinantni proteini HSV
Frakcionirana virusna cjepiva	Peptidna cjepiva
Replikacijski sposobna živa virusna cjepiva	Cjepiva sa živim, ali umrtrljenim virusima HSV-2
	Virus HSV-2 s oštećenim mehanizmom umnožavanja
	DNA cjepiva

Provedeno je nekoliko testiranja na ljudima. Podjedinično cjepivo koje je najviše obećavalo proizveo je GlaxoSmithKline. Sastojalo se od skraćene oblika HSV-2 gD s dodatkom dvaju adjuvansa, aluminom i deaciliranim monofosforil lipidom A (3-dMPL), i bilo je razvijeno na osnovi suradnje s dr. sc. Zorkom Mikloškom.^{12,13} U trećoj fazi kliničkog testiranja to je cjepivo smanjivalo kliničke simptome HSV-2 infekcije za čak 75%, ali samo u HSV-1 seronegativnih žena. Sličan imunološki odgovor se dobio i kod muškaraca, ali njih ne štiti od infekcije. Budući da je 80-95% odraslih ljudi zaraženo s HSV-1, nije vjerojatno da bi to cjepivo imalo velik učinak na sprječavanje širenja HSV-2.⁷

Cjepiva sa živim, ali umrtvljenim virusom HSV-2. Cjepiva sa živim, ali umrtvljenim virusom HSV-2 imaju smanjenu virulentnost te induciraju dugotrajan i snažan imunološki odgovor. Nedostaci su mogućnost rekombinacije *in vivo* s divljim tipom virusa te uspostavljanje latencije, a i cjepivo je relativno nestabilno.¹⁴

Replikacijski sposobna živa virusna cjepiva. Pripremaju se uklanjanjem gena za virulenciju i ubacivanjem dodatnih kopija gena za glikoproteine (uobičajeni su gD i gB). Svrha je zaobilazanje problema uskog raspona epitopa koji induciraju imuni odgovor. Roizman i suradnici stvorili su najšire testirano humano cjepivo sa živim, atenuiranim virusom.^{2,15} Razvoj ovog cjepiva je zaustavljen zbog njegove slabe imunogeničnosti.

Virus HSV-2 s oštećenim mehanizmom umnožavanja. Manipulirani virus koji prolazi samo jedan ciklus replikacije (DISC, engl. *disabled infectious single cycle*) nije u mogućnosti inficirati susjedne stanice.¹⁶ Slični po učinku su mutanti s oštećenom replikacijom. Imaju delecije više ključnih gena za replikaciju virusa HSV-2, pa ne stvaraju potomstvo, ali ekspimiraju široki spektar virusnih proizvoda.

Cjepivo protiv virusa HSV-2 s jednim replikacijskim ciklusom koje je ušlo u klinička istraživanja napravljeno je od virusa kojem je deletiran gen UL22, koji kodira za gH (glikoprotein ovojnice). Cjepivo se pokazalo sigurnim, ali nije pokazalo dovoljan stupanj zaštite protiv simptomatskih ponavljanja pa su istraživanja zaustavljena.¹⁶

Peptidna cjepiva. Peptidna cjepiva predstavljaju novi pristup u razvoju učinkovitog cjepiva protiv genitalnog herpesa. Zasnivaju se na pretpostavci da se imunološki odgovor može potaknuti izlaganjem pojedinačnim epitopima koje prepoznaju CD4, CD8 ili B limfociti. Peptidna cjepiva su sigurna i lako ih je proizvesti, ali najveći problem predstavlja pronalaženje prave kombinacije peptida koji

moгу inducirati imuni odgovor u imunološki heterogenoj ljudskoj populaciji.¹⁷ Jedan od kandidata za peptidno cjepivo je LEAPS (engl. *ligand for epitope of the antigen presenting system*). Cjepivo je pripremljeno od epitopa za koje su specifični B i T-limfociti.¹⁸

DNA cjepiva. Plazmidna DNA koja kodira gene HSV-2 virusa (gD, gB ili ICP 27) inducira protektivnu imunost u nekih životinjskih modela, ali ne u svih.^{19,20} Da bi se povećala učinkovitost DNA cjepiva, u novije vrijeme radi se na umetanju nekoliko različitih konstrukata u plazmid, kao što su CpG motivi te geni za citokine ili kemokine.²¹ Do sada nije bilo terapijski aktivnog cjepiva u ljudskim testiranjima.

Zaključak

Na Institutu "Ruder Bošković" u tijeku su pokusi koji vode pronalasku cjepiva protiv genitalnog herpesa. U tu svrhu istražuje se imunodominantnost glavnih djelića virusa za prepoznavanje od imunokompetentnih T-limfocita u većinskoj populaciji muškaraca i žena, te najbolji adjuvansi za dodatak cjepivu. Kako bi cjepivo bilo primjenjivo za najširu populaciju, molimo pomoć stručne zdravstvene javnosti, što je ključno za ostvarenje ovog cilja. **M**

LITERATURA

- Celum CL. The interaction between herpes simplex virus and human immunodeficiency virus. *Herpes* 2004; 11 Suppl 1:36A-45A.
- Roizman B, Sears AE. The replication of herpes simplex viruses. Fields BN, Knipe DM, Howley P, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B (ur), In: *Fields' virology*, 3rd ed. New York: Lippincott-Raven Press, 1996; 2231-95.
- Cunningham AL, Mikloska Z. The holly grail: immune control of human herpes simplex virus infection and disease. *Herpes* 2001; 8 Suppl 1:6A-10A. http://www.who.int/docstore/hiv/herpes_meeting/004.htm
- Corey L. Genital Herpes: A Worldwide Epidemic. *Medscape Infectious Diseases* 2004; 6(1).
- Armstrong GL, Schillinger J, Markowitz L, Nahmias AJ, Johnson RE, McQuillan GM, StLouis ME. Incidence of herpes simplex virus type 2 infection in United States. *Am J Epidemiol* 2001; 153:912-20.
- Stanberry LR, Spruance SL, Cunningham AL, Bernstein DI, Mindel A, Sacks S, Tying S. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N Engl J Med* 2002; 347(21):1652-61.
- Koelle DM, Corey L. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16(1):96-113. Review.
- Mastrolorenzo A, Tiradritti L, Salimberli L, Zuccati G. Multicentre clinical trial with herpes simplex virus vaccine in recurrent herpes infection. *Int J STD AIDS* 1995; 6:431-5.
- Ashley R, Mertz G, Clark H, Schick H, Salter D, Corey L. Humoral immune response to herpes simplex virus type 2 glycoproteins in patients receiving a glycoprotein subunit vaccine. *J Virol* 1985; 56(2):475-81.
- Morrison LA. Vaccines against genital herpes: progress and limitations. *Drugs* 2002; 62:1119-29. Review.
- Mikloska Z, Cunningham AL. Herpes simplex type 1 glycoproteins gB, gC, and gD are major targets for CD4-T lymphocyte cytotoxicity in HLA-DR expressing human epidermal keratinocytes. *J Gen Virol* 1998; 79:353-61.
- Mikloska Z, Ruckholdt M, Ghadiminejad I, Dunckley H, Denis M, Cunningham AL. Monophosphoryl lipid A and QS21 increase CD8 T lymphocyte cytotoxicity to herpes simplex virus-2 infected cell proteins 4 and 27 through IFN-gamma and IL-12 production. *J Immunol* 2000; 164:5167-76.
- Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic herpes simplex virus vaccines. *Herpes* 2004; 11 Suppl 3:161A-169A.
- Whitley RJ. Herpes simplex virus vaccines. In: *New generation vaccine*. Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, ur. 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1997; 727-47.
- Boursnell ME, Entwisle C, Blekeley D, Roberts C, Duncan IA, Chisholm SE, Martin GM, Jennings R, Ni Challanain D, Sobek I, Inglis SC, McLean CS. A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. *J Infect Dis* 1997; 175(1):16-25.
- Mester JC, Highlander SL, Osmand AP, Glorioso JC, Rouse BT. Herpes simplex virus type 1-specific immunity induced by peptides corresponding to an antigenic site of glycoprotein B. *J Virol* 1990; 64:5277-83.
- Rosenthal KS, Mao H, Horne WJ, Wright C, Zimmerman D. Immunization with a LEAPS heteroconjugate containing a CTL epitope and a peptide from beta-2-microglobulin elicits a protective and DTH response to herpes simplex virus type1. *Vaccine* 1999; 17(6):535-42.
- Bourne N, Milligan GN, Schleiss MR, Bernstein DI, Stanberry LR. DNA immunization confers protective immunity on mice challenged intravaginally with herpes simplex virus type 2. *Vaccine* 1996; 14:1230-4.
- Ghiasi H, Cia S, Slanina S, Nesburn AB, Wechsler SL. Vaccination of mice with herpes simplex virus type 1 glycoprotein D DNA produces low levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antivir Res* 1995; 28:147-57.
- Jones CA, Cunningham AL. Vaccination strategies to prevent genital herpes and neonatal herpes simplex virus (HSV) disease. *Herpes* 2004; 11:12-17. Review.

Poziv muškarcima na dobrovoljno anonimno sudjelovanje u istraživanjima za pronalazak cjepiva protiv genitalnog herpesa

U Institutu "Ruder Bošković" razvija se cjepivo protiv genitalnog herpesa. Domaći stručnjaci prvi su u svijetu otkrili najvažnije djeliće virusa koje prepoznaju bijela krvna zrnca te ga postupno uništavaju. Jedino, ali samo djelomično uspješno cjepivo protiv genitalnog herpesa koje je do danas istraženo razvila je farmaceutska tvrtka GlaxoSmithKline na osnovi rezultata zajedničke suradnje s dr. sc. Zorkom Mikloškom. Cjepivo se pokazalo uspješnim samo kod žena koje nisu zaražene virusom Herpes simplex tip 1, ali ne i kod muškaraca. Zato nastavljamo studije ispitivanja različitosti reakcije na virus kod muškaraca i žena koje bi u skorijoj budućnosti rezultirale izumom cjepiva. Molimo za suradnju stručnu zdravstvenu javnost te pozivamo muškarce koji imaju kliničku infekciju genitalnim herpesom, ili na nju sumnjaju, da nas kontaktiraju. Anonimnim doniranjem male količine svoje krvi pomogli bi istraživanjima za pronalazak cjepiva protiv genitalnog herpesa, a time i rješavanju ozbiljnih posljedica koje infekcije ovim virusom mogu uzrokovati, osobito po reproduktivno zdravlje, zdravlje trudnica i novorođenčadi. Unaprijed zahvaljujemo.

Kontakt: dr. sc. Zorka Mikloška
Zavod za molekularnu medicinu, Institut "Ruder Bošković"
Tel.: 01/4560-964, mikloska@irb.hr