

Received: 2013.06.28  
Accepted: 2013.11.21  
Published: 2013.12.30

## Zastosowanie wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (VSV) jako wektora szczepionek przeciwwirusowych

### Vesicular stomatitis virus (VSV) as a vaccine vector for immunization against viral infections

Tomasz Tomczyk, Beata Orzechowska

Institut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu

#### Streszczenie

Wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (*vesicular stomatitis virus* - VSV), należący do rodziny *Rhabdoviridae*, jest obiecującym wektorem wirusowym wykorzystywanym podczas opracowywania szczepionek przeciwwirusowych o potencjalnym zastosowaniu u ludzi. W przyrodzie VSV jest patogenem ssaków kopytnych, w tym zwierząt hodowlanych. Najważniejszymi cechami VSV czyniącymi z niego doskonałą platformę do rozwoju różnych terapii przeciwwirusowych są jego immunogenność i efektywne namnażanie do wysokich mian w liniach komórkowych stosowanych w produkcji szczepionek. Zakażenia człowieka VSV są stosunkowo rzadkie i cechują się łagodnymi, grypopodobnymi objawami. Co więcej, ze względu na powinowactwo glikoproteiny osłonkowej VSV do powszechnie występującego receptora LDL (lipoproteiny niskiej gęstości), wirus ten skutecznie kieruje się do różnych tkanek *in vivo*. Wiele wyników badań potwierdza możliwości opracowania szczepionek wektorowych z zastosowaniem VSV przeciw wirusom brodawczaka ludzkiego (HPV), ludzkiemu wirusowi niedoboru odporności (HIV), wirusowi zapalenia wątroby typu B (HBV) i filowirusom (MARV, ZEBOV i SEBOV), a także potencjalne zastosowanie opracowanej szczepionki przeciw wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV). VSV wykazuje neurotropizm, co w następstwie zakażenia może powodować wirusowe zapalenie mózgu u zwierząt doświadczalnych. Z tego względu trwają intensywne prace nad osiągnięciem wystarczającej ekspresji antygenów wirusowych z jednoczesnym zachowaniem bezpieczeństwa skonstruowanego wektora.

**Słowa kluczowe:** wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej • vesicular stomatitis virus • VSV • wektor szczepionkowy

#### Summary

Vesicular stomatitis virus (VSV), a member of the *Rhabdoviridae* family, is a promising candidate for potential use in construction of antiviral vaccines. In the natural environment VSV is a pathogen of wild ungulates and livestock. Some of the features that make VSV an excellent platform for the development of a range of viral therapeutics includes its immunogenicity and ability to grow to high titers in cell lines approved for vaccine use. Infection in humans is rare and usually asymptomatic, with mild flu-like symptoms. Moreover, due to affinity of VSV envelope glycoprotein to the LDL (low-density lipoprotein) receptor, VSV is effective at targeting a variety of tissues *in vivo*. A series of research results confirm the possibility of developing VSV-based vaccines against human papilloma viruses (HPV), human immunodeficiency virus (HIV), hepatitis B virus (HBV) and filoviruses (MARV, ZEBOV and SEBOV), as well as the potential use of a successfully developed vaccine against hepatitis C virus (HCV). VSV is

<b>Key words:</b>	neurotropic and infection can cause a viral encephalitis in experimental animals. Therefore, intensive studies are being undertaken to achieve satisfactory expression of the viral antigens while maintaining the safety of the constructed vectors. <b>vesicular stomatitis virus - VSV - vaccine vector</b>
<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1083016">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1083016</a>
<b>Word count:</b>	6414
<b>Tables:</b>	-
<b>Figures:</b>	1
<b>References:</b>	110

**Adres autora:** mgr Tomasz Tomczyk, Laboratorium Wirusologii, Zakład Immunologii Chorób Zakaźnych, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. Ludwika Hirszfelda, ul. R. Weigla 12, 53-114 Wrocław; e- mail: tomasz.artur.tomczyk@gmail.com

## WSTĘP

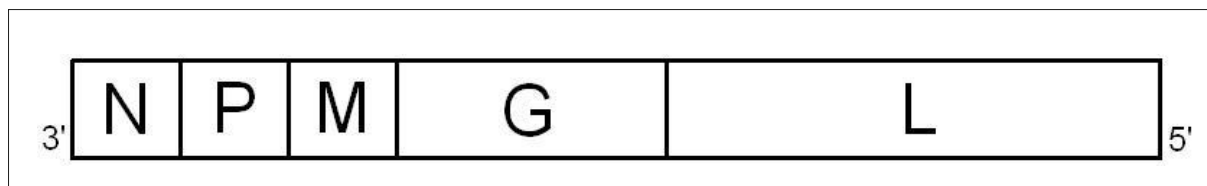
Wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (vesicular stomatitis virus - VSV) należy do rodziny *Rhabdoviridae* rzędu *Mononegavirales*. W przyrodzie VSV jest patogenem ssaków kopytnych, w tym zwierząt hodowlanych, takich jak konie, bydło i świnie. Zakażenie człowieka jest stosunkowo rzadkie i cechuje się łagodnymi, grypopodobnymi objawami [62]. VSV zawiera silnie upakowany genom w postaci pojedynczej nici RNA o ujemnej polarności (ssRNA(-)) złożonej z pięciu nienakładających się na siebie genów kodujących białka wirusowe (ryc. 1). Wirusowy materiał genetyczny jest związany z białkiem nukleokapsydu (N), tworząc spiralny rdzeń rybonukleoproteinowy (RNP). W kapsydzie znajdują się również wirusowa RNA-zależna polimeraza RNA (L) oraz jej kofaktor - fosfoproteina (P). Spiralnie upakowany rdzeń RNP jest stabilizowany białkiem macierzy (M) i otoczony podwójną warstwą lipidową, w której znajduje się glikoproteina (G) odpowiedzialna za wiązanie wirusa do komórki gospodarza i fuzję z jej błoną [34,42]. VSV może zakażać większość komórek kręgowców i wiele spośród komórek bezkręgowców. Powszechność występowania receptora dla VSV na komórkach oraz łatwość i szybkość hodowli wirusa sprawiły, że często wykorzystuje się go w badaniach dotyczących wnikań wirusów do komórki, replikacji wirusowego materiału genetycznego i tworzenia cząstek wirusowych w komórce [23,78]. Ze względu na brak potwierdzonych infekcji VSV u ludzi, w Europie wirus ten często używany jest w badaniach nieswoistych interakcji wirusów z układem odpor-

nościowym człowieka, np. Błach-Olszewska i wsp. użyli go do opracowania testu na badanie poziomu nieswoistej odpowiedzi immunologicznej u ludzi [54,77,109]. W połowie lat 90 ub.w. naukowcy wykorzystując standardowe techniki klonowania odtworzyli pełny genom VSV w postaci komplementarnego DNA (complementary DNA - cDNA), dzięki wklonowaniu pojedynczych genów VSV oraz ich sekwencji łączących do plazmidu pGEM-3 z promotorem T7. Otrzymane plazmidy pVSV1(+) oraz pVSV1(-), różniące się polarnością, są nadal wykorzystywane do opracowywania szczepionek na bazie VSV [106]. Konstrukcja wektorów opartych na VSV, które nie tylko kodują białka innych patogennych wirusów, lecz także białka terapeutyczne jest coraz częściej wykorzystywaną strategią. Trzeba mieć jednak na względzie zagrożenia związane z potencjalną neurotoksycznością wirusa - VSV może być przyczyną śmiertelnego zapalenia mózgu nie tylko u gryzoni, ale też u małych wąskonosych [75].

## PROJEKTOWANIE WEKTORÓW SZCZEPIONKOWYCH

Wirus pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej może być wykorzystany jako wektor szczepionek, po wbudowaniu do jego genomu genów kodujących antygeny innego patogennego wirusa. Wektory wirusowe oparte na VSV można podzielić na:

- replikacyjnie kompetentne, gdy zawierają zestaw prawidłowych genów wirusa, niezbędnych do przejścia całego cyklu infekcji wirusowej;



**Ryc. 1.** Mapa genomu VSV. Litery oznaczają geny kodujące: N - białko nukleokapsydu, P - fosfoproteinę, M - białko macierzy, G - glikoproteinę powierzchniową, L - RNA-zależną polimerazę RNA

- replikacyjnie defektywne, gdy usunięcie lub zmiana w którymkolwiek z genów wektora skutkuje zablokowaniem jego cyklu replikacji na jednym z etapów następujących po wnikięciu wirusa do komórki.

Wektory replikacyjnie kompetentne po podaniu do organizmu wywołują silną i długotrwałą odpowiedź immunologiczną, jednak ze względu na bezpieczeństwo stosowania nie powinny być podawane osobnikom z obniżoną odpornością. Wektory defektywne są potencjalnie bezpieczniejsze, ale ich zastosowanie wiąże się z koniecznością podania większej liczby dawek w celu wywołania optymalnej odpowiedzi immunologicznej. Przykładem wektora replikacyjnie defektywnego może być wektor pozbawiony genu kodującego glikoproteinę G lub ekspresjonujący ją w skróconej postaci [107].

Wektory szczepionek przeciwwirusowych na bazie VSV najczęściej tworzy się poprzez insercję lub substytucję określonego genu wirusowego do genomu VSV. Badania prowadzone najpierw na małych ssakach, a następnie na świnich udowodniły, że największe znaczenie w patogenności VSV ma położenie genu N. W szczepie dzikim gen N znajduje się na końcu 3' i jest pierwszym, a co za tym idzie najsilniej transkrybowanym genem VSV [4,51]. Zmiana jego położenia w wyniku rekombinacji prowadzi do atenuacji wirusa, w stopniu zależnym od oddalenia od promotora [31]. Zaobserwowano, że przeniesienie genu glikoproteiny G w stronę 3', czyli bliżej promotora, skutkowało zwiększoną odpowiedzią humoralną u myszy [30]. Brak potwierdzonych przypadków rekombinacji homologicznej u któregośkolwiek z przedstawicieli rzędu *Mononegavirales* wskazuje, że rearanżacja genomu stosowana podczas tworzenia rekombinantów VSV jest nieodwracalna, co zwiększa bezpieczeństwo konstruktów VSV jako wektorów szczepionek [105]. Tego rodzaju atenuacja pozwala na osłabienie neuropatogenności wektorów rVSV z jednoczesnym zachowaniem ich wysokiej immunogenności. Na przykład w badaniach nad szczepionką przeciw HIV testowano strategię atenuacji rVSV, które obejmowały kombinacje translokacji genu N, mutacji genu M oraz skracania genu G. Ostatnia z wymienionych procedur prowadzi do delecji części domeny cytoplazmatycznej glikoproteiny rVSV. Konstrukty tak przygotowanych wektorów zawierały gen *gag* z HIV w pozycji pierwszej genomu rVSV, tuż za sekwencją liderową, co doprowadziło do dalszej atenuacji wektora wirusowego z jednoczesnym zwiększeniem udziału odpowiedzi humoralnej przeciw białku Gag [17].

## VSV JAKO WEKTOR SZCZEPIONKOWY

### Szczepionki profilaktyczne i terapeutyczne przeciw HPV

Wirus brodawczaka ludzkiego (human papillomavirus – HPV) jest uważany za czynnik etiologiczny prawie w 90% przypadków raka szyjki macicy. Istnieje ponad 80 różnych typów HPV, niektóre z nich mogą być przenoszone drogą płciową i zakażać nabłonek organów płciowych powodując powstawanie tzw. kłykcin kończystych. Przyczyną

większości z nich jest HPV typu 6 i 11, natomiast typy 16 i 18 najczęściej są związane z powstawaniem zmian nowotworowych w obrębie narządów rozrodczych [7,9,25,46]. W Polsce istnieje możliwość zaszczepienia się przeciw wymienionym typom HPV szczepionką dwuwalentną (skierowaną przeciw HPV typu 16 i 18) lub czterowalentną (chroni przed infekcją HPV typu 6, 11, 16 i 18). Ograniczenia stosowania tych szczepionek wynikają z ich wysokiej ceny, czynników społecznych (błędne przeświadczenie o szkodliwości szczepień) oraz zakresu działania - w tworzenie się zmian nowotworowych w obrębie narządów rozrodczych mogą być zaangażowane inne typy wirusa, przed którymi nie chroni szczepionka [101].

Do opracowania alternatywnej szczepionki przeciw HPV często wykorzystywany jest króliczy model oparty na wirusie brodawczaka królików (cottontail rabbit papillomavirus – CRPV). Genomy wirusów brodawczaka HPV i CRPV charakteryzują się znaczną homologią sekwencji, w której geny sobie odpowiadające kodują białka o podobnych funkcjach. Ponadto zakażenie CRPV przebiega w charakterystyczny sposób, a zmiany skórne pojawiają się w miejscu skaryfikacji wirusem. W badaniach nad opracowaniem nowej szczepionki przeciw HPV stosowano białko kapsydu L1 wirusa brodawczaka króliczego, jednak takie zaszczepienie wymaga bardzo dużych ilości niezdenaturowanego białka z adiuwantem, a następnie kilku szczepień przypominających [65]. Grupa pod kierunkiem J. D. Reutera skonstruowała w 2002 r. rekombinowany VSV (rVSV) przez insercję genu kodującego białko kapsydu L1 CRPV między geny kodujące białka G i L VSV. Wektorem VSV-L1 szczepiono króliki różnymi sposobami: donosowo, domięśniowo i śródskórnym. Króliki były całkowicie zabezpieczone przed chorobą wywołaną przez CRPV, a odpowiedź humoralną w stosunku do białka L1 zaobserwowano już po pojedynczym śródskórnym lub domięśniowym podaniu szczepionki VSV-L1 lub podaniu donosowym z dawką przypominającą [89]. Dwa lata później zespół A. Robertsa skonstruował drugi wektor – VSVL1-2 – w którym gen kodujący białko L1 pochodzący z CRPV wbudowano między geny N i P VSV. Przesunięcie pozycji insertu bliżej końca 3' RNA wirusa zwiększało ekspresję białka L1, dzięki czemu osiągnięto całkowitą ochronę przed CRPV (obserwacje prowadzono przez 10 tygodni od skaryfikacji CRPV) już po domięśniowym podaniu pojedynczej dawki szczepionki [91].

Szczepionki na bazie wektora VSV mogą być także wykorzystywane w immunoterapii, leczeniu istniejącego zakażenia i zmian nowotworowych. Takie badania przeprowadzono na modelu króliczego brodawczaka, w którym wykorzystano cztery wczesne geny CRPV: E1, E2, E6 i E7. Dwa pierwsze kodują białka niezbędne do replikacji, natomiast produkty genów E6 i E7 biorą udział w transformacji nowotworowej oraz są konstytutywnie ekspresjonowane we wszystkich nowotworach związanych z wirusem brodawczaka. Brandsma i wsp. skonstruowali rekombinanty VSV wykazujące ekspresję pojedynczych wczesnych genów CRPV przez ich insercję do genomu VSV między geny G i L. Króliki zainfekowano CRPV przez

skaryfikację. Po tygodniu podzielono je na grupy i podano szczepionki zawierające jeden lub dwa rodzaje wektorów rVSV. Wszystkie szczepionki znacząco redukowały objętość brodawczaków wywołanych przez CRPV w porównaniu z grupą kontrolną, która otrzymała tylko wektor (rVSV). Najlepszy terapeutyczny wynik uzyskano po zastosowaniu wektora VSV-E7, mimo stwierdzenia braku odpowiedzi humoralnej przeciw E7, co sugeruje udział odpowiedzi komórkowej w redukcji zmian nowotworowych [10]. W kolejnych eksperymentach Brandsma i wsp. podnieśli efektywność szczepienia wektorem VSV kodującym białko E6 przez doszczepienie zwierząt szczepionką DNA UbE6 powstałą na bazie plazmidu pcDNA3 z wbudowanym genem E6. Zaobserwowano zmniejszenie się trwałych zmian przednowotworowych o 67% w porównaniu do grupy kontrolnej [11].

Obiecujące wyniki związane z użyciem wektora VSV-E7 u królików skłoniły badaczy do podjęcia dalszych prób udoskonalenia szczepionek wektorowych do zastosowania w immunoterapii. Liao i wsp. testowali wpływ szczepienia wektorem VSV-E7 na wzrost guza nowotworowego u myszy. Wektor skonstruowano przez insercję genu kodującego białko E7 z HPV typu 16 do genomu VSV tuż za genem kodującym białko N, zapewniając tym samym zwiększoną ekspresję białka E7. Wektorem VSV1-16E7 szczepiono myszy C57BL/6, tydzień po iniekcji komórek rakowych linii TC-1 (syngenicznych mysich komórek rakowych ekspresjonujących białko E7 z HPV16 oraz onkogen *ras*). Dwa tygodnie po podaniu pojedynczej dawki szczepionki objętość guzów nowotworowych była 10-krotnie mniejsza w grupie szczepionej VSV1-16E7 w porównaniu do grupy szczepionej wektorem kontrolnym. Ponadto zauważono silniejszą odpowiedź komórkową (swoiste CD8<sup>+</sup> wytwarzające IFN- $\gamma$ ) po szczepieniu VSV1-16E7 w grupie myszy z rozwiniętym nowotworem niż w grupie bez nowotworu. Przyniesione wyniki badań wskazują, że komórki nowotworowe wywołują w organizmie odpowiedź przeciwnowotworową, która może być następnie wzmacniana przez szczepienia z użyciem rVSV [64].

### Szczepionki przeciw wirusom zapalenia wątroby typu C i B

Wirus zapalenia wątroby typu C (hepatitis C virus – HCV) jest głównym czynnikiem etiologicznym ciężkich chorób wątroby. Szacuje się, że ponad 170 mln ludzi na świecie może być nosicielami HCV [47]. Leczenie farmakologiczne za pomocą rybawiryny i pegylowanego interferonu  $\alpha$ , oraz inhibitorów proteaz prowadzi do uzyskania trwałej odpowiedzi wirusologicznej i eradykacji wirusa u 60% pacjentów, jednak sukces leczenia zależy też w dużym stopniu od genotypu HCV [49,80,81]. Istotnym powikłaniem u osób przewlekle zakażonych jest zapalenie, marskość lub pierwotny rak wątroby, dlatego wciąż istnieje zapotrzebowanie na opracowanie szczepionki zapobiegającej nowym zakażeniom [76,98]. Genom HCV to jednoniciowy RNA o polarności dodatniej i wielkości 9500 nukleotydów. Koduje prekursorową poliproteinę o długości 3000 aminokwasów, która jest następnie przetwarzana na 10 różnych

białek: strukturalnych (C, E1, E2) i niestrukturalnych (P7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) [5].

Podczas diagnozowania serologicznego w kierunku rozpoznania infekcji HCV najczęściej wykrywa się przeciwciała przeciwko białku rdzenia (core – C) oraz białkom NS3, NS4A/4B oraz NS5A. Mimo to kluczem do wyzwolenia odpowiedzi immunologicznej zależnej od przeciwciał, która mogłaby zneutralizować wirusa są glikoproteiny osłonki (E1 i E2). Białka E1 i E2 są bezpośrednio odpowiedzialne za wiązanie wirusa z nieodkrytym dotychczas receptorem na powierzchni komórki [6,48]. Szczepienie szympanów rekombinowanymi glikoproteinami E1/E2 spowodowało nie tylko powstanie przeciwciał neutralizujących, chroniących przed zakażeniem niskimi dawkami HCV [50], ale także skrócenie czasu trwania wirerii w wyniku reinfekcji [84]. Przydatność konstruktów VSV z delecją genu G (VSV $\Delta$ G) została potwierdzona w badaniach Majid i wsp., w których w miejsce genu kodującego glikoproteinę G zostały wstawione geny białek strukturalnych HCV-C, E1 i E2. Wektor (VSV $\Delta$ G) pozbawiony genu G, niezbędnego do namnażania się wirusa w komórkach, jest bezpieczny dla organizmu szczepionego i jednocześnie silnie immunogenny. Wykorzystując model myszy BALB/c uzyskano obiecujące rezultaty. Myszy szczepiono wektorami: dzikim VSV-C/E1/E2 lub VSV z delecją G (VSV $\Delta$ G-C/E1/E2). Po upływie 6 tygodni zakażano je rekombinowanym wirusem krowianki (vaccinia virus – VV) ekspresjonującym te same białka HCV, co wcześniej użyte wektory (recombinant vaccinia virus expressing the HCV structural proteins – vv-HCV.S). Wyniki badań wykazały, że defektywny wektor VSV $\Delta$ G-C/E1/E2 stymulował humoralną i komórkową odpowiedź immunologiczną u myszy, porównywalną z wektorem dzikim VSV-C/E1/E2. Ponadto miano vv-HCV.S w jajnikach myszy szczepionych wektorem VSV $\Delta$ G-C/E1/E2 było o dwa logarytmy niższe w porównaniu do miana u myszy, które otrzymały kontrolny wektor VSV $\Delta$ G. W badaniach oceniono również wpływ szczepienia wektorem VSV $\Delta$ G-C/E1/E2 na wzrost guza nowotworowego ekspresjonującego białko E2. U myszy w grupie szczepionej defektywnym wektorem nie rozwijały się lub rozwijały znacznie mniejsze guzy niż u tych, którym podawano wektor kontrolny. Zmierzono stężenie IFN- $\gamma$  wytwarzanego przez komórki śledziony wyizolowane ze szczepionych myszy, które następnie stymulowano komórkami guza. Zauważono też, że stężenie tej cytokiny jest prawie dwukrotnie wyższe w hodowli komórek pobranych od myszy szczepionych VSV $\Delta$ G-C/E1/E2 w porównaniu do grupy szczepionej wektorem kontrolnym. Przedstawione wyniki badań świadczą o potencjale aplikacyjnym szczepionek wektorowych na bazie VSV $\Delta$ G, których bezpieczeństwo jest niewątpliwie ogromną zaletą [68].

Według bieżących szacunków około 30% światowej populacji, czyli prawie 2 mld, jest zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu B (hepatitis B virus – HBV) [108]. Przewlekle wirusowe zapalenie wątroby (wzw) typu B może być przyczyną marskości wątroby oraz pierwotnego raka wątroby [19,66]. Antygenem obecnie dostępnych szczepionek przeciw wzw typu B jest powierzchniowa

glikoproteina produkowana m.in. w drożdżach. Mimo że szczepionki te są bardzo skuteczne i bezpieczne oraz zostały włączone do narodowych programów szczepień w ponad 150 krajach, to 5-10% zdrowych osób z prawidłową odpornością nie wytwarza przeciwciał (anty-HBs), tj. przeciwciał skierowanych przeciwko białku antygenowi powierzchniowego wirusa [110]. Minusem jest też to, że obecna procedura szczepienia zaleca stosowanie 2-3 dawek w celu wywołania trwałej odporności [72]. Badania Cobligha i wsp. w kierunku otrzymania bardziej efektywnej szczepionki, zdolnej do wywołania silniejszej odpowiedzi immunologicznej, polegają na konstrukcji wektorów VSV-MS na bazie VSV ekspresjonującego część powierzchniowej glikoproteiny HBV (middle envelope surface protein – MS). Gen kodujący białko MS został wbudowany do genomu VSV między geny G i L. Eksperymenty z wykorzystaniem gradientu gęstości sacharozy wykazały, że białko MS nie jest włączane do wirionów i jest niezależnie wydzielane przez komórki zakażone VSV-MS. U myszy CB6F1 szczepionych VSV-MS stwierdzono nie tylko lepszą odpowiedź humoralną, ale także bardziej swoistą odpowiedź komórkową, niż po szczepieniu białkiem MS z adiuwantem, czy komercyjnie dostępną szczepionką Engerix-B. Ponadto myszy szczepione tylko jedną dawką VSV-MS wykazywały odporność na infekcję HBV uzyskiwaną po podaniu zwierzętom plazmidu pT-HBV1.3. Autorzy sugerują, że ze względu na zdolność wektora VSV-MS do wywoływania silnej, swoistej odpowiedzi komórkowej, szczepionki te mogą być szczególnie skuteczne jako szczepionki terapeutyczne, pomagające kontrolować istniejące zakażenie [15,16].

### **Eksperymentalne szczepionki przeciw HIV**

Ludzki wirus niedoboru odporności (human immunodeficiency virus – HIV), wywołujący zespół nabytego niedoboru odporności (Acquired Immunodeficiency Syndrome – AIDS), do 2011 r. wywołał zakażenie 60 mln osób i był przyczyną 25 mln zgonów. Szacuje się, że ponad 35 mln osób jest nosicielami HIV-1 (dane z 2012 r.) i liczba ta może każdego roku wzrastać o kolejne 2 mln. Jak dotąd jedyną dostępną terapią polega na zastosowaniu leków antyretrowirusowych [24,73,100].

Genom HIV koduje białka osłonki (Env), strukturalne białka Gag, wirusowe enzymy (Pol), dwa białka regulatorowe – Tat i Rev – i kilka pomocniczych (Vpu, Vif, Nef i Vpr). Na białka osłonki HIV składają się trimery zewnętrznej glikoproteiny gp120 niekowalentnie związane z transmembranową glikoproteiną gp41 [52,94].

W rozwoju odporności przeciwko HIV rolę odgrywa zarówno odpowiedź komórkowa, jak i humoralna, podobnie jest w infekcji VSV, co skłoniło badaczy do użycia tego wirusa jako wektora przy testowaniu potencjalnych szczepionek przeciw AIDS [63]. W eksperymentach z 1997 r. zespół J. K. Rose'a wbudował gen kodujący białko osłonki gp140 ze szczepu HIV89,6 wyizolowanego od pacjenta, do genomu VSV między geny G i L [58]. W doświadczeniach wykorzystano trzy wektory VSV różniące się rodzajem

ekspresjonowanego białka G na powierzchni, a mianowicie: białko G ze szczepu Indiana (I), New Jersey (NJ) lub z wirusa Chandipura (Ch), również należącego do rodzaju *Vesiculovirus*. Przeciwciała skierowane przeciw białkom G różnych szczepów VSV nie reagują krzyżowo, dzięki czemu podczas sekwencyjnego szczepienia heterologicznymi wektorami w mniejszym stopniu wywołana jest odpowiedź przeciwko samym wektorom. Między przeciwciał skierowanych przeciw glikoproteinie G u myszy w przypadku podawania kolejnych szczepionek heterologicznych zmniejszyła się odpowiednio 8- (przy pierwszym wzmocnieniu szczepienia) i 80-krotnie (po podaniu drugiej szczepionki wzmacniającej odpowiedź), w porównaniu do grupy kontrolnej, której podawano szczepionki homologiczne. Wyniki badań potwierdzają, że sekwencyjne szczepienie (w miesięcznych odstępach) daje lepsze wyniki, jeśli wykorzystuje się wektory różniące się ekspresjonowanym białkiem G. Dzięki takiemu systemowi szczepień uzyskano czterokrotnie wyższe miano przeciwciał przeciw gp140 niż w przypadku stosowania wektorów homologicznych [93]. Po eksperymentach na modelu mysim potencjał opracowanych szczepionek potwierdzono na modelu rezusa. Uzyskany wynik był zadowalający – otrzymano wysokie miano przeciwciał przeciwko białkom osłonki HIV oraz wyraźnie większe zaangażowanie limfocytów T CD4+ oraz cytotoksycznych swoistych wobec białek Gag i Env. Zaskakująco dobre rezultaty tłumaczy się także dłuższym okresem między szczepieniami wynoszącym dwa miesiące zamiast jednego [92]. Sekwencyjne szczepienie wektorami heterologicznymi dawało jeszcze lepsze efekty, jeśli kolejne wektory konstruowane były z wirusów odrębnych gatunkowo. Podczas badań na modelu mysim zauważono, że szczepienie osobników wektorem VSV Gag i wzmocnienie odpowiedzi wektorem wirusa krowianki ekspresjonującego białko Gag, powodowało pięciokrotny wzrost zaangażowania limfocytów T CD8+ w odpowiedź immunologiczną w porównaniu do wzmocnienia odpowiedzi z użyciem VSV Gag i heterologicznym białkiem G [45]. Podobny trend obserwowano w przypadku zastosowania modelu rezusa i oporności na infekcję silnie patogennym szczepem hybrydowym SHIV 89,6P (simian-human immunodeficiency virus), po szczepieniu wektorami heterologicznymi. SHIV jest konstruktem chimerycznym na bazie małpiego wirusa niedoboru odporności (simian immunodeficiency virus – SIV) z osłonką HIV. Pierwsza badana grupa małp została zaszczepiona w systemie VSV-VSV, oznacza to, że wektory obu szczepionek (pierwszej – pierwotnej i drugiej – przypominającej, wzmacniającej odpowiedź) skonstruowano na bazie VSV ekspresjonującego białka Gag, Pol i Env pochodzące od hybrydy SHIV. Różnice między wektorami VSV dotyczyły ich białek G – pierwotny wektor miał białko G ze szczepu Indiana, natomiast wektor wtórny był mieszaniną dwóch wektorów z białkami G na powierzchni, odpowiednio wirusa Chandipura i VSV szczepu New Jersey. Drugą grupę małp szczepiono systemem VSV-MVA, w którym wektor pierwotny był taki sam jak w systemie poprzednim, ale wektor szczepionki przypominającej bazował na zmodyfikowanym wirusie krowianki szczepu Ankara (modified

vaccinia Ankara – MVA) ekspresjonującym białka Gag, Pol i Env wirusa SHIV. Wszystkie zaszczepione, a następnie eksperymentalnie zakażone zwierzęta pozostały zdrowe, jednak system VSV-MVA wykazał silniejszą ochronę przed rozwojem infekcji SHIV niż system VSV-VSV, co wiązało się z niższym mianem wirusa na wcześniejszych etapach infekcji. Ponadto zaobserwowano większy procent limfocytów T CD4<sup>+</sup> we krwi małych grupy VSV-MVA po infekcji SHIV [87].

Doskonalenie heterologicznych systemów szczepień doprowadziło do wykorzystywania bardzo rzadkich wirusów w roli wektorów. Shell i wsp. skonstruowali wektory bazujące na replikonie wirusa gorączki lasu Semliki (Semliki Forest virus - SFV), ekspresjonującym białka SIV: Gag lub Env. Dodatkowo genom SFV zamknięto w infekcyjnych cząsteczkach zawierających glikoproteinę VSV na powierzchni (SFVG) [95]. Oprócz tego wykorzystano wektor VSV z wklonowanym między geny G i L genom kodującym białko EnvG. Białko EnvG stanowiło cząsteczkę hybrydową – białko powierzchniowe E660 pochodzące od SIV, którego domenę cytoplazmatyczną zamieniono na odpowiadającą jej sekwencję białka G z VSV, powodując bardziej wydajne wbudowywanie się EnvG w błonę cząsteczek VSV [57]. W ciągu 112 dni rezusom podano trzy szczepionki: dwie zawierały wektor VSV (New Jersey lub Indiana), natomiast trzecia - SFVG. Wszystkie wektory ekspresjonowały te same białka SIV (EnvG i Gag). Po 21 tygodniach od podania pierwotnej szczepionki, mały zainfekowano doodbytniczo patogennym szczepem SIVsmE660. Zaobserwowano silne działanie ochronne użytych szczepionek. Tylko u dwóch spośród sześciu osobników szczepionych rozwinęła się infekcja (w grupie kontrolnej rozwinęła się u wszystkich sześciu osobników). Ponadto w grupie szczepionej po zakażeniu SIV zauważono zwiększoną liczbę limfocytów T CD4<sup>+</sup>, zarówno w jelitach, jak i we krwi. Surowiczy poziom przeciwciał skierowanych przeciw białkom osłonki SIV w grupie szczepionej wzrastał po podaniu każdej spośród trzech szczepionek i utrzymywał się na wysokim poziomie nawet 100 dni po zakażeniu małym SIV [95].

Pomimo postępów w opracowywaniu systemu zmniejszenia ryzyka transmisji wirusów przez łożysko w czasie ciąży, karmienie piersią w dalszym ciągu pozostaje ważnym czynnikiem zagrożenia przeniesienia HIV z matki na dziecko w okresie poporodowym. Karmienie piersią stanowi duży dylemat kobiet zamieszkałych w szczególności w krajach ubogich, ponieważ jest najlepszym sposobem odżywiania noworodków oraz zapewnienia im ochrony przed innymi chorobami zakaźnymi, ale jednocześnie może się przyczynić do przenoszenia HIV [60]. W sytuacji idealnej szczepionka przeciw HIV powinna zostać podana dziecku krótko po jego narodzinach i wywołać szybką i silną odpowiedź przeciwwirusową w błonie śluzowej jamy ustnej. Van Rompay i wsp. szczepili nowo narodzone rezusy dwoma rodzajami szczepionek. Pierwszy obejmował dwie dawki – dożylną i doustną – zawierające jedynie atenuowany szczep SIV (SIVmac1A11). Drugi składał się ze szczepionek heterologicznych:

- pierwotnej szczepionki zawierającej cztery konstrukty VSV-SIV, różniące się kodowanymi białkami SIV (Gag, Pol, EnvG lub Rev-Tat-Nef-Vif); podawanej doustnie zaraz po urodzeniu [102],
- wtórnej szczepionki zawierającej dwa konstrukty oparte na wirusie krowianki szczepu Ankara: MVA-SIV (kodujące białka SIV Gag i Pol lub Env), podawanej domięśniowo, dwa tygodnie po urodzeniu [26,103].

Wyniki badań po raz kolejny potwierdziły, że podanie wtórnej, heterologicznej szczepionki wywołuje silniejszą odpowiedź przeciwwirusową niż po podaniu jedynie szczepionki pierwotnej. Oba systemy indukowały wytworzenie odpowiedzi humoralnej swoistej dla SIV, ale różnej pod względem swoistości wobec zawartych antygenów. Szczepionki z SIVmac1A11 skutkowały powstaniem większej ilości przeciwciał skierowanych przeciw białkom Gag i Pol SIV, natomiast drugi system szczepionek powodował wytwarzanie większej ilości przeciwciał wiążących się do białek osłonki SIV. Nie uzyskano odpowiedzi na pytanie, które przeciwciała są bardziej pożądane *in vivo*. W ślinie osobników szczepionych wykryto IgG swoiste dla SIV, niezależnie od tego, którym systemem były szczepione. Mogą one odgrywać ważną rolę ochronną przed transmisją wirusa z matki na dziecko podczas karmienia piersią [102].

W kolejnych badaniach ocenie poddano użyteczność systemu szczepionek heterologicznych w indukcji ochrony przed zakażeniem wirusem SIVmac251. Noworodki rezusów szczepiono układem heterologicznym (pierwotna szczepionka zawierająca konstrukty VSV-SIV ekspresjonujące białka SIV: Gag, Pol i EnvG; wtórna szczepionka zawierająca konstrukty MVA-SIV ekspresjonujące białka Gag, Pol i Env). Dwa tygodnie po podaniu szczepionki wtórnej rezusy zakażano doustnie SIV, imitując sytuację, jaka występuje podczas karmienia noworodków piersią, a następnie obserwowano przez okres 3 miesięcy. Zastosowany system szczepienia w żadnym z badanych przypadków nie zapobiegł rozwojowi infekcji. Zaobserwowano jednak pewne efekty, które mogą posłużyć za wskazówki przy opracowywaniu kolejnych szczepionek przeciw HIV:

- w osoczu osobników szczepionych potwierdzono obecność wykrywalnego poziomu przeciwciał klasy IgA swoistych dla SIV. Poziom ten był odwrotnie proporcjonalny do rozwoju wirerii podczas całego jej przebiegu;
- szczepione osobniki o potwierdzonych w migdałkach wyższych mianach limfocytów T pamięci oraz CD8<sup>+</sup> swoistych dla SIV, wytwarzających TNF- $\alpha$  lub IFN- $\gamma$ , charakteryzowały się niższym poziomem replikacji wirusa. Nie wiadomo jednak czy zidentyfikowane limfocyty znajdowały się w migdałkach rezusów jeszcze przed infekcją SIVmac251. Sugeruje się, że dalsze strategie dotyczące szczepionek przeciw HIV przeznaczonych dla noworodków powinny koncentrować się na zwiększeniu lokalnej odpowiedzi immunologicznej w obrębie błon śluzowych jamy ustnej i gardła po podaniu antygenów szczepionkowych [71].

Podczas opracowywania szczepionek przeciw HIV wykorzystuje się również inne wektory wirusowe zawierające glikoproteinę osłonkową VSV. Takie konstrukty mogą po-

łączyć pożądane cechy cyklu replikacyjnego wybranego wirusa i jednocześnie zmniejszyć odpowiedź wobec samego wektora w przypadku użycia szczepionki wtórnej. Jednym z przykładów wykorzystania takiego konstruktów na modelu rezusa było testowanie użyteczności wektora na bazie atenuowanego wirusa wścieklizny (rabies virus – RV), który ekspresjonował białka Env lub Gag SHIV oraz glikoproteinę G VSV (VSV-G), zastępującą RV-G (wektory SPBN-IG-SIV Gag i SPBN-IG-89.6P Env). Atenuacja wirusa wścieklizny polegała na wprowadzeniu mutacji w genomie RV, która w dużym stopniu ograniczała namnażanie się wirusa wyłącznie w komórkach neuronalnych. Wszystkie cztery zaszczepione małpy wykazywały silną odpowiedź komórkową skierowaną przeciw białkom Gag SIV i Env SHIV89.6P oraz wytwarzały przeciwciała neutralizujące SHIV89.6P. Ponadto trzy z nich charakteryzowały się wysokim odsetkiem limfocytów T CD4<sup>+</sup>, co skutkowało brakiem wykrywalnej wirerii w surowicy nawet w 12 tygodni po zakażeniu [74].

Inna strategia opracowywania szczepionek przeciwko HIV skupia się na potencjale szczepionek wykorzystujących DNA. Przy zastosowaniu plazmidu z wbudowanym genem kodującym glikoproteinę G z VSV możliwe jest wzmocnienie odpowiedzi limfocytów T CD8<sup>+</sup> swoistych wobec wybranego antygeny, podanego jednocześnie z tym plazmidem [69]. Plazmid DNA, po domięśniowym wstrzyknięciu jest pobierany przez miocyty oraz komórki im towarzyszące, w których dochodzi do ekspresji antygeny kodowanego przez ten plazmid i jego transportu do komórek prezentujących antygen (APC) pochodzących ze szpiku kostnego [18]. Tam antygen podlega obróbce i prezentacji z udziałem cząsteczek MHC klasy I lub II [13]. W celu zwiększenia udziału CTL swoistych dla HIV (Gag) w odpowiedzi komórkowej, Marsaci i wsp. szczepili myszy jednocześnie dwoma plazmidami: pierwszym - kodującym wszystkie białka HIV-1 poza Env (HIV-1 Gag); i drugim – kodującym VSV-G, co miało skutkować powstaniem *in vivo* HIV-1 z osłonką VSV (VSV-G-coated HIV-1 Gag) [70]. Glikoproteina VSV umożliwiała tak skonstruowanemu wirusowi wejście do komórki za pośrednictwem endocytozy zależnej od pH [2]. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia zaobserwowano, że immunizacja myszy zastosowanymi plazmidami prowadziła do zwiększonej odpowiedzi limfocytów T CD8<sup>+</sup> swoistych dla Gag. Podejrzewa się, że dzięki obecności białka G w osłonce wirusa HIV-1 zwiększył się wychwyt i przetwarzanie antygeny Gag przez APC biorące udział w immunologicznej odpowiedzi poszczepiennej. Poza tym dowiedziono, że wirus HIV-1 z osłonką VSV jest przetwarzany nie tylko z udziałem MHC klasy II ale też MHC klasy I. Pozytywne wyniki zastosowanej koinfekcji wydają się wynikać z działania dwóch mechanizmów: wzmocnienia odpowiedzi CTL z powodu fuzogennej aktywności glikoproteiny VSV oraz swoistych immunogennych właściwości VSV-G, polegających m.in. na aktywacji limfocytów T wytwarzających IFN- $\gamma$  [70].

Chimeryczne wirusy SIV ekspresjonujące glikoproteinę G zastosowano także do wzmocnienia odpowiedzi immunologicznej podczas szczepienia z użyciem cząstek

wirusowych typu „single-cycle” (sc), np. scSIV. Wirus w takiej postaci może przejść tylko jeden cykl infekcyjny, podczas którego niemożliwe jest odtworzenie replikacyjnie kompetentnego wirusa w wyniku rekombinacji *in vivo*, jednak odpowiedź immunologiczna jest słabsza niż w przypadku atenuowanego HIV czy SHIV. Przypuszcza się, że VSV-G warunkuje większą infekcyjność scSIV, która może również skutkować zakażeniem bezpośrednio APC i w efekcie intensywną prezentacją antygenów SIV. Aby zapobiec zmniejszeniu odpowiedzi na szczepienie wtórne w wyniku aktywności przeciwciał skierowanych przeciw VSV-G, kolejne sekwencje szczepionek zawierały różne serotypy VSV-G (zastosowana taktyka jest podobna jak w przypadku użycia heterologicznych szczepionek przez N. F. Rose i wsp. [92,93]). Makaki immunizowane tym systemem, a następnie zakażone szczepem SIV<sub>mac</sub>239, miały niższe miana wirusa w czasie chronicznej fazy infekcji, przez ponad rok od zakażenia, w porównaniu do małych nieszczepionych [55].

### Szczepionki przeciw filowirusom wywołującym gorączki krwotoczne

Wirusy Marburg (Marburg virus – MARV) i Ebola (Ebola virus – EBOV), należące do rodziny *Filoviridae*, są czynnikami etiologicznymi gorączek krwotocznych noszących nazwy tych wirusów. Rodzaj *Marburgvirus* zawiera tylko jeden gatunek Lake Victoria marburgvirus (MARV), podczas gdy rodzaj *Ebolavirus* reprezentowany jest przez czterech przedstawicieli: wirusa Ebola-Sudan (Sudan ebolavirus - SEBOV), Ebola-Zaire (Zaire ebolavirus - ZEBOV), Ebola-Ivory Coast (Cote d'Ivoire ebolavirus - CIEBOV) i Ebola-Reston (Reston ebolavirus - REBOV) [44,53,86]. Piąty, domniemany gatunek – wirus Ebola-Bundibugyo (Bundibugyo ebolavirus - BEBOV), związany jest z wybuchem epidemii w Ugandzie w 2007 r. [99]. Wymienione wyżej wirusy (z wyjątkiem REBOV) są chorobotwórcze dla ludzi i większość z nich wywołuje epidemie charakteryzujące się śmiertelnością 25-90% [28]. Ponadto do tej pory nie zarejestrowano oficjalnie żadnej szczepionki chroniącej przed infekcją MARV i EBOV, nie jest znane również żadne leczenie przyczynowe. Biorąc powyższe fakty pod uwagę, wymienione filowirusy potencjalnie mogą zostać wykorzystane jako broń biologiczna [8].

Genomy MARV i EBOV kodują siedem białek: nukleoproteinę (NP), białko wirionu (virion protein – VP) 24, VP30, glikoproteinę (GP), VP35, VP40 i polimerazę (L) [43,61]. Poza tym EBOV ekspresjonuje rozpuszczalną glikoproteinę (soluble GP – sGP), kodowaną przez gen GP [104]. Wyniki dostępnych badań wskazują, że GP, ze zmiennym udziałem NP, może stanowić klucz do opracowania immunogennej szczepionki [35].

Zespół badawczy T. W. Geisberta wykorzystał do badań nad szczepionkami przeciw filowirusom wektory bazujące na VSV (a skonstruowane przez zespół U. Ströhera [33]), w których glikoproteina rabdowirusa została zastąpiona GP z wirusa Ebola-Zaire (VSV $\Delta$ G/ZEBOVGP) lub glikoproteiną wirusa Marburg ze szczepu Musoke

(VSVΔG/MARVGP-Musoke) [21,41]. Wirusy takie, mimo braku proteiny G ulegają replikacji, ale nie są patogenne [97]. Potencjał ochronny szczepionki zawierającej VSVΔG/MARVGP-Musoke podanej domięśniowo oceniano u makaków jawańskich. Grupę kontrolną stanowiły dwa osobniki, którym podano tylko VSVΔG/ZEBOVGP. Po 28 dniach szczepione małpy zakażano wysokimi, letalnymi dawkami różnymi szczepów MARV: Musoke, Angola (który jest bardziej zjadliwym szczepem) oraz słabo spokrewnionym z nimi szczepem Ravn. Podobnie jak w przypadku wcześniejszych badań tej grupy, w których małpy zaszczepione VSVΔG/MARVGP-Musoke przeżyły zakażenie homologicznym szczepem MARV [59], w kolejnej serii eksperymentów wszystkie małpy szczepione VSVΔG/MARVGP-Musoke przeżyły też podanie heterologicznych szczepów Angola i Ravn bez widocznych zmian klinicznych. Natomiast u małp w grupie kontrolnej już w 8 dniu po zarażeniu wirusem rozwinęły się typowe objawy gorączki krwotocznej Marburg. W celu wyjaśnienia mechanizmu działania ochronnego zastosowanej szczepionki zbadano poziom przeciwciał IgG, ich właściwości neutralizujące oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych przez limfocyty T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup>. W surowicach wszystkich zwierząt potwierdzono wysokie miano przeciwciał anti-MarVlgG, zarówno przed zakażeniem, jak i po podaniu wirusa MARV oraz niski poziom przeciwciał neutralizujących. U żadnego ze zwierząt nie stwierdzono wytwarzania IFN-γ i TNF-α przez populacje limfocytów CD4<sup>+</sup> lub CD8<sup>+</sup>. Autorzy pracy sugerują, że ochronne działanie szczepionki może wynikać z wysokiego poziomu przeciwciał nieneutralizujących, jaki zauważono u szczepionych małp [21].

Badania nad działaniem ochronnym szczepionek zawierających VSVΔG/ZEBOVGP i VSVΔG/MARVGP-Musoke do 2008 r. wykorzystywały podanie wirusa w postaci iniekcji. Te same wektory szczepionkowe zostały też wykorzystane podczas eksperymentalnej infekcji wirusowej drogą kropelkową. Wiadomo, że w Związku Radzieckim eksperymentowano z MARV w aerozolu [3]. Dlatego też uważa się, że w przypadku wykorzystania filowirusów jako broni biologicznej, rozpylenie wirionów w powietrzu przez terrorystów jest bardzo prawdopodobne. Zwłaszcza, że filowirusy są silnie patogenne w tej postaci. W eksperymentach Geisberta i wsp. zarówno model badawczy, jak i wektory oraz miano podanego wirusa były takie same jak w przypadku badań Daddario-DiCaprio i wsp. z 2006 r., w których wirusa aplikowano w postaci iniekcji. Różnica polegała jedynie na sposobie podania wirusa oraz użycia tylko jednego, homologicznego szczepu MARV (Musoke). U zaszczepionych osobników nie stwierdzono żadnych objawów gorączki krwotocznej. Natomiast małpy z grupy kontrolnej rozwinęły pełnoobjawowy obraz choroby oraz wysoką wiremię. Zastosowane szczepionki wzbudziły umiarkowaną odpowiedź humoralną (przeciwciała IgG swoiste dla odpowiednio ZEBOV i MARV) po podaniu odpowiedniego filowirusa. Nie udało się natomiast wykryć udziału odpowiedzi komórkowej w wykazanym ochronnym działaniu szczepionki [36].

W 2009 r. zespół X. Qiu połączył różne podejścia w odniesieniu do szczepionek przeciw ZEBOV, porównując działanie ochronne wektora VSVΔG/ZEBOVGP w zależności od sposobu podania. Testowano zarówno iniekcję domięśniową, jak i podania doustne oraz donosowe. Zwierzęta kontrolne szczepiono VSVΔG/MARVGP, który nie działa ochronnie wobec infekcji ZEBOV. Po 28 dniach od podania szczepionki, makaki jawańskie zakażano patogennym wirusem. Zgodnie z przewidywaniami małpy z grupy kontrolnej zapadły na gorączkę krwotoczną i zostały poddane eutanazji w 6. dniu od zakażenia filowirusem. W odróżnieniu od nich makaki szczepione VSVΔG/ZEBOVGP przeżyły podanie wirusa Ebola, niewykazując zauważalnych zmian chorobowych. Wykonana przez autorów pracy analiza hematologiczna badanych małp nie wykazała żadnych nieprawidłowości, oprócz lekko podwyższonego trombokrytu w grupie małp, w której szczepionkę podano doustnie i donosowo. Przeprowadzono również dogłębną charakterystykę humoralnej odpowiedzi immunologicznej, indukowanej szczepionką. Między drugim a trzecim tygodniem od podania szczepionki, w surowicach wszystkich małp immunizowanych VSVΔG/ZEBOVGP występowały wysokie miano przeciwciał klasy IgA, IgM oraz IgG swoistych dla ZEBOVGP. Po iniekcji filowirusa miano przeciwciał IgM nie uległo podwyższeniu, natomiast wzrosły poziomy dwóch pozostałych klas przeciwciał. Najwyższy poziom przeciwciał IgA i IgG zaobserwowano w przypadku donosowego podania szczepionki. Natomiast w przypadku przeciwciał IgM najwyższe wartości dotyczyły zwierząt immunizowanych donosowo lub doustnie. Przeciwciała neutralizujące ZEBOV wykryto u każdej małpy immunizowanej VSVΔG/ZEBOVGP, lecz w grupie z domięśniowym podaniem szczepionki ich poziom był ledwie wykrywalny. Niezależnie od sposobu podania szczepionki dochodziło do indukcji silnej odpowiedzi interferonowej swoistej dla ZEBOV. Początkowo najwyższy poziom limfocytów wydzielających IFN-γ charakteryzował grupę z domięśniowym podaniem szczepionki, lecz w późniejszych etapach rozwoju odporności dominowały grupy, w których szczepionkę podano donosowo lub doustnie. Podobną zależność odnotowano w przypadku liczby limfocytów wydzielających IL-2. Podanie szczepionki donosowo wywołało u zwierząt najsilniejszą, w porównaniu do innych grup, odpowiedź komórkową. Charakteryzowała się ona zwiększonym odsetkiem zarówno limfocytów cytotoksycznych, jak i pomocniczych [85].

Badania grupy pod kierunkiem Geisberta, których wyniki opublikowano w 2006 r., miały na celu sprawdzenie terapeutycznego działania szczepionki VSVΔG/MARVGP-Musoke podanej po ekspozycji na wirusa. Szczepionkę podawano rezusom w 20-30 min po podaniu letalnej dawki homologicznego MARV. Wszystkie osobniki (pięć) szczepione VSVΔG/MARVGP-Musoke przeżyły 80 dni bez wykazania objawów klinicznych typowych dla gorączki krwotocznej Marburg. Zgodnie z założeniem, trzy kontrolne zwierzęta rozwinęły pełnoobjawową chorobę (po 12 dniach od iniekcji wirusa). Wyniki uzyskane przez zespół badawczy Geisberta dają nadzieję na opracowanie nie tylko skutecznej szczepionki zapobiegającej zakażeniu, lecz również użytecznego środka w leczeniu osobników uprzednio zakażonych MARV [22].



Terapeutyczne działanie szczepienia było słabsze, gdy okres między ekspozycją na patogennego wirusa, a podaniem szczepionki wydłużono do 24 i 48 godzin. W pierwszym przypadku zakażenie wirusem przeżyło pięć spośród sześciu badanych małp, natomiast w drugim już tylko 33% szczepionych zwierząt. Autorzy pracy podkreślają jednak, że w obliczu braku skutecznego leku na gorączkę krwotoczną wywołowaną przez MARV, uzyskane przez nich wyniki są godne uwagi [40].

Ten sam zespół badawczy ocenił działanie ochronne szczepionek opartych na wektorach VSV, podawanych po ekspozycji na SEBOV. Jest to drugi, zaraz po ZEBOV, najbardziej patogenny gatunek wirusa Ebola. Do szczepień zastosowano wektor na bazie VSV z genem kodującym glikoproteinę SEBOV zamiast GP rabdowirusa - VSVΔG/SEBOVGP (korzystając z plazmidów skonstruowanych przez M. Garbutta i wsp. [33]). Szczepionkę podawano rezusom w 20-30 min po domięśniowej iniekcji SEBOV homologicznego szczepu Boniface. W przeciwieństwie do wyników badań ze szczepionką VSVΔG/MARVGP-Musoke i zakażeniem wirusem MARV, zwierzęta szczepione VSVΔG/SEBOVGP przeżyły zakażenie SEBOV, niemniej jednak wykazywały objawy chorobowe: gorączkę, wysypkę, zmiany w hematologii i poziomie enzymów we krwi. Większość badanych wartości powróciła do normy u szczepionych małp w 14. dniu od infekcji SEBOV. W grupie małp szczepionych zaobserwowano wzrost poziomu przeciwciał klasy IgM i IgG po iniekcji patogennego wirusa. Natomiast u zwierzęcia kontrolnego nie zauważono zwiększonego miana przeciwciał, co korelowało z rozwojem pełnoobjawowej gorączki krwotocznej i zejściem śmiertelnym w 17. dniu od ekspozycji na filowirusa [38].

Terapeutycznym działaniem szczepionek przeciwko EBOV zajęli się Feldmann i wsp. wykorzystując system rekombinowanego VSV (VSVΔG/ZEBOVGP) opracowany wcześniej (w 2004 r. przez zespół pod kierownictwem U. Ströhera [33]) oraz wirusy EBOV: szczepy ZEBOV adaptowane do myszy (MA-ZEBOV) i świnki morskiej (GA-ZEBOV). Szczepienie zwierząt VSVΔG/ZEBOVGP odbywało się 24 godz. przed, 30 min lub 24 godz. po iniekcji ZEBOV. Wszystkie zaszczepione myszy, niezależnie od czasu podania szczepionki, przeżyły zakażenie MA-ZEBOV, w przeciwieństwie do grupy kontrolnej. Ochronne działanie szczepionki w przypadku świnek morskich nie było już tak spektakularne, ponieważ dotyczyło połowy zwierząt poddanych ekspozycji GA-ZEBOV. Podobne wyniki uzyskano u rezusów, połowa zaszczepionych małp przetrwała infekcję ZEBOV. Niezależnie od tego czy zwierzęta otrzymały szczepienie, u osobników, które przeżyły zaobserwowano dużo niższą, przejściową wiremę. Szczepione rezusy rozwinęły odpowiedź humoralną swoistą dla ZEBOV charakteryzującą się niskim mianem przeciwciał IgM oraz umiarkowanym mianem IgG wykrywalnych do 22 dnia od podania ZEBOV. U szczepionych rezusów zauważono również zwiększoną liczbę komórek NK, co w połączeniu ze wspomnianą odpowiedzią humoralną, prawdopodobnie wiąże się z bardziej efektywnym zabijaniem komórek zakażonych wirusem i dzięki temu prowadziło do eliminacji infekcji [29].

Bezpieczeństwo stosowania szczepionek opartych na replikującym się wirusie jest szczególnie istotne. Dlatego bardzo ważne jest określenie tolerancji wektorów wirusowych przez osoby z osłabionym układem odpornościowym, np. pacjentów zakażonych HIV, zwłaszcza że wszystkie dotychczasowe ogniska EBOV występowały na terenach Centralnej i Zachodniej Afryki z wysoką częstością zakażeń HIV w populacji. W badaniach oceny bezpieczeństwa stosowania szczepionek, przeprowadzonych pod kierownictwem T. W. Geisberta użyto rezusów zainfekowanych SHIV162p3. Wirus SHIV162p3 powoduje u małp drastyczny spadek liczby dziewiczych limfocytów T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> oraz limfocytów T CD4<sup>+</sup> pamięci [20]. Zwierzęta z klinicznymi objawami infekcji SHIV szczepiono VSVΔG/ZEBOVGP, a następnie po miesiącu zakażono ZEBOV. U żadnego z zaszczepionych zwierząt nie stwierdzono gorączki ani innych objawów klinicznych. Ponadto nie wystąpiły żadne zmiany w hematologii lub chemii klinicznej po szczepieniu. Obserwowano jedynie łagodną wiremę VSVΔG/ZEBOVGP 2 dni po zaszczepieniu. Szczepionka częściowo chroniła rezusy zakażone SHIV przed rozwojem gorączki krwotocznej. Cztery spośród sześciu szczepionych zwierząt przeżyło infekcję ZEBOV, lecz tylko u trzech z nich wykryto średni poziom przeciwciał IgG swoistych dla ZEBOV. Autorzy pracy podejrzewają, że większą rolę ochronną w organizmie w czasie infekcji ZEBOV spełniają limfocyty T CD4<sup>+</sup> niż, jak pierwotnie sądzono, przeciwciała swoiste dla tego wirusa, ponieważ dwa szczepione rezusy, które nie przeżyły infekcji, miały najniższy poziom limfocytów T CD4<sup>+</sup>. Wcześniej wykonane badania wykazały także, że z zakażeniem ZEBOV u naczelnych wiąże się spadek liczby komórek CD4<sup>+</sup> [37,88].

Idealna szczepionka przeciwwirusowa powinna być m.in. bezpieczna, chronić przed rozwojem infekcji, zapobiegać wystąpieniu objawów chorobowych, wzbudzać odpowiedź humoralną i komórkową, najlepiej już po podaniu pierwszej dawki. W przypadku szczepionek przeciwko filowirusom do wymienionych oczekiwań należy dodać jeszcze wykazywanie ochronnego działania jednocześnie wobec wirusa Marburg oraz wszystkich (chorobotwórczych u ludzi) gatunków wirusa Ebola. W celu spełnienia powyższych oczekiwań opracowano szczepionkę, która zawierała trzy wektory VSVΔG z glikoproteinami ZEBOV, SEBOV i MARV. Szczepione grupy makaków jawańskich następnie infekowano różnymi gatunkami wirusów Ebola (ZEBOV, SEBOV i CIEBOV) lub wirusem MARV. Wszystkie osobniki, którym podano multiwalentną szczepionkę przeżyły zakażenie filowirusem, niezależnie od tego, jakiego był gatunku. Mimo że serologiczna odpowiedź po podaniu szczepionki charakteryzowała się niskim lub średnim poziomem wytwarzanych przeciwciał IgG swoistych dla SEBOV, ZEBOV lub MARV, to zarówno obserwacje kliniczne, jak i ocena poziomu wiremii potwierdziły ochronne działanie zastosowanej szczepionki w 100% badanych przypadków. Jedynie dwie szczepione małpy z grupy zainfekowanej SEBOV miały przejściową gorączkę i limfopenię w szóstym dniu od zarażenia filowirusem [39].

## PODSUMOWANIE

Rekombinowany VSV jest niezwykle interesującym kandydatem do wykorzystania jako wektor szczepionkowy, nie tylko z powodu charakterystycznej konstrukcji jego genomu (jeden promotor i możliwość wbudowania różnego rodzaju insertów), ale również ze względu na jego immunogenność. VSV wyzwała w zainfekowanym organizmie zarówno komórkową, humoralną, jak i śluzówkową odpowiedź immunologiczną, nawet po podaniu pojedynczej dawki [27]. Jednak mechanizm, dzięki któremu VSV jest w stanie wywołać tak silną odpowiedź w dużej mierze jest nieznaną [15]. Wektory VSV są wszechstronnie badane jako potencjalne szczepionki chroniące nie tylko przed pęcherzykowatym zapaleniem jamy ustnej zwierząt hodowlanych, ale również w prewencji zakażenia wieloma groźnymi, ludzkimi patogenami, np. wirusem Andów (hantawirus) [12], wirusem Nipah (paramyksowirus) [14], norowirusami [67] czy cytomegalowirusem [89]. Dużą nadzieję wiąże się z wykorzystaniem wektorów VSV w przypadku patogenów wirusowych zbierających największe żniwo w obecnym czasie, tzn. filowirusów [35], HPV [10], wirusów zapalenia wątroby typu B i C [16,68] oraz wirusa grypy, groźnego głównie z powodu wywoływanych powikłań [96].

Jedną z głównych przeszkód przy konstruowaniu wektorów szczepionkowych na bazie VSV jest odporność skierowana przeciw samemu wirusowi. Dlatego też tak ważnym jest fakt, że tylko niewielki procent ludzi jest seropozytywnych względem VSV. Potwierdzają to badania przeprowadzone przez E. Paradowską na krwi matek pobranej bezpośrednio po porodzie [79], a następnie przez K. Zwolińską i wsp. (Laboratorium Wirusologii, Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN im. L. Hirszfelda we Wrocławiu) na próbkach krwi pobranych od około 120 zdrowych wolontariuszy. W żadnej z nich nie wykryto przeciwciał neutralizujących VSV (dane niepublikowane). Ponadto wiele wirusów konstruowanych na bazie VSV ma substytucję glikoproteiny powierzchniowej, przeciw której, podczas infekcji wytwarzane są przeciwciała neutralizujące. Dzięki temu seropozytywność potencjalnego pacjenta względem VSV przestaje mieć znaczenie [21]. Z kolei problem wytwarzania przeciwciał skierowanych przeciw glikoproteinie VSV *in vivo* w przypadku podawania szczepionek wtórnych

można rozwiązać z użyciem wektorów mających heterologiczną glikoproteinę (pochodzącą z różnych szczepów VSV lub przedstawicieli rodzaju *Vesiculovirus*) [93].

Ważną cechą skutecznej szczepionki powinna być trwałość indukowanej odporności. Jest to szczególnie istotne w przypadku immunizacji przeciwko patogenom w rejonach tropikalnych, gdzie realizacja szczepień wtórnych może być utrudniona. Udowodniono, że szczepionki zawierające atenuowane wektory wirusowe wykazują działanie ochronne przeciw żółtej gorączce przez ponad 30 lat [82]. Nie wiadomo czy podobny efekt uda się uzyskać przy zastosowaniu bezpieczniejszych wektorów (replikacyjnie defektywnych) na bazie VSV. Jak do tej pory otrzymano obiecujące wyniki – przy zastosowaniu wektora VSV typu „single-cycle”, podczas szczepienia uzyskano odpowiedź immunologiczną porównywalną do szczepionki z wirusem atenuowanym [83].

Pomimo wszystkich wymienionych zalet, rekombinowany VSV nie jest wektorem idealnym. Liczne badania dowodzą, że rVSV podany myszom donosowo wykazuje neurotropizm i neuropatogenność [90]. Rozwiązanie tego problemu wydaje się coraz bliższe, jak dowodzą badania Ahmeda i wsp. Zamiana jednego aminokwasu w białku M VSV prowadziła do zahamowania jego zdolności do inibicji ekspresji genów gospodarza. Skutkowało to brakiem neuropatogenności, ale nie wpływało na wzbudzenie odpowiedzi immunologicznej [1]. Johnson i wsp. wykazali, że donosowe podanie dzikiego szczepu VSV nie powodowało u rebusów zmian w ośrodkowym układzie nerwowym. Natomiast podanie tego wirusa bezpośrednio do mózgu wywoływało wiele objawów neurologicznych [56]. Sytuacja może się przedstawiać jednak całkiem inaczej w przypadku zastosowania wirusów VSV z podmienioną glikoproteina na powierzchni osłonki. Badania z 2012 r. dowiodły, że podanie szczepionek zawierających rVSV-ZEBOV-GP oraz rVSV-MARV-GP nie prowadziło do neuropatogenności u makaków jawańskich, nawet po bezpośrednim podaniu do mózgu [75]. Wyniki te potwierdzają, że istnieje realna szansa na poddanie badaniom klinicznym opracowywanych szczepionek zawierających rekombinowany VSV, podobnie jak w przypadku szczepionki przeciw HCV – składniki szczepionki (antygeny E1 i E2) wyprodukowano wykorzystując wektory skonstruowane na bazie VSV [32].

## PIŚMIENICTWO

- [1] Ahmed M., Marino T.R., Puckett S., Kock N.D., Lyles D.S.: Immune response in the absence of neurovirulence in mice infected with M protein mutant vesicular stomatitis virus. *J. Virol.*, 2008; 82: 9273-9277
- [2] Aiken C.: Pseudotyping human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by the glycoprotein of vesicular stomatitis virus targets HIV-1 entry to an endocytic pathway and suppresses both the requirement for Nef and the sensitivity to cyclosporin A. *J. Virol.*, 1997; 71: 5871-5877
- [3] Alibek K., Handelman S.: Biohazard: the chilling true story of the largest covert biological weapons program in the world, told from the inside by the man who ran it. Random House, New York 1999
- [4] Ball L.A., White C.N.: Order of transcription of genes of vesicular stomatitis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1976; 73: 442-446
- [5] Bartenschlager R., Cosset F.L., Lohmann V.: Hepatitis C virus replication cycle. *J. Hepatol.*, 2010; 53: 583-585
- [6] Baryluk A., Polz-Dacewicz M., Sendecka M., Piecyk-Sidor M.: Współczesne osiągnięcia dotyczące badań nad opracowaniem szczepionki przeciwko WZW C. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2005; 59: 98-104
- [7] Boone J.D., Erickson B.K., Huh W.K.: New insights into cervical cancer screening. *J. Gynecol. Oncol.*, 2012; 23: 282-287
- [8] Borio L., Inglesby T., Peters C.J., Schmaljohn A.L., Hughes J.M., Jahrling P.B., Ksiazek T., Johnson K.M., Meyerhoff A., O'Toole T.,

- Ascher M.S., Bartlett J., Breman J.G., Eitzen E.M. Jr, Hamburg M. i wsp.: Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *J. Am. Med. Assoc.*, 2002; 287: 2391-2405
- [9] Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurlen W., zur Hausen H.: A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J.*, 1984; 3: 1151-1157
- [10] Brandsma J.L., Shylankevich M., Su Y., Roberts A., Rose J.K., Zelterman D., Buonocore L.: Vesicular stomatitis virus-based therapeutic vaccination targeted to the E1, E2, E6, and E7 proteins of cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.*, 2007; 81: 5749-5758
- [11] Brandsma J.L., Shylankevich M., Su Y., Zelterman D., Rose J.K., Buonocore L.: Reversal of papilloma growth in rabbits therapeutically vaccinated against E6 with naked DNA and/or vesicular stomatitis virus vectors. *Vaccine*, 2010; 28: 8345-8351
- [12] Brown K.S., Safronetz D., Marzi A., Ebihara H., Feldmann H.: Vesicular stomatitis virus-based vaccine protects hamsters against lethal challenge with Andes virus. *J. Virol.*, 2011; 85: 12781-12791
- [13] Casares S., Inaba K., Brumeanu T.D., Steinman R.M., Bona C.A.: Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.*, 1997; 186: 1481-1486
- [14] Chattopadhyay A., Rose J.K.: Complementing defective viruses that express separate paramyxovirus glycoproteins provide a new vaccine vector approach. *J. Virol.*, 2010; 85: 2004-2011
- [15] Cobleigh M.A., Bradfield C., Liu Y., Mehta A., Robek M.D.: The immune response to a vesicular stomatitis virus vaccine vector is independent of particulate antigen secretion and protein turnover rate. *J. Virol.*, 2012; 86: 4253-4261
- [16] Cobleigh M.A., Buonocore L., Uprichard S.L., Rose J.K., Robek M.D.: A vesicular stomatitis virus-based hepatitis B virus vaccine vector provides protection against challenge in a single dose. *J. Virol.*, 2010; 84: 7513-7522
- [17] Cooper D., Wright K.J., Calderon P.C., Guo M., Nasar F., Johnson J.E., Coleman J.W., Lee M., Kotash C., Yurgelonis I., Natuk R.J., Hendry R.M., Udem S.A., Clarke D.K.: Attenuation of recombinant vesicular stomatitis virus-human immunodeficiency virus type 1 vaccine vectors by gene translocations and G gene truncation reduces neurovirulence and enhances immunogenicity in mice. *J. Virol.*, 2008; 82: 207-219
- [18] Corr M., von Damm A., Lee D.J., Tighe H.: In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J. Immunol.*, 1999; 163: 4721-4727
- [19] Cougot D., Neuveut C., Buendia M.A.: HBV induced carcinogenesis. *J. Clin. Virol.*, 2005; 34: S75-S78
- [20] Cristillo A.D., Lisziewicz J., He L., Lori F., Galmin L., Trocio J.N., Unangst T., Whitman L., Hudacik L., Bakare N., Whitney S., Restrepo S., Suschak J., Ferrari M.G., Chung H.K., Kalyanaraman V.S., Markham P., Pal R.: HIV-1 prophylactic vaccine comprised of topical DermaVir prime and protein boost elicits cellular immune responses and controls pathogenic R5 SHIV162P3. *Virology*, 2007; 366: 197-211
- [21] Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Ströher U., Hensley L.E., Grolla A., Fritz E.A., Feldmann F., Feldmann H., Jones S.M.: Cross-protection against Marburg virus strains by using a live, attenuated recombinant vaccine. *J. Virol.*, 2006; 80: 9659-9666
- [22] Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert T.W., Ströher U., Geisbert J.B., Grolla A., Fritz E.A., Fernando L., Kagan E., Jahrling P.B., Hensley L.E., Jones S.M., Feldmann H.: Postexposure protection against Marburg haemorrhagic fever with recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates: an efficacy assessment. *Lancet*, 2006; 367: 1399-1404
- [23] Dinh P.X., Beura L.K., Panda D., Das A., Pattnaik A.K.: Antagonistic effects of cellular poly(C) binding proteins on vesicular stomatitis virus gene expression. *J. Virol.*, 2011; 85: 9459-9471
- [24] Dorrucchi M.: Epidemiology of HIV. *Update. Recenti Prog. Med.*, 2010; 101: 12-15
- [25] Dürst M., Glitz D., Schneider A., zur Hausen H.: Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*, 1992; 189: 132-140
- [26] Earl P.L., Wyatt L.S., Montefiori D.C., Biliska M., Woodward R., Markham P.D., Malley J.D., Vogel T.U., Allen T.M., Watkins D.I., Miller N., Moss B.: Comparison of vaccine strategies using recombinant env-gag-pol MVA with or without an oligomeric Env protein boost in the SHIV rhesus macaque model. *Virology*, 2002; 294: 270-281
- [27] Fang X., Zhang S., Sun X., Li J., Sun T.: Evaluation of attenuated VSVs with mutated M or/and G proteins as vaccine vectors. *Vaccine*, 2012; 30: 1313-1321
- [28] Feldmann H., Geisbert T.W.: Ebola haemorrhagic fever. *Lancet*, 2011; 377: 849-862
- [29] Feldmann H., Jones S.M., Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert J.B., Ströher U., Grolla A., Bray M., Fritz E.A., Fernando L., Feldmann F., Hensley L.E., Geisbert T.W.: Effective post-exposure treatment of Ebola infection. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e2
- [30] Flanagan E.B., Ball L.A., Wertz G.W.: Moving the glycoprotein gene of vesicular stomatitis virus to promoter-proximal positions accelerates and enhances the protective immune response. *J. Virol.*, 2000; 74: 7895-7902
- [31] Flanagan E.B., Zamparo J.M., Ball L.A., Rodriguez L.L., Wertz G.W.: Rearrangement of the genes of vesicular stomatitis virus eliminates clinical disease in the natural host: new strategy for vaccine development. *J. Virol.*, 2001; 75: 6107-6114
- [32] Frey S.E., Houghton M., Coates S., Abrignani S., Chien D., Rosa D., Pileri P., Ray R., Di Bisceglie A.M., Rinella P., Hill H., Wolff M.C., Schultze V., Han J.H., Schar Schmidt B., Belshe R.B.: Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine*, 2010; 28: 6367-6373
- [33] Garbutt M., Liebscher R., Wahl-Jensen V., Jones S., Möller P., Wagner R., Volchkov V., Klenk H.D., Feldmann H., Ströher U.: Properties of replication-competent vesicular stomatitis virus vectors expressing glycoproteins of filoviruses and arenaviruses. *J. Virol.*, 2004; 78: 5458-5465
- [34] Ge P., Tsao J., Schein S., Green T.J., Luo M., Zhou Z.H.: CryoEM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science*, 2010; 327: 689-693
- [35] Geisbert T.W., Bausch D.G., Feldmann H.: Prospects for immunisation against Marburg and Ebola viruses. *Rev. Med. Virol.*, 2010; 20: 344-357
- [36] Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Geisbert J.B., Reed D.S., Feldmann F., Grolla A., Ströher U., Fritz E.A., Hensley L.E., Jones S.M., Feldmann H.: Vesicular stomatitis virus-based vaccines protect non-human primates against aerosol challenge with Ebola and Marburg viruses. *Vaccine*, 2008; 26: 6894-6900
- [37] Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Lewis M.G., Geisbert J.B., Grolla A., Leung A., Paragas J., Matthias L., Smith M.A., Jones S.M., Hensley L.E., Feldmann H., Jahrling P.B.: Vesicular stomatitis virus-based Ebola vaccine is well-tolerated and protects immunocompromised nonhuman primates. *PLoS Pathog.*, 2008; 4: e1000225
- [38] Geisbert T.W., Daddario-DiCaprio K.M., Williams K.J., Geisbert J.B., Leung A., Feldmann F., Hensley L.E., Feldmann H., Jones S.M.: Recombinant vesicular stomatitis virus vector mediates postexposure protection against Sudan Ebola hemorrhagic fever in nonhuman primates. *J. Virol.*, 2008; 82: 5664-5668

- [39] Geisbert T.W., Geisbert J.B., Leung A., Daddario-DiCaprio K.M., Hensley L.E., Grolla A., Feldmann H.: Single-injection vaccine protects nonhuman primates against infection with Marburg virus and three species of Ebola virus. *J. Virol.*, 2009; 83: 7296-7304
- [40] Geisbert T.W., Hensley L.E., Geisbert J.B., Leung A., Johnson J.C., Grolla A., Feldmann H.: Postexposure treatment of Marburg virus infection. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010; 16: 1119-1122
- [41] Geisbert T.W., Jones S., Fritz E.A., Shurtleff A.C., Geisbert J.B., Liebscher R., Grolla A., Ströher U., Fernando L., Daddario K.M., Gutierrez M.C., Mothé B.R., Larsen T., Hensley L.E., Jahrling P.B. i wsp.: Development of a new vaccine for the prevention of Lassa fever. *PLoS Med.*, 2005; 2: e183
- [42] Gravel K.A., McGinnes L.W., Reitter J., Morrison T.G.: The transmembrane domain sequence affects the structure and function of the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Virol.*, 2011; 85: 3486-3497
- [43] Groseth A., Charton J.E., Sauerborn M., Feldmann F., Jones S.M., Hoenen T., Feldmann H.: The Ebola virus ribonucleoprotein complex: a novel VP30-L interaction identified. *Virus Res.*, 2009; 140: 8-14
- [44] Groseth A., Ströher U., Theriault S., Feldmann H.: Molecular characterization of an isolate from the 1989/90 epizootic of Ebola virus Reston among macaques imported into the United States. *Virus Res.*, 2002; 87: 155-163
- [45] Haglund K., Leiner I., Kerksiek K., Buonocore L., Pamer E., Rose J.K.: Robust recall and long-term memory T-cell responses induced by prime-boost regimens with heterologous live viral vectors expressing human immunodeficiency virus type 1 Gag and Env proteins. *J. Virol.*, 2002; 76: 7506-7517
- [46] Hawkins M.G., Winder D.M., Ball S.L., Vaughan K., Sonnex C., Stanley M.A., Sterling J.C., Goon P.K.: Detection of specific HPV subtypes responsible for the pathogenesis of condylomata acuminata. *J. Virol.*, 2013; 10: 137
- [47] Hepatitis C. World Health Organization. [http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/\(23.10.2013\)](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/(23.10.2013))
- [48] Hunziker I.P., 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
- [49] Imhof I., Simmonds P.: Genotype differences in susceptibility and resistance development of hepatitis C virus to protease inhibitors telaprevir (VX-950) and danoprevir (ITMN-191). *Hepatology*, 2011; 53: 1090-1099
- [50] Inchauspé G., Major M.E., Nakano I., Vitvitski L., Trépo C.: DNA vaccination for the induction of immune responses against hepatitis C virus proteins. *Vaccine*, 1997; 15: 853-856
- [51] Iverson L.E., Rose J.K.: Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell*, 1981; 23: 477-484
- [52] Jäger S., Gulbahce N., Cimermancic P., Kane J., He N., Chou S., D'Orso I., Fernandes J., Jang G., Frankel A.D., Alber T., Zhou Q., Krogan N.J.: Purification and characterization of HIV-human protein complexes. *Methods*, 2011; 53: 13-19
- [53] Jahrling P.B., Geisbert T.W., Dalgard D.W., Johnson E.D., Ksiazek T.G., Hall W.C., Peters C.J.: Preliminary report: isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *Lancet*, 1990; 335: 502-505
- [54] Jatczak B., Leszek J., Siemieniec I., Sochocka M., Wiśniewska A., Tarkowski R., Bębenek M., Błach-Olszewska Z.: Age- and disease-related innate immunity of human leukocytes *ex vivo*. *Exp. Gerontol.*, 2012; 47: 8-13
- [55] Jia B., Ng S.K., DeGottardi M.Q., Piatak M., Yuste E., Carville A., Mansfield K.G., Li W., Richardson B.A., Lifson J.D., Evans D.T.: Immunization with single-cycle SIV significantly reduces viral loads after an intravenous challenge with SIVmac239. *PLoS Pathog.*, 2009; 5: e1000272
- [56] Johnson J.E., Nasar F., Coleman J.W., Price R.E., Javadian A., Draper K., Lee M., Reilly P.A., Clarke D.K., Hendry R.M., Udem S.A.: Neurovirulence properties of recombinant vesicular stomatitis virus vectors in non-human primates. *Virology*, 2007; 360: 36-49
- [57] Johnson J.E., Rodgers W., Rose J.K.: A plasma membrane localization signal in the HIV-1 envelope cytoplasmic domain prevents localization at sites of vesicular stomatitis virus budding and incorporation into VSV virions. *Virology*, 1998; 251: 244-252
- [58] Johnson J.E., Schnell M.J., Buonocore L., Rose J.K.: Specific targeting to CD4+ cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J. Virol.*, 1997; 71: 5060-5068
- [59] Jones S.M., Feldmann H., Ströher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A., Klenk H.D., Sullivan N.J., Volchkov V.E., Fritz E.A., Daddario K.M., Hensley L.E., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Live attenuated recombinant vaccine protects nonhuman primates against Ebola and Marburg viruses. *Nat. Med.*, 2005; 11: 786-790
- [60] Kuhn L., Aldrovandi G.M., Sinkala M., Kankasa C., Semrau K., Mwiya M., Kasonde P., Scott N., Vwalika C., Walter J., Bulterys M., Tsai W.Y., Thea D.M.: Effects of early, abrupt weaning on HIV-free survival of children in Zambia. *N. Engl. J. Med.*, 2008; 359: 130-141
- [61] Leroy E.M., Baize S., Mavoungou E., Apetrei C.: Sequence analysis of the GP, NP, VP40 and VP24 genes of Ebola virus isolated from deceased, surviving and asymptotically infected individuals during the 1996 outbreak in Gabon: comparative studies and phylogenetic characterization. *J. Gen. Virol.*, 2002; 83: 67-73
- [62] Letchworth G.J., Rodriguez L.L., Del Cbarrera J.: Vesicular Stomatitis. *Vet. J.*, 1999; 157: 239-260
- [63] Letvin N.L.: Progress in the development of an HIV-1 vaccine. *Science*, 1998; 280: 1875-1880
- [64] Liao J.B., Publicover J., Rose J.K., DiMaio D.: Single-dose, therapeutic vaccination of mice with vesicular stomatitis virus expressing human papillomavirus type 16 E7 protein. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2008; 15: 817-824
- [65] Lin Y.L., Borenstein L.A., Ahmed R., Wettstein F.O.: Cottontail rabbit papillomavirus L1 protein-based vaccines: protection is achieved only with a full-length, nondenatured product. *J. Virol.*, 1993; 67: 4154-4162
- [66] Lupberger J., Hildt E.: Hepatitis B virus-induced oncogenesis. *World J. Gastroenterol.*, 2007; 13: 74-81
- [67] Ma Y., Li J.: Vesicular stomatitis virus as a vector to deliver virus-like particles of human norovirus: a new vaccine candidate against an important noncultivable virus. *J. Virol.*, 2011; 85: 2942-2952
- [68] Majid A.M., Ezelle H., Shah S., Barber G.N.: Evaluating replication-defective vesicular stomatitis virus as a vaccine vehicle. *J. Virol.*, 2006; 80: 6993-7008
- [69] Mao C.P., Hung C.F., Kang T.H., He L., Tsai Y.C., Wu C.Y., Wu T.C.: Combined administration with DNA encoding vesicular stomatitis virus G protein enhances DNA vaccine potency. *J. Virol.*, 2010; 84: 2331-2339
- [70] Marsac D., Loirat D., Petit C., Schwartz O., Michel M.L.: Enhanced presentation of major histocompatibility complex class I-restricted human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Gag-specific epitopes after DNA immunization with vectors coding for vesicular stomatitis virus glycoprotein-pseudotyped HIV-1 Gag particles. *J. Virol.*, 2002; 76: 7544-7553
- [71] Marthas M.L., Van Rompay K.K., Abbott Z., Earl P., Buonocore-Buzzelli L., Moss B., Rose N.F., Rose J.K., Kozlowski P.A., Abel K.: Partial efficacy of a VSV-SIV/MVA-SIV vaccine regimen against oral SIV challenge in infant macaques. *Vaccine*, 2011; 29: 3124-3137
- [72] Mast E.E., Weinbaum C.M., Fiore A.E., Alter M.J., Bell B.P., Finelli L., Rodewald L.E., Douglas J.M. Jr, Janssen R.S., Ward J.W.: A comprehensive immunization strategy to eliminate transmission of

hepatitis B virus infection in the United States: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) Part II: immunization of adults. *MMWR Recomm. Rep.*, 2006; 55: 1-33

[73] McEnery R.: Update on pandemic shows new HIV infections steadily declining. *IAVI Rep.*, 2009; 13: 17

[74] McKenna P.M., Koser M.L., Carlson K.R., Montefiori D.C., Letvin N.L., Papaneri A.B., Pomerantz R.J., Dietzschold B., Silvera P., McGettigan J.P., Schnell M.J.: Highly attenuated rabies virus—based vaccine vectors expressing simian-human immunodeficiency virus89.6P Env and simian immunodeficiency virusmac239 Gag are safe in rhesus macaques and protect from an AIDS-like disease. *J. Infect. Dis.*, 2007; 195: 980-988

[75] Mire C.E., Miller A.D., Carville A., Westmoreland S.V., Geisbert J.B., Mansfield K.G., Feldmann H., Hensley L.E., Geisbert T.W.: Recombinant vesicular stomatitis virus vaccine vectors expressing filovirus glycoproteins lack neurovirulence in nonhuman primates. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2012; 6: e1567

[76] Morisco F., Granata R., Stroffolini T., Guarino M., Donnarumma L., Gaeta L., Loperto L., Gentile I., Auriemma F., Caporaso N.: Sustained virological response: a milestone in the treatment of chronic hepatitis C. *World J. Gastroenterol.*, 2013; 19: 2793-2798

[77] Orzechowska B., Antoszków Z., Siemieniec I., Lorenc M., Jatczak B., Blach-Olszewska Z.: Cytokine production by human leukocytes with different expressions of natural antiviral immunity and the effect of antibodies against interferons and TNF- $\alpha$ . *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2007; 55: 111-117

[78] Panda D., Das A., Dinh P.X., Subramaniam S., Nayak D., Barrows N.J., Pearson J.L., Thompson J., Kelly D.L., Ladunga I., Pattnaik A.K.: RNAi screening reveals requirement for host cell secretory pathway in infection by diverse families of negative-strand RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108: 19036-19041

[79] Paradowska E., Blach-Olszewska Z., Sender J., Jarosz W.: Antiviral nonspecific immunity of human placenta at term: possible role of endogenous tumor necrosis factors and interferons. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1996; 16: 941-948

[80] Pineiro D., Martinez-Salas E.: RNA structural elements of hepatitis C virus controlling viral RNA translation and the implications for viral pathogenesis. *Viruses*, 2012; 4: 2233-2250

[81] Ploss A., Dubuisson J.: New advances in the molecular biology of hepatitis C virus infection: towards the identification of new treatment targets. *Gut*, 2012; 61, Suppl. 1: i25-i35

[82] Poland J.D., Calisher C.H., Monath T.P., Downs W.G., Murphy K.: Persistence of neutralizing antibody 30-35 years after immunization with 17D yellow fever vaccine. *Bull. World Health Organ.*, 1981; 59: 895-900

[83] Publicover J., Ramsburg E., Rose J.K.: A single-cycle vaccine vector based on vesicular stomatitis virus can induce immune responses comparable to those generated by a replication-competent vector. *J. Virol.*, 2005; 79: 13231-13238

[84] Puig M., Major M.E., Mihalik K., Feinstone S.M.: Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine*, 2004; 22: 991-1000

[85] Qiu X., Fernando L., Alimonti J.B., Melito P.L., Feldmann F., Dick D., Ströher U., Feldmann H., Jones S.M.: Mucosal immunization of cynomolgus macaques with the VSV $\Delta$ G/ZEBOVGP vaccine stimulates strong Ebola GP-specific immune responses. *PLoS One*, 2009; 4: e5547

[86] Ramanan P., Shabman R.S., Brown C.S., Amarasinghe G.K., Basler C.F., Leung D.W.: Filoviral immune evasion mechanisms. *Viruses*, 2011; 3: 1634-1649

[87] Ramsburg E., Rose N.F., Marx P.A., Mefford M., Nixon D.F., Moretto W.J., Montefiori D., Earl P., Moss B., Rose J.K.: Highly effective control of an AIDS virus challenge in macaques by using vesicular

stomatitis virus and modified vaccinia virus Ankara vaccine vectors in a single-boost protocol. *J. Virol.*, 2004; 78: 3930-3940

[88] Reed D.S., Hensley L.E., Geisbert J.B., Jahrling P.B., Geisbert T.W.: Depletion of peripheral blood T lymphocytes and NK cells during the course of ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques. *Viral Immunol.*, 2004; 17: 390-400

[89] Reuter J.D., Vivas-Gonzalez B.E., Gomez D., Wilson J.H., Brandsma J.L., Greenstone H.L., Rose J.K., Roberts A.: Intranasal vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing cotton-tail rabbit papillomavirus L1 protein provides complete protection against papillomavirus-induced disease. *J. Virol.*, 2002; 76: 8900-8909

[90] Roberts A., Kretzschmar E., Perkins A.S., Forman J., Price R., Buonocore L., Kawaoka Y., Rose J.K.: Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J. Virol.*, 1998; 72: 4704-4711

[91] Roberts A., Reuter J.D., Wilson J.H., Baldwin S., Rose J.K.: Complete protection from papillomavirus challenge after a single vaccination with a vesicular stomatitis virus vector expressing high levels of L1 protein. *J. Virol.*, 2004; 78: 3196-3199

[92] Rose N.F., Marx P.A., Luckay A., Nixon D.F., Moretto W.J., Donahoe S.M., Montefiori D., Roberts A., Buonocore L., Rose J.K.: An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell*, 2001; 106: 539-549

[93] Rose N.F., Roberts A., Buonocore L., Rose J.K.: Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 2000; 74: 10903-10910

[94] Sanjuán R., Bordería A.V.: Interplay between RNA structure and protein evolution in HIV-1. *Mol. Biol. Evol.*, 2011; 28: 1333-1338

[95] Schell J.B., Rose N.F., Bahl K., Diller K., Buonocore L., Hunter M., Marx P.A., Gambhira R., Tang H., Montefiori D.C., Johnson W.E., Rose J.K.: Significant protection against high-dose simian immunodeficiency virus challenge conferred by a new prime-boost vaccine regimen. *J. Virol.*, 2011; 85: 5764-5772

[96] Schwartz J.A., Buonocore L., Suguitan A.Jr, Hunter M., Marx P.A., Subbarao K., Rose J.K.: Vesicular stomatitis virus-based H5N1 avian influenza vaccines induce potent cross-clade neutralizing antibodies in rhesus macaques. *J. Virol.*, 2011; 85: 4602-4605

[97] Takada A., Robison C., Goto H., Sanchez A., Murti K.G., Whitt M.A., Kawaoka Y.: A system for functional analysis of Ebola virus glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997; 94: 14764-14769

[98] Torresi J., Johnson D., Wedemeyer H.: Progress in the development of preventive and therapeutic vaccines for hepatitis C virus. *J. Hepatol.*, 2011; 54: 1273-1285

[99] Towner J.S., Sealy T.K., Khristova M.L., Albariño C.G., Conlan S., Reeder S.A., Quan P.L., Lipkin W.I., Downing R., Tappero J.W., Okwara S., Lutwama J., Bakamutumaho B., Kayiwa J., Comer J.A.: Newly discovered Ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda. *PLoS Pathog.* 2008; 4: e1000212

[100] UNAIDS. <http://www.unaids.org/en/dataanalysis/datatools/aidsinfo/> (27.10.2013)

[101] Van Bogaert L.J.: Are the currently existing anti-human papillomavirus vaccines appropriate for the developing world? *Ann. Med. Health Sci. Res.*, 2013; 3: 306-312

[102] Van Rompay K.K., Abel K., Earl P., Kozlowski P.A., Easlick J., Moore J., Buonocore-Buzzelli L., Schmidt K.A., Wilson R.L., Simon I., Moss B., Rose N., Rose J., Marthas M.L.: Immunogenicity of viral vector, prime-boost SIV vaccine regimens in infant rhesus macaques: attenuated vesicular stomatitis virus (VSV) and modified vaccinia Ankara (MVA) recombinant SIV vaccines compared to live-attenuated SIV. *Vaccine*, 2010; 28: 1481-1492

- [103] Van Rompay K.K., Abel K., Lawson J.R., Singh R.P., Schmidt K.A., Evans T., Earl P., Harvey D., Franchini G., Tartaglia J., Montefiori D., Hattangadi S., Moss B., Marthas M.L.: Attenuated poxvirus-based simian immunodeficiency virus (SIV) vaccines given in infancy partially protect infant and juvenile macaques against repeated oral challenge with virulent SIV. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 2005; 38: 124-134
- [104] Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D.: GP mRNA of Ebola virus is edited by the Ebola virus polymerase and by T7 and vaccinia virus polymerases. *Virology*, 1995; 214: 421-430
- [105] Wertz G.W., Perepelitsa V.P., Ball L.A.: Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998; 95: 3501-3506
- [106] Whelan S.P., Ball L.A., Barr J.N., Wertz G.T.: Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995; 92: 8388-8392
- [107] Witko S.E., Johnson J.E., Kalyan N.K., Felber B.K., Pavlakis G.N., Sidhu M.K., Hendry R.M., Udem S.A., Parks C.L.: Refined methods for propagating vesicular stomatitis virus vectors that are defective for G protein expression. *J. Virol. Methods*, 2010; 164: 43-50
- [108] World Health Organization. Hepatitis B vaccines. *Wkly Epidemiol. Rec.*, 2009; 84: 405-419
- [109] Zaczyńska E., Magott-Procelewska M., Rybka K., Siemieniec I., Błach-Olszewska Z., Klinger M.: Innate antiviral immunity is not impaired in patients with chronic renal failure on hemodialysis. *Nephron. Clin. Pract.*, 2005; 101: c207-c210
- [110] Zuckerman J.N.: Protective efficacy, immunotherapeutic potential, and safety of hepatitis B vaccines. *J. Med. Virol.*, 2006; 78: 169-177
- 

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.