

**Andrea Lipińska<sup>1\*</sup>, Krystyna Bieńkowska-Szewczyk<sup>1</sup>**

Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii  
Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

1. Wstęp. 2. Szczepionki przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca. 3. Badania nad szczepionkami przeciw wirusom HSV, ludzkiemu cytomegalowirusowi i wirusowi Epsteina-Barr. 4. Wektory herpeswirusowe w terapii człowieka. 5. Podsumowanie

### **Novel antiherpesviral vaccines and herpesviral vectors for human therapy**

**Abstract:** Herpesviruses constitute one of the largest viral families, which encompasses viral infectious agents widely occurring in the human population. The use of antiviral therapeutics usually does not prevent herpesvirus recurrences and has not lead to the virus eradication. This may be achieved with antiviral vaccines. Despite a long track of vaccine clinical trials and numerous strategies of research, commercial vaccines are available only for one herpesvirus – varicella-zoster virus (VZV). In addition to the varicella vaccine, a therapeutic vaccine to prevent herpes zoster in elderly people has been recently introduced. This paper reviews the most recent developments in human herpesvirus vaccines, both prophylactic and therapeutic. The most promising clinical trials, which may lead to successful vaccines in the near future, are described. The most important challenges for the vaccine research are also discussed. The therapeutic use of herpesviruses includes recombinant HSV vectors for gene delivery or as anti-cancer agents. HSV therapeutic vectors are classified into: amplicon vectors, replication-defective vectors and replication-attenuated oncolytic viruses. This paper gives an insight into the current knowledge on the construction of HSV vectors for human therapy and describes the most recent advances in the oncolytic virotherapy.

1. Introduction. 2. Varicella-zoster virus vaccines. 3. Development of HSV, human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus vaccines. 4. Herpesviral vectors for human therapy. 5. Summary

---

**Słowa kluczowe:** herpeswirusy, szczepionki, terapia onkolityczna

**Key words:** herpesviruses, vaccines, oncolytic therapy

---

## **1. Wstęp**

Herpeswirusy stanowią jedną z największych rodzin wirusowych, liczba jej przedstawicieli zidentyfikowanych do tej pory przekracza dwieście [12]. Gospodarzami herpeswirusów, z wyjątkiem jednego gatunku, są kręgowce [11], osiem gatunków jest odpowiedzialnych za infekcje u ludzi. Według obowiązującej nomenklatury [11] oznacza się je jako ludzkie herpeswirusy (human herpesvirus, HHV) 1–8, chociaż nadal często stosuje się nazwy zwyczajowe. Herpeswirusy patogenne dla człowieka reprezentują wszystkie trzy podrodziny *Herpesviridae*:  $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ . Herpeswirusy opryszczki HSV-1 (HHV-1) i HSV-2 (HHV-2) oraz wirus ospy wietrznej i półpaśca VZV (HHV-3) należą do podrodziny *Alphaherpesvirinae*, podrodzinę *Betaherpesvirinae* reprezentują ludzki cytomegalowirus HCMV (HHV-5) oraz wirusy rumienia nagłego HHV-6 i HHV-7; wirus Epsteina-Barr (HHV-4) oraz wirus mięsaka Kaposiego KSHV (HHV-8) to przedstawiciele *Gammaherpesvirinae*. Herpeswirusy należą do jednych z najbardziej rozpowszechnionych wirusów w naszej populacji. U około 70–90% mieszkańców Europy (90% w Pols-

ce) wykrywa się przeciwciała specyficzne dla HSV-1, u 10–20% (9% w Polsce) – dla HSV-2, 40–60% dla HCMV, do 95% dla EBV [1, 26, 39]. Wartości te są znacznie wyższe, nawet do 100%, w niektórych rejonach geograficznych – zależnie od statusu socjoekonomicznego badanej populacji, wieku lub infekcji towarzyszących, np. u nosicieli wirusa HIV [2, 26]. Ludzkie herpeswirusy powodują u osób z prawidłowo funkcjonującym układem immunologicznym choroby zwykle o przebiegu łagodnym lub wręcz infekcje bezobjawowe. Stają się groźne, gdy zawodzi kontrola układu immunologicznego: u osób z upośledzoną odpornością lub poddanych immunosupresji, po transplantacjach, w infekcji towarzyszącej HIV/AIDS, w okresie życia płodowego. Powikłania infekcji mogą obejmować zapalenie centralnego układu nerwowego, płuc, rogówki, wady wrodzone u dzieci i inne [1, 14]. EBV i KSHV to wirusy onkogenne, EBV jest jednym z najczęstszych wirusowych czynników etiologicznych nowotworów człowieka [28].

Herpeswirusy posiadają osłonkę okrywającą charakterystyczną warstwę białek zwaną tegumentem, kapsyd i materiał genetyczny, który stanowi dwuniciowy DNA

---

\* Autor korespondencyjny: Katedra Wirusologii Molekularnej, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, tel. (58) 5236382, e-mail: andrea@biotech.ug.gda.pl

o długości do 235 tys. pz [35]. W osłonce zakotwiczone są m.in. glikoproteiny wirusowe, odpowiedzialne za wnikanie wirionów do komórek i stanowiące główny cel przeciwciał neutralizujących. Ekspresja genów herpeswirusowych to proces wieloetapowy i ściśle kontrolowany, odbywa się w sposób kaskadowy w trzech głównych fazach: natychmiastowo-wczesnej ( $\alpha$ , immediate-early, IE), wczesnej ( $\beta$ , early, E) i późnej ( $\gamma$ , late, L) [35, 45]. W trakcie infekcji powstaje stosunkowo dużo białek, z których znakomita część indukuje silną odpowiedź immunologiczną. Po infekcji pierwotnej herpeswirusy przechodzą w stan utajenia – latencji – w komórkach nerwowych (HSV, VZV), limfocytach (HHV-6/7, EBV, KHSV), monocytach/makrofagach (CMV, HHV-6), komórkach układu siateczkowo-śródbłonkowego węzłów chłonnych i komórkach śródbłonka tętnic (HCMV), gdzie w określonych warunkach dochodzi do ich reaktywacji [3, 14, 38]. Podczas latencji zachodzi ograniczona ekspresja genów, głównie potrzebnych do zahamowania cyklu litycznego, nie wykrywa się produktów białkowych (HSV) lub ich liczba jest ograniczona. Reaktywacja ze stanu latencji oznacza spotkanie z wytworzoną w trakcie infekcji pierwotnej, gotową specyficzną odpowiedzią immunologiczną. Aby przetrwać w toku ewolucji herpeswirusy musiały wykształcić różnorodne mechanizmy hamowania odpowiedzi immunologicznej i dziś uznawane są za mistrzów ucieczki immunologicznej. Immunomodulacja dotyczy zarówno odpowiedzi wrodzonej, jak i nabytej. Znaczna część inhibitorów wirusowych hamuje aktywność limfocytów T cytotoksycznych CD8+, wskazując na istotną rolę tych komórek w kontroli zakażeń herpeswirusowych [16].

Infekcje herpeswirusowe kontroluje się przy pomocy chemioterapeutyków, głównie analogów nukleozydowych (acyklowir, gancyklowir, famcyklowir, walacyklowir) lub nukleotydomów (cidofowir) [46]. Ich wprowadzenie stało się przełomem w terapii zakażeń, jednakże pomimo opracowania leków modyfikowanych w celu poprawy biodostępności, zwiększenia aktywności przeciwwirusowej i zmniejszenia toksyczności nie doprowadziło do eradykacji wirusów z populacji. Za rozprzestrzenianie się herpeswirusów w populacji człowieka wini się dziś przede wszystkim asymptomatyczne wydalanie wirusa oraz zdolność do przebywania w stanie latencji [10, 19]. Wydaje się, że drogą do eliminacji zakażeń mogą być przede wszystkim szczepionki.

Badaniom klinicznym poddaje się dwa typy szczepionek: profilaktyczne i terapeutyczne. Szczepionki profilaktyczne mają za zadanie chronić przed infekcją osoby seronegatywne. Szczepionki terapeutyczne są przeznaczone dla osób, które przeszły infekcję i posiadają wirusy w stanie latencji. Mają one chronić przed reaktywacją wirusa lub ograniczać objawy z nią zwią-

zane. Testowane są zarówno preparaty tradycyjne, oparte na żywych atenuowanych szczepach wirusów lub szczepionkach podjednostkowych z rekombinowanymi białkami uzyskiwanymi w różnych systemach ekspresji, jak i nowoczesne preparaty wieloskładnikowe typu „prime-boost”, szczepionki oparte na wektorach pochodzących z innych wirusów, komórki prezentujące antygeny wirusowe, szczepionki DNA, szczepionki peptydowe. Testowane są różne adiuwanty. Dla herpeswirusów istnieją modele małych zwierząt (myszy, króliki, świnki morskie), ze względu na zdolność tych wirusów o szerokim zakresie gospodarza do ich infekcji (HSV) lub istnienie gatunków wirusów odpowiadających ludzkiemu (np. myszy cytomegalowirus). Modyfikacje genomów herpeswirusowych zostało w ostatnich latach znacznie ułatwione poprzez poznanie pełnych sekwencji wirusowego DNA oraz uzyskanie genomów w postaci sztucznych chromosomów bakteryjnych, tzw. BAC-ów (bacterial artificial chromosome), zdolnych do replikacji w komórkach bakteryjnych. Umieszczenie w DNA wirusowym sekwencji replikonu mini-F *Escherichia coli*, w najnowszych wersjach umożliwiające ich późniejsze usunięcie (systemy rekombinacji Red, loxP/rekombinaza Cre), pozwala na prostsze manipulacje wielkimi genomami herpeswirusowymi oraz zmiany genów upośredzających namnażanie się wirusów, a nawet genów kluczowych [5, 48, 49].

Pomimo tak wielokierunkowego podejścia i wieloletnich badań nad szczepionkami przeciw herpeswirusom jedyne preparaty komercyjne zostały uzyskane dla wirusa VZV.

## 2. Szczepionki przeciw wirusowi ospy wietrznej i półpaśca

Szczepionki przeciw VZV należą do szczepionek konwencjonalnych, ich podstawę stanowi ten sam żywy atenuowany szczep wirusa Oka (tzw. szczepionkowy szczep Oka, V-Oka od ang. vaccine = szczepionka). Jego szczep rodzicielski (tzw. P-Oka od ang. parental) został wyizolowany w 1974 roku w Japonii przez zespół Takahashiego od dziecka przechodzącego pełnoobjawową ospę wietrzną [3, 49]. Atenuacja została uzyskana przez wielokrotne pasażę w komórkach obcych gatunkowo (płodowe fibroblasty świnki morskiej) oraz ludzkich komórkach diploidalnych, jej mechanizm nie jest do końca poznany [3]. Dostępne są preparaty chroniące przed infekcją VZV i ospą wietrzną, głównie u dzieci (np.: Varivax<sup>®</sup>, Varilrix<sup>®</sup>), również w wersji skojarzonej ze szczepionką świnka-odra różyczka, oraz szczepionka zapobiegająca reaktywacji wirusa i półpaścowi (Zostavax<sup>®</sup>).

Szczepionka profilaktyczna przeciw ospie wietrznej zastała wprowadzona w Stanach Zjednoczonych

w 1995 roku, w Polsce jest zalecana od 2003 roku. Ponad 10-letnia historia stosowania tej szczepionki pozwoliła na długoterminową ocenę jej skuteczności w czasie. Wyniki testu na dużej grupie szczepionych ujawniły zwiększanie się wraz z upływem lat częstości zachorowań na ospę u osób szczepionych (9 przypadków na 1000 osób po 5 latach i 58/1000 po 9 latach) [6]. Rezultatem było zarekomendowanie przez zespół przygotowujący wspomniany raport dwóch dawek szczepionki dla wszystkich dzieci i doszczepienie osób, które otrzymały jedną dawkę.

W roku 2006 zarejestrowano w Europie szczepionkę Zostavax, chroniącą przed półpaścem i jego najczęstszym powikłaniem, nerwobólem półpaścicowym (postherpetic neuralgia, PHN). Szczepionka ta jest zalecana dla ludzi po 50 roku życia, jej działanie przypisuje się intensyfikacji powstałej podczas infekcji pierwotnej komórkowej odpowiedzi immunologicznej, która ulega osłabieniu u osób starszych. Zostavax zawiera ten sam szczep V-Oka w dawce znacznie większej niż szczepionki przeciw ospie wietrznej, średnio 10–14 razy. Badania kliniczne na dużą skalę wykazały, iż szczepionka ta zmniejsza prawdopodobieństwo reaktywacji wirusa średnio o 51% (u osób powyżej 60 roku życia te wyniki były jeszcze lepsze) oraz znacznie zmniejsza nasilenie choroby i ryzyko wystąpienia powikłań [29].

Przez ostatnie lata badacze próbowali zrozumieć mechanizm atenuacji szczepu V-Oka. W tym celu dokonali jego charakterystyki molekularnej, poznano pełną sekwencję genomu szczepów P-Oka i V-Oka. Analiza porównawcza wykazała obecność 42 różnic nukleotydowych, większość z nich znajdowała się w genie głównego transaktywatora wirusowego, natychmiastowo-wczesnego białka IE62 [49]. Te różnice oraz dodatkowe delecje i insercje, m.in. w rejonie bliskim *origin* replikacji, mogą tłumaczyć słabszą replikację wirusa w hodowlach komórkowych *in vitro* i upośledzone rozprzestrzenianie się między komórkami. Genomy V-Oka i P-Oka zostały również skonstruowane w wersji BAC, co zdecydowanie powinno ułatwić dalszą charakterystykę szczepów tego trudnego do pracy w warunkach laboratoryjnych i modyfikacji genetycznych wirusa [49].

Najnowsze badania sugerują, iż skuteczność szczepionek anti-VZV jest związana z ich zdolnością do aktywacji składników odpowiedzi wrodzonej, głównie infiltrujących miejsce zakażenia komórek dendrytycznych [17]. Szczep szczepionkowy VZV utracił zdolność do blokowania szlaku sygnalizacji zależnego od receptorów Toll-podobnych (TLR)-2, promującego produkcję interleukiny 12, która wraz z IFN- $\gamma$  wpływa na polaryzację odpowiedzi komórkowej w kierunku Th1, co ma kluczowe znaczenie dla kontroli infekcji.

Ponieważ istniejące szczepionki przeciw VZV uznawane są za bezpieczne i skuteczne, brak jest doniesień o opracowywaniu nowych preparatów.

### 3. Badania nad szczepionkami przeciw wirusom HSV, ludzkiemu cytomegalowirusowi i wirusowi Epsteina-Barr

Zupełnie inaczej wygląda stan profilaktyki i terapii zakażeń wirusami HSV, CMV i EBV. Ze względu na powszechność infekcji, koszty terapii chemioterapeutykami oraz wpływ chorób na jakość życia społeczeństwa w 1999 roku amerykański Instytut Medycyny uznał opracowanie skutecznej szczepionki przeciw tym wirusom za priorytetowe [22]. Próby konstrukcji skutecznych preparatów podejmuje się praktycznie od identyfikacji wirusów. Pierwsze testy obejmowały podejścia najbardziej tradycyjne: inaktywowane całe wiriony, atenuowane szczepy wirusów, szczepionki podjednostkowe oparte na składnikach inaktywowanych wirionów lub rekombinowanych białkach powierzchniowych stanowiących najczęstszy cel przeciwciał neutralizujących (białko gD HSV, gB HSV i HCMV, gp350 wirusa EBV) [19, 22, 46]. Jednakże te pierwsze szczepionki, dające obiecujące wyniki w fazie badań laboratoryjnych na modelach zwierzęcych, nie spełniły kryteriów odpowiedniej skuteczności w testach klinicznych. Spośród izolowanych od chorych atenuowanych szczepów wirusów testy kliniczne na szeroką skalę przeszedł szczep Towne wirusa CMV. Szczepionka ta okazała się być bezpieczna oraz indukowała produkcję przeciwciał neutralizujących i odpowiedź komórkową, zapobiegając w 89% objawom chorobowym u osób po transplantacji nerki, nie chroniła jednak przed przekazaniem wirusa biorcom lub reaktywacją wirusa [22]. Niepowodzeniem zakończyła się również próba zastosowania tej szczepionki w celu ochrony przed przekazaniem wirusa seronegatywnym matkom od zakażonych dzieci. Szczep Towne jest obecnie testowany w strategii typu „prime-boost”, gdzie szczepienie wirusem atenuowanym jest poprzedzone podaniem szczepionki DNA [21].

Jedne z największych testów dla HSV przeszły dwie szczepionki podjednostkowe. Pierwsza z nich – firmy Chiron, była oparta na białkach gD i gB HSV-2 izolowanych z hodowli komórek ssaczych CHO (Chinese hamster ovary) z emulsją skwalenu w wodzie jako adiuwantem (gD2/gB2/MF59). Szczepionka ta okazała się być bezpieczna i wywoływała produkcję przeciwciał neutralizujących na wysokim poziomie, ale przejściowo, dawała też zbyt niską ochronę przed infekcją HSV-2 (średnio 9% skuteczność) w dwóch dużych testach klinicznych, tzw. teście partnerów, gdzie badano przekazywanie wirusa między seronegatywnymi

Przykłady testowanych szczepionek przeciw wirusom opryszczki HSV [4, 7, 9, 18, 32, 42]

Wirus	Postać szczepionki	Nazwa szczepionki	Faza badań klinicznych
HSV-2	gB2/gD2/MF59 (Chiron)	Podjednostkowa, gB i gD otrzymane w komórkach CHO, emulsja skwalenu w wodzie jako adiuwant	III, wycofana*
HSV-2	gD2/alum/MPL (GSK)	Podjednostkowa, gD otrzymane w komórkach CHO, adiuwant glinowy i O-deacetylowany, monofosforylowany lipid A (MPL)	III
HSV-2	gD2/gC2	Podjednostkowa, gD i gC otrzymane w bakulowirusowym systemie ekspresji	Przedkliniczne na myszach
HSV-1	Lipopeptydowa gD1	Trzy pary połączonych peptydowych epitopów CD8+ i CD4+ z białka gD1z dołączonym kwasem palmitynowym	Przedkliniczne na myszach
HSV-1	pgB/Bax/dendrosomy	Szczepionka DNA, plazmid DNA kodujący gB z genem proapoptotycznym, dendrosomy jako nośnik DNA	Przedkliniczne na myszach
HSV-2/ HSV-1	dl5-29 (Acambis)	HSV-2 – wirus defektywny, delecja w genie UL5 (helikazy-primazy) i UL29 (główne białko wiążące DNA)	Przedkliniczne na myszach i świnkach morskich
HSV-2	ImmunoVEX (Biovex)	HSV-2 – wirus żywy atenuowany z delecją czterech genów kodujących białka immunomodulacyjne: ICP47, vhs, US5 i UL43	I
HSV-2	rVSV-gD2	gen gD2 w wektorze opartym na wirusie pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej	Przedkliniczne na myszach i świnkach morskich

\* testy nie wykazały wystarczającej skuteczności szczepionki

i seropozytywnymi partnerami oraz w teście zapadalności na infekcje w grupie ryzyka, u osób z historią przebytych wcześniej innych chorób przenoszonych drogą płciową [7]. Firma GlaxoSmithKline zaproponowała szczepienie rekombinowanym białkiem gD wirusa HSV-2 (gD2/alum/MPL), również otrzymanym w komórkach CHO, ale z innym zestawem adiuwantów, wyniki testów klinicznych ukazały się w roku 2002. Szczepionka ta indukowała zarówno produkcję przeciwciał neutralizujących, jak i odpowiedź komórkową [41]. Testy kliniczne zakończyły się częściowym sukcesem – wykazano wysoką skuteczność u seronegatywnych kobiet (73% ochrona przed pojawieniem się objawów klinicznych infekcji, poziom ochrony przed przeniesieniem wirusa ok. 40%). Jednakże wyniki testów dla kobiet – nosicielek wirusa i mężczyzn niezależnie od ich statusu serologicznego wirusa były niewystarczające (średnia skuteczność szczepionki 38%).

Badania próbujące wyjaśnić fenomen wyników tak zależnych od płci osób szczepionych wykazały znacznie silniejszą u kobiet odpowiedź limfocytów T CD4+ na trzy z zestawu kilku immunodominujących epitopów pochodzących z białka gD2 [50] i nie wyklucza się, że podobne zjawisko ma miejsce dla limfocytów T CD8+. Różnice w aktywacji limfocytów mogą z kolei wynikać z innej u kobiet regulacji komórek prezentujących antygeny (APC), których różnicowanie jest podatne na wpływ hormonów płciowych, takich jak estrogen [23]. Niektórzy badacze wiążą różnice w wynikach szczepionek podjednostkowych obu firm z zastosowanymi adiuwantami, podkreślając w ten sposób znaczenie adiuwantów dla skuteczności szczepionek HSV [19, 46].

Po wielu badaniach zakończonych podobnie jak w przypadku szczepionek podjednostkowych HSV-2

niepowodzeniem, naukowcy powrócili do badań podstawowych przebiegu infekcji, immunobiologii, biologii molekularnej wirusów, poszukiwania nowych antygenów wirusowych. Wyniki tych badań często tłumaczą dotychczasowe niepowodzenia i wytyczają nowe strategie, m.in. podkreślają istotność aktywacji przez szczepionki składowej komórkowej odpowiedzi immunologicznej, głównie limfocytów T CD4+ i CD8+ w ochronie przed infekcjami pierwotnymi. Pierwsze podejścia szczepionkowe miały na celu wzbudzenie silnej produkcji przeciwciał neutralizujących, które uważa się za podstawę ochrony przed infekcjami pierwotnymi i transmisją przezłożyskową, ale, inaczej niż zakładano, które nie wydają się kontrolować reaktywacji wirusa [7, 22]. Szczepionki, które indukowały wysoki poziom przeciwciał, nie okazały się skuteczne, szczególnie w przypadku infekcji wtórnych. Obecnie podkreśla się rolę limfocytów T CD4+ typu Th1, produkujących m.in. IFN- $\gamma$ , w szczepionkach terapeutycznych [19, 22]. Ponadto duże znaczenie ma poznawanie odpowiedzi immunologicznej związanej z błonami śluzowymi [10, 24] oraz mechanizmów jej immunomodulacji przez herpeswirusy. W idealnej szczepionce aktywność limfocytów T powinna towarzyszyć indukcji przeciwciał neutralizujących wirusa. Spośród innych ważniejszych odkryć na uwagę zasługuje m.in. wykazanie, iż ludzki cytomegalowirus używa nieco odmiennego repertuaru białek powierzchniowych do infekcji komórek nabłonkowych i śródbłonna naczyń niż fibroblastów [36], co może prowadzić do słabszej produkcji przeciwciał blokujących wejście do komórek, w których wirus przechodzi w stan latencji przez niektóre antygeny (np. białko gB) [8]. Dla skuteczności szczepień ważne mogą się okazać drogi podania szczepionki; testuje się poda-

wanie tzw. „bez użycia igieł” – z ang. „needle-free”: donosowe, dooczne lub intrawaginalne [10, 18, 19].

Wyniki szczepionki gD2 firmy GSK dla kobiet, które nie zetknęły się wcześniej z wirusami HSV okazały się być na tyle obiecujące, by kontynuować testy kliniczne III fazy na dużo większej grupie (ponad 7000) seronegatywnych kobiet przed 30 rokiem życia. Badania nad tą szczepionką o nazwie HERPEVAC, współfinansowane przez rząd Stanów Zjednoczonych, miały się zakończyć pod koniec 2009 roku [30]. W przypadku pozytywnych wyników możemy doczekać się kolejnej, obok szczepionki podjednostkowej przeciw wirusowi brodawczaka ludzkiego HPV, szczepionki przeciw chorobie przenoszonej drogą płciową, zalecaniej dla dziewcząt przed inicjacja seksualną. Nadal jednak pozostaje aktualny problem szczepień osób seropozytywnych pod względem HSV, w tym nosicieli HIV, i problem zapobiegania epidemiom HSV-2.

Spośród szczepionek podjednostkowych obiecujące wyniki, predysponujące do wprowadzenia preparatów na rynek, dały również badania kliniczne II fazy zastosowania rekombinowanego białka gB HCMV w kombinacji z adiuwantem MF59 dla seronegatywnych kobiet w kontroli zakażeń prenatalnych [32] oraz badania kliniczne II fazy z zastosowaniem rekombinowanego głównego białka osłonki gp350 EBV w zapobieganiu mononukleozie zakaźnej [40]. Pierwsza z nich, oparta podobnie jak szczepionki dla HSV, na białku izolowanym z kultur komórek CHO, w połączeniu z emulsją skwalenu z wodą (MF59) jako adiuwantem, dała 50% skuteczność [33]. Szczepionka przeciw EBV (białko gp350 z wodorotlenkiem glinu i AS04 jako adiuwantami) okazała się skuteczna w 78% w ochronie przed pojawianiem się objawów klinicznych mononukleozy [40].

W grupie szczepionek opartych na żywych wirusach większe nadzieje wiąże się ze specjalnie zaprojektowanymi szczepionkami z żywymi atenuowanymi wiru-

sami z delecją m.in. genu kodującego główny czynnik neurowirulencji – białko  $\gamma$ 34.5, genów białek immunomodulacyjnych (np. znajdujący się obecnie w I fazie badań klinicznych ImmunoVEX HSV2 [42]) lub wirusami niezdolnymi do replikacji (np. znajdujący się w fazie badań przedklinicznych HSV-1 dl5-29) – wektory te dają obiecujące wyniki u szczepionych myszy i świnek morskich, również jako szczepionki terapeutyczne [9, 18].

Testowane są również szczepionki zawierające inne antygeny wirusowe, ich kombinacje lub syntetyczne peptydy stanowiące epitopy rozpoznawane przez limfocyty T w kompleksach z lipidami. Te ostatnie mogą zawierać tzw. „epitopy asymptomatyczne” – peptydy stanowiące unikalny zestaw epitopów rozpoznawanych przez limfocyty T u pacjentów, u których nie rozwijają się objawy chorobowe, co oznacza, iż lepiej zwalczają oni infekcję [10]. Podstawy tego zjawiska są również w trakcie badań. Dołączenie w szczepionkach lipopeptydowych reszty kwasu tłuszczowego, takiego jak kwas palmitynowy, stanowi wewnętrzny adiuwant, wzmacniający indukcję odpowiedzi immunologicznej, szczególnie prezentację antygenów przez komórki dendrytyczne/komórki Langerhansa związane z błonami śluzowymi i aktywację limfocytów CD8+ [10, 22].

Obiecujące wyniki prezentują również szczepionki oparte na innych wektorach wirusowych: m.in. dla HCMV oparta na wektorze alfawirusowym przenoszącym gen gB lub gen fuzyjny pp65/IE1, dla HCMV oparta na wektorze MVA (modyfikowany wirus vaccinia szczep Ankara) przenoszącym również gen gB, dla EBV zastosowanie koktajlu białek litycznych i latentnych przenoszonych przez wirus vaccinia (VV) [22, 25]. W przypadku szczepionek terapeutycznych przeciw nowotworom związanym z EBV ich podstawę powinny stanowić antygeny charakterystyczne dla

Tabela II

Przykłady testowanych szczepionek przeciw wirusom HCMV i EBV [21, 22, 25, 27, 36, 40]

Wirus	Nazwa szczepionki	Postać szczepionki	Faza badań klinicznych
CMV	VCL-CB01 (Vical)	Szczepionka DNA, plazmidy kodujące pp65 i gB	II
CMV	gB/MF59 (Sanofi Pasteur, wcześniej Chiron)	Skrócona, sekrecyjna forma gB produkowana w komórkach CHO	II
CMV	gB/pp65/IE1 (AlphaVax/Novartis)	Replikon alfaherpeswirusowy jako nośnik	I/II
CMV	VCL-CT02/Towne	Szczepionka typu „prime-boost”: trójwalentna DNA, plazmidy kodujące pp65, gB i IE1, doszczepienie żywym atenuowanym szczepem Towne	I
EBV	gB/wodorotlenek glinu/AS04	Podjednostkowa, rekombinowane gB z komórek CHO, wodorotlenek glinu i AS04 jako adiuwanty	II
EBV	Poczwórna VV z koktajlem białek cyklu litycznego i latencji	gp350/gp110/EBNA2/EBNA-3C w wektorze vaccinia	Przedkliniczne na myszach
EBV	Ad-SAVINE	Epitopy białek latencji LMP1 i LMP2 w wektorze adenowirusowym	Przedkliniczne

latencji, takie jak białko złożone z epitopów pochodzących z LMP1 i LMP2 w szczepionce adenowirusowej Ad-SAVINE [27].

Inną strategię stanowią szczepionki DNA oparte na plazmidach niosące geny najbardziej immunogennych białek, głównie powierzchniowych (np. gB HSV-1 [32], gB HCMV w kombinacji z immunodominującym białkiem pp65 [36]), wymagają one jednak zastosowania dodatkowych modyfikacji mających na celu wzmocnienie ich immunogenności. Testuje się więc dodatek adiuwantów, zastosowanie koekspresji z genami białek proapoptotycznych (Bax) lub genem receptora dla limfotoksyny należącego do rodziny receptorów czynnika martwicy nowotworów TNF (LIGHT). Indukcja apoptozy w komórkach produkujących antygen wirusowy zwiększa ich usuwanie przez APC, takie jak komórki dendrytyczne, oraz aktywację limfocytów CD4+ i CD8+ w organach limfatycznych [36].

#### 4. Wektory herpeswirusowe w terapii człowieka

Równoległe z rozwojem szczepionek przeciw herpeswirusom testowane są różne podejścia mające na celu „przebrojenie” arsenału wirusowego w celu ich wykorzystania jako środków w terapii człowieka. Wektory oparte na wirusie HSV (głównie HSV-1) są bardzo obiecującymi kandydatami w terapii wirusowej głównie chorób o podłożu neurologicznym oraz nowotworów. Cechy, które zdecydowały o zainteresowaniu badaczy to m.in. infekcyjność względem różnych typów komórek, zarówno dzielących się, jak i nie dzielących, przede wszystkim neuronów, zdolność do inkorporacji dużych fragmentów obcego DNA (teoretycznie do 152 tys. pz w przypadku amplikonów), brak integracji wektorów do DNA chromosomalnego komórki, możliwość wykonywania testów wektorów na modelach małych zwierząt, czy też możliwość kontroli namnażania przy pomocy leków przeciwherpeswirusowych [43, 45].

Konstruuje się kilka rodzajów wektorów herpeswirusowych, w zależności od ich zdolności replikacyjnych:

- Wektory amplikonowe (amplikony) – plazmidy bakteryjne zawierające jako jedyne elementy pochodzące z HSV *origin* replikacji (*oriS*), sygnał cięcia/pakowania DNA (*pac*) i kasetę umożliwiającą ekspresję przenoszonego genu. DNA plazmidowy w formie konkatamerycznej jest pakowany do cząstek wirusowych HSV. Replikacja i pakowanie wymagają obecności DNA wirusów pomocniczych, którymi coraz częściej są, w miejsce wirusów zdolnych do replikacji, wirusy defektywne w postaci BAC. Amplikony są testowane jako wektory szczepionkowe (np. do ekspresji genów HIV, wirusa zapalenia wątroby typu C) lub wektory przenoszące geny terapeutyczne

w terapii genowej człowieka, np. w leczeniu uszkodzeń mózgu (ekspresja nerwowego czynnika wzrostu NGFR, genów białek szoku termicznego, genów białek antyapoptotycznych). Badania z użyciem amplikonów są hamowane przez niskie miana wektorów uzyskiwanych w systemach wolnych od wirusa pomocniczego zdolnego do replikacji [13, 45].

- Wektory defektywne, niezdolne do replikacji i tworzenia cząstek potomnych, produkowane w liniach komórek komplementujących funkcje usuniętych genów – testowane również jako wektory szczepionkowe (dl5-29), są przeznaczone głównie do przenoszenia genów terapeutycznych takich białek jak neuroprzebieżniki, neuroreceptory, czynniki wzrostu i inne, w schorzeniach neurodegeneracyjnych i dziedzicznych wadach genetycznych. Ciekawym podejściem jest również zastosowanie wektora produkującego enkefalinę do zwalczania bólu w chorobach nowotworowych [45].
- Wektory HSV atenuowane, zdolne do ograniczonej lub warunkowej replikacji, mogą służyć jako typowe wektory onkolityczne (oHSV). Selektywność namnażania w komórkach nowotworowych i ich niszczenia uzyskuje się poprzez usunięcie z genomu HSV genów enzymów związanych z metabolizmem DNA, takich jak kinaza tymidynowa (HSV-TK) lub reduktaza rybonukleotydowa (HSV-RR) [44, 45]. Enzymy te umożliwiają wirusowi tworzenie prekursorów nukleotydów w komórkach nie dzielących się lub o ograniczonej liczbie podziałów. Po delecji genów TK lub RR wirus może się replikować jedynie w komórkach intensywnie dzielących się, takich jak komórki nowotworowe. W testowanych obecnie wektorach tzw. trzeciej generacji modyfikacjom TK i RR towarzyszą dodatkowe delecje genów, zwiększające bezpieczeństwo wektorów, m.in. głównego czynnika neurowirulencji – białka  $\gamma_1$ 34.5, białek pośredniczących w rozprzestrzenianiu się wirusa, genów związanych z latencją. Produkt genu  $\gamma_1$ 34.5 jest białkiem multifunkcyjnym, jedna z jego funkcji polega na ochronie przed mechanizmem przeciwwirusowej odpowiedzi wrodzonej komórki opartej na kinazie białkowej R (PKR). Białko ICP34.5 defosforyluje czynnik translacyjny eIF-2 $\alpha$ , odwracając w ten sposób efekt jego fosforylacji przez PKR, która zatrzymuje syntezę białek w komórce [44]. Szczepy HSV z mutacjami w genie  $\gamma_1$ 34.5 mogą się replikować jedynie w komórkach z aktywną ścieżką sygnalizacyjną Ras, która hamuje aktywację PKR. Białko ICP47 jest z kolei głównym czynnikiem immunomodulacyjnym wirusa, jego delecja zwiększa prezentację antygenów w kompleksach z białkami głównego układu zgodności tkankowej MHC klasy I i stymulację nowotworospecyficznych limfocytów T cytotoksycznych [16, 43].

Tabela III

Przykłady testowanych wektorów onkolitycznych opartych na wirusie HSV-1 [15, 44, 45, 47]

Nazwa preparatu	Modyfikacje wektora	Zastosowanie	Faza badań klinicznych
G47Δ	ΔUL39 (RR) ICP47-	Glejak Rak odbytnicy Rak piersi	Przedkliniczne/I Przedkliniczne Przedkliniczne
G207	Δγ34.5 (2) ΔUL39 (RR)	Glejak Rak piersi	I/II Przedkliniczne
NV1020	Δγ 34.5(1) ΔUL56, ΔUL24 gJ/gG/PK HSV-2	Przerzutujący rak jelita grubego Przerzutujący rak prostaty Rak piersi, rak wątroby	I/II Przedkliniczne Przedkliniczne
NV1042	Δγ 34.5 (1) ΔUL56 gJ/gG/PK HSV-2 ICP47-, US11-US10-, IL12+	Przerzutujący rak prostaty Rak piersi	Przedkliniczne Przedkliniczne
OncoVEX <sup>GALV/CD</sup>	ΔUL39 (RR) Δγ 34.5 (2)* ICP47- GALV <i>env</i> <i>Fcy::Fur</i>	Rak przełyku Rak płaskokomórkowy skóry Glejak	Przedkliniczne Przedkliniczne Przedkliniczne
OncoVEX <sup>GM-CSF</sup>	ΔUL39 (RR), Δγ 34.5 (2)* ICP47-, GM-CSF+	Czerniak Rak płaskonabłonkowy głowy i szyi	III III
HF10	ΔUL43, ΔUL49.5, ΔUL55, ΔUL56, ΔLAT	Wznowy raka piersi Nawrotowy rak głowy i szyi Czerniak	I I Przedkliniczne

\* (1) – delecja jednej kopii genu; (2) – delecja obu kopii genu

Wektory trzeciej generacji zawierają często dodatkowe geny, wzmagające ich potencjał lityczny (np. białko fuzyjne wirusa GALV). Aktywność wektorów onkolitycznych HSV może być dodatkowo wzmocniona poprzez umieszczenie w wektorze genów enzymów aktywujących proleki chemioterapeutyczne (np. OncoVEX<sup>GALV/CD</sup> z drożdżową deaminazą cytydyny aktywującą 5-fluorocytosynę do 5-fluorouracylu [34]) lub białek o aktywności przeciwnowotworowej, cytokin i innych. Badania I fazy potwierdzają ich bezpieczeństwo (brak objawów chorobowych) oraz łagodne efekty uboczne (przejściowo: gorączka, dreszcze). W fazach I lub II badań klinicznych znajdują się wektory do terapii glejaków (G207) oraz nowotworów wątroby, przewodu pokarmowego, raka piersi (HF10), płaskonabłonkowego raka głowy i szyi [44, 45]. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą wektora OncoVex<sup>GM-CSF</sup>, który wszedł w III fazę badań klinicznych po wykazaniu 26% długotrwałej (do 31 tygodni) redukcji masy guzów, bezpośrednio nastrzykiwanych oraz dzięki aktywacji odpowiedzi immunologicznej również guzów sąsiednich [37]. Problemem wektorów HSV jest ich ograniczone rozprzestrzenianie się w miejscu podania, co próbuje się poprawić związkami drobnocząsteczkowymi wpływającymi na replikację wirusa lub enzymami degradującymi matriks zewnątrzkomórkową. Wektory podaje się doguzowo lub w miejsce po resekcji guzów. Trwają również badania nad

zwiększeniem trwałości wektorów HSV w krwiobiegu, głównie ochrony przed składnikami układu dopełniacza (przedtraktowanie czynnikiem jadu kobry lub cyklofosfamidem [20]), co umożliwiłoby obok doguzowego, również dożylnego podawanie wirusów.

## 5. Podsumowanie

Przedstawiciele rodziny *Herpesviridae* należą do najbardziej rozpowszechnionych patogenów wirusowych w naszej populacji. Częstość zakażeń herpeswirusowych wzrasta z roku na rok pomimo istnienia skutecznych chemioterapeutyków, głównie ze względu na asymptomatyczne wydalanie wirusów oraz zdolność herpeswirusów do przebywania w stanie latencji i cyklicznych reaktywacji. Dlatego uzasadniony wydaje się pogląd, iż do eradykacji herpeswirusów mogą się przyczynić przede wszystkim szczepionki, jako uzupełnienie stosowania leków. Pomimo wieloletnich i różnorodnych badań wciąż jedyne komercyjne szczepionki są dostępne dla wirusa ospy wietrznej i półpaśca. Dzięki najnowszym badaniom coraz więcej wiemy o szczepie szczepionkowym wirusa VZV, mechanizm jego atenuacji i zarazem skuteczności tej szczepionki są lepiej zrozumiałe. Opracowanie skutecznych szczepionek przeciw głównym herpeswirusowym patogenom człowieka: wirusom CMV, EBV i HSV-2

znajdują się na liście celów priorytetowych. Najbardziej pożądana jest konstrukcja szczepionek profilaktycznych, które chroniłyby osoby seronegatywne i w tej dziedzinie testy kliniczne osiągnęły najlepsze wyniki. Coraz więcej badań potwierdza fakt, iż odporność powstała w wyniku infekcji pierwotnej nie chroni przed reaktywacją wirusa. Szczepionki profilaktyczne i terapeutyczne będą musiały najprawdopodobniej aktywować inne składniki odpowiedzi immunologicznej a dobór antygenów szczepionkowych musi być dobrze przemyślany. Po latach nieskutecznych prób naukowcy wrócili do „stołów laboratoryjnych” – badań podstawowych wirusów, co zaowocowało zwiększoną liczbą nowych podejść i testów klinicznych. Należy również zauważyć, iż w przypadku każdego z patogenów może okazać się skuteczne różne podejście, ponieważ pomimo wielu wspólnych cech biologicznych wirusy nawet bliżej ze sobą spokrewnione różnią się między sobą (m.in. tropizmem, immunobiologią, repertuarem białek powstających w czasie latencji, mechanizmami immunomodulacyjnymi). Rozwój wirusowych wektorów szczepionkowych przyczynił się również do idei wykorzystania wektorów opartych na wirusie HSV w terapii genowej i onkolitycznej terapii nowotworów człowieka. Nowe metody biologii molekularnej znajdują swe zastosowanie w optymalizacji produkcji wektorów wirusowych, zwiększa się też ich bezpieczeństwo, co skutkuje testami wektorów w terapii coraz to nowych rodzajach nowotworów. Wektory onkolityczne mogą stanowić korzystne uzupełnienie radio- i chemioterapii.

## Piśmiennictwo

1. A WHO Meeting: Prevention and control of herpesvirus diseases. Part I. Clinical and laboratory diagnosis and chemotherapy. *Bull. World Health Organ.* **63**, 185–201 (1985)
2. Andreoletti L., L. Belec i wsp.: High seroprevalence of herpes simplex virus type 2 infection in French human immunodeficiency virus type 1-infected outpatients. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4215–427 (2005)
3. Arvin A.M., Gershon A.A.: Live attenuated varicella vaccine. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**, 59–100 (1996)
4. Awasthi S., Lubinski J.M., Friedman H.M.: Immunization with HSV-1 glycoprotein C prevents immune evasion from complement and enhances the efficacy of an HSV-1 glycoprotein D subunit vaccine. *Vaccine*, **27**, 6845–6853 (2009)
5. Brune W., Messerle M., Koszinowski U.H.: Forward with BACs: new tools for herpesvirus genomics. *Trends Genet.* **16**, 254–259 (2000)
6. Chaves S.S., Gargiullo P., Zhang J.X., Civen R., Guris D., Mascola L., Seward J.F.: Loss of vaccine-induced immunity to varicella over time. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1121–1129 (2007)
7. Corey L., S.E. Straus i wsp.: Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group. *JAMA*, **282**, 331–340 (1999)
8. Cui X., Meza B.P., Adler S.P., McVoy M.A.: Cytomegalovirus vaccines fail to induce epithelial entry neutralizing antibodies comparable to natural infection. *Vaccine*, **26**, 5760–5766 (2008)
9. Da Costa X.J., Jones C.A., Knipe D.M.: Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6994–6998 (1999)
10. Dasgupta G., Chentoufi A.A., Nesburn A.B., Wechsler S.L., BenMohamed L.: New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev. Vaccines* **8**, 1023–1035 (2009)
11. Davison A.J.: Herpesvirus systematics. *Vet. Microbiol.* **143**, 52–69 (2010)
12. Ehlers B., Discovery of herpesviruses (w) *Encyclopedia of Virology*, 3rd edition, red. B. Mahy, M. van Regenmortel, Elsevier, Amsterdam, 2008, s. 421–429
13. Epstein A.L.: HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties – a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **104**, 399–410 (2009)
14. Figlerowicz M.: Najczęstsze postacie kliniczne zakażeń wywołanych przez wirusy z rodziny *Herpesviridae*. *Przew. Lek.* **8**, 61–67 (2006)
15. Geevarghese S.K., Geller D.A., de Haan H., Hörer M., Knoll A., Mescheder A., Nemunaitis J., Reid T., Sze D.Y., Tanabe K.K.: Phase I/II study of an oncolytic herpes simplex virus, NV1020, in patients with heavily pretreated refractory colorectal cancer metastatic to the liver. *Hum. Gene Ther.* doi:10.1089/hum.2010.020 (2010)
16. Griffin B.D., Verweij M.C., Wiertz E.J.: Herpesviruses and immunity: the art of evasion. *Vet. Microbiol.* **143**, 89–100 (2010)
17. Gutzeit C., G. Schönrich i wsp.: Identification of an important immunological difference between virulent varicella-zoster virus and its avirulent vaccine: viral disruption of dendritic cell instruction. *J. Immunol.* **185**, 488–497 (2010)
18. Hoshino Y., Pesnicak L., Dowdell K.C., Burbelo P.D., Knipe D.M., Straus S.E., Cohen J.I.: Protection from herpes simplex virus (HSV)-2 infection with replication-defective HSV-2 or glycoprotein D2 vaccines in HSV-1-seropositive and HSV-1-seronegative guinea pigs. *J. Infect. Dis.* **200**, 1088–1095 (2009)
19. Hosken N.A.: Development of a therapeutic vaccine for HSV-2. *Vaccine*, **23**, 2395–2398 (2005)
20. Ikeda K., Wakimoto H., Ichikawa T., Jung S., Hochberg F.H., Louis D.N., Chiocca E.A.: Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant. *J. Virol.* **74**, 4765–4775 (2000)
21. Jacobson M.A., Adler S.P., Sinclair E., Black D., Smith A., Chu A., Moss R.B., Wloch M.K.: A CMV DNA vaccine primes for memory immune responses to live-attenuated CMV (Towne strain). *Vaccine*, **27**, 1540–1548 (2009)
22. Khanna R., Diamond D.J.: Human cytomegalovirus vaccine: time to look for alternative options. *Trends Mol. Med.* **12**, 26–33 (2006)
23. Kovats S., Carreras E.: Regulation of dendritic cell differentiation and function by estrogen receptor ligands. *Cell Immunol.* **252**, 81–90 (2008)
24. Kwant-Mitchell A., Ashkar A.A., Rosenthal K.L.: Mucosal innate and adaptive immune responses against herpes simplex virus type 2 in a humanized mouse model. *J. Virol.* **83**, 10664–10676 (2009)



25. Lockey T.D., Zhan X., Surman S., Sample C.E., Hurwitz J.L.: Epstein-Barr virus vaccine development: a lytic and latent protein cocktail. *Front. Biosci.* **13**, 5916–5927 (2008)
26. Looker K.J., Garnett G.P., Schmid G.P.: An estimate of the global prevalence and incidence of herpes simplex virus type 2 infection. *Bull. World Health Organ.* **86**, 805–812 (2008)
27. Lutzky V.P., Corban M., Heslop L., Morrison L.E., Crooks P., Hall D.F., Coman W.B., Thomson S.A., Moss D.J.: Novel approach to the formulation of an Epstein-Barr virus antigen-based nasopharyngeal carcinoma vaccine. *Vaccine*, **26**, 5760–5766 (2008)
28. Martin D., Gutkind J.S. Human tumor-associated viruses and new insights into the molecular mechanisms of cancer. *Oncogene*, **27** Suppl 2, 31–42 (2008)
29. Mills R., Tyring S.K., Levin M.J., Parrino J., Li X., Coll K.E., Stek J.E., Schlienger K., Chan I.S., Silber J.L.: Safety, tolerability, and immunogenicity of zoster vaccine in subjects with a history of herpes zoster. *Vaccine*, **28**, 4204–4209 (2010)
30. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, <http://www.niaid.nih.gov/topics/genitalherpes/research/herpevac/Pages/Default.aspx> (2 sierpnia 2010 roku)
31. Oxman M.N., J.L. Silber i wsp.: A vaccine to prevent herpes zoster and postherpetic neuralgia in older adults. *N. Engl. J. Med.* **352**, 2271–2284 (2005)
32. Parsania M., Bamdad T., Hassan Z.M., Kheirandish M., Pouriayevali M.H., Sari R.D., Jamali A.: Evaluation of apoptotic and anti-apoptotic genes on efficacy of DNA vaccine encoding glycoprotein B of Herpes Simplex Virus type 1. *Immunol. Lett.* **128**, 137–142 (2010)
33. Pass R.: Development and evidence for efficacy of CMV glycoprotein B vaccine with MF59 adjuvant. *J. Clin. Virol.* **46** Suppl 4, 73–76 (2009)
34. Price D.L., Lin S.F., Han Z., Simpson G., Coffin R.S., Wong J., Li S., Fong Y., Wong R.J.: Oncolysis using herpes simplex virus type 1 engineered to express cytosine deaminase and a fusogenic glycoprotein for head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **136**, 151–158 (2010)
35. Roizman, B., Pellett P.E., The family Herpesviridae: A brief introduction (w) Field's Virology, 5<sup>th</sup> edition, red. D.M. Knipe, P.M. Howley, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007, s. 2479–2500
36. Schleiss M.R.: VCL-CB01, an injectable bivalent plasmid DNA vaccine for potential protection against CMV disease and infection. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **11**, 572–578 (2009)
37. Senzer N.N., J.J. Nemunaitis i wsp.: Phase II clinical trial of a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-encoding, second-generation oncolytic herpesvirus in patients with unresectable metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* **27**, 5763–5771 (2009)
38. Sinclair J., Sissons P.: Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.* **87**, 1763–1779 (2006)
39. Smith J.S., Rosinska M., Trzcinska A., Pimenta J.M., Litwinska B., Siennicka J.: Type specific seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 in four geographical regions of Poland. *Sex Transm. Infect.* **82**, 159–163 (2006)
40. Sokal E.M., Hoppenbrouwers K., Vandermeulen C., Moutschen M., Léonard P., Moreels A., Haumont M., Bollen A., Smets F., Denis M.: Recombinant gp350 vaccine for infectious mononucleosis: a phase 2, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the safety, immunogenicity, and efficacy of an Epstein-Barr virus vaccine in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* **196**, 1749–1753 (2007)
41. Stanberry L.R., G. Dubin i wsp.: Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1652–1661 (2002)
42. Thomas S., Barton S., Reay P., Marshall T., Love C., Goldsweig H., Coffin R.S.: Clinical development of an immune evasion gene-deleted live attenuated vaccine for HSV-2 (ImmunoVEX HSV2). 35<sup>th</sup> International Herpesvirus Workshop Poster 9.12 (2010)
43. Todo T., Martuza R.L., Rabkin S.D., Johnson P.A.: Oncolytic herpes simplex virus vector with enhanced MHC class I presentation and tumor cell killing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 6396–6401 (2001)
44. Todo T.: “Armed” oncolytic herpes simplex viruses for brain tumor therapy. *Cell Adh. Migr.* **2**, 208–213 (2008)
45. Watanabe D.: Medical application of herpes simplex virus. *J. Derm. Sci.* **57**, 75–82 (2010)
46. Wilson S.S., Fakioglu E., Herold B.C.: Novel approaches in fighting herpes simplex virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **7**, 559–568 (2009)
47. Wong J., Kelly K., Mittra A., Gonzalez S.J., Song K.Y., Simpson G., Coffin R., Fong Y.: A third-generation herpesvirus is effective against gastroesophageal cancer. *J. Sur. Res.* doi: 10.1016/j.jss.2010.03.021 (2010)
48. Wussow F., Fickenscher H., Tischer B.K.: Red-mediated transposition and final release of the mini-F vector of a cloned infectious herpesvirus genome. *PLoS One*, **4**(12): e8178 (2009)
49. Yamanishi K.: Molecular analysis of the Oka vaccine strain of varicella-zoster virus. *J. Infect. Dis.* **197**, Suppl. 2, 45–48 (2008)
50. Zhang X., Castelli F.A., Zhu X., Wu M., Maillère B., BenMohamed L.: Gender-dependent HLA-DR-restricted epitopes identified from herpes simplex virus type 1 glycoprotein D. *Clin. Vaccine Immunol.* **15**, 1436–1449 (2008)