

Viruslika partiklar som cancervaccin

Förhoppningarna nu stora – inte bara om papillomvirusassocierad cancer



KARIN TEGERSTEDT, med dr
KALLE ANDREASSON, läkare,
 doktorand
HANNA DAHLSTRAND, med dr,
 ST-läkare, Radiumhemmet,
 Karolinska Universitetssjukhuset
TORBJÖRN RAMQVIST, med dr

TINA DALIANIS,
 professor tina.dalianis@ki.se
 samtliga institutionen för
 onkologi och patologi, Karo-
 linska institutet, Stockholm

Sedan 1970-talet har den moderna molekylärbiologin utvecklats snabbt och gett oss fördjupad insyn i vad DNA, RNA och proteiner gör och vilka biologiska effekter de har. Initialt fanns begränsat med molekylärbiologiska tekniker, och det fanns ingen automatik eller storskalighet i de då tillgängliga teknikerna. Det var därför både nödvändigt och enklare att forska på små DNA-virus.

Många av de upptäckter som gjordes utgick från en grupp tumörvirus som kallas polyomavirus, som också är nära släkt med den välkända gruppen humana papillomvirus (HPV) [1, 2]. Till polyomavirusfamiljen hör exempelvis apviruset, simianvirus 40 (SV40), och musviruset murint polyomavirus (MPyV); båda dessa virus är idag mycket välstuderade experimentellt. Deras genom består av dubbelsträngat cirkulärt DNA på cirka 5 000 baspar, vilket trots sin ringa storlek kodar för 6 proteiner.

Genomet hos polyomavirus (och papillomvirus, se nedan) delas funktionellt i dels en tidig region och en sen region utifrån vilken del som kodas först, dels en regulatorisk region. Den tidiga regionen kodar för 2–3 tumörantigener (de s k T-antigenerna), vilka också utgör tumörspecifika transplantationsantigener [3]. Det numera välkända cellulära tumör-suppressornproteinet p53 upptäcktes då det visade sig binda till det stora T-antigenet på SV40. Många betydelsefulla transkriptionsfaktorer, dvs de DNA-bindande proteiner som reglerar DNA-transkription, upptäcktes också genom studier av den regulatoriska regionen hos dessa tumörvirus [1, 2].

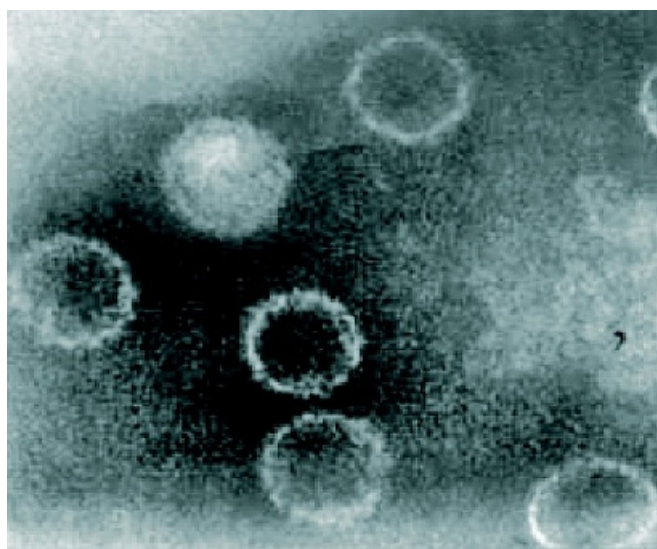
Sist, men inte minst, har forskning på kapsidproteiner och viruslika partiklar (VLP) lett till framgångsrika försök att vaccinera med HPV-VLP mot HPV-infektion och förhoppningsvis även mot livmoderhalscancer [4, 5].

Vi vill här beskriva en utvecklingslinje inom VLP-forskningen, vilken innefattar vaccination mot även andra tumörformer.

Viruslika partiklar bildas spontant

Muspolyomavirusets hölje består av proteinet VP1 och två mindre proteiner, VP2 och VP3, som alla tre kodas av virusets sena region [1]. Redan 1978 visade man att framrenat VP1 spontant formade »viruslika partiklar«, som elektronmikroskopiskt ser ut som vanliga viruspartiklar (Figur 1) [6]. VP2 och VP3, som finns på insidan av VP1, visade sig inte vara nödvändiga för uppbyggnaden av viruskapsiden.

Olika forskargrupper har senare visat att när VP1 produceras i jäst- eller insektsceller bildas VLP spontant i cellkärnorna och kan sedan renas fram från dessa.



Figur 1. Viruslika partiklar (VLP) är lovande kandidater för cancervaccin; elektronmikroskopiskt ser de ut som vanliga viruspartiklar.

Det var denna erfarenhet och dessa tekniker som överfördes till forskning på HPV [7]. Kapsidproteinet L1 från HPV bildar nämligen också VLP, och dessa används idag för att vaccinera mot HPV-infektion och livmoderhalscancer (se nedan) [4, 5].

Humana papillomvirus i 100-tals varianter

Det finns över 100 olika HPV-typer. Några HPV-typer (t ex HPV1, 2 och 4) ger upphov till vanliga hudvårtor, medan andra HPV-typer (HPV 6 och 11) ger upphov till papillom och kondylom [2]. Dessutom finns HPV-typer (t ex HPV16, 18, 31 och 33) som klassificeras som »onkogena« HPV, och dessa förekommer i maligna tumörer. Mest känt är förekomst av onkogena HPV i cervixcancer, men närvaro av HPV i andra tumörer i anogeni-

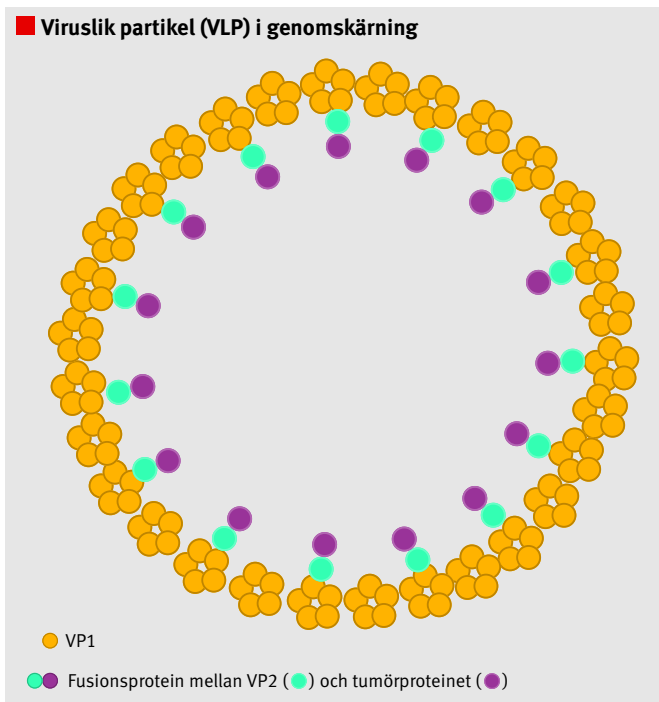
SAMMANFATTAT

Flera studier har visat att det går att vaccinera mot humant papillomvirus (HPV) med s k viruslika partiklar (VLP) från HPV.

Förhoppningarna är stora att prevention av HPV-infektion också leder till skydd mot HPV-associerad livmoderhalscancer.

Vi visar här att VLP kan förhindra uppkomst av andra tumörer.

VLP har använts för att immunisera mot protoonkogenen Her2 i två experimentella tumörssystem. Her2-VLP-vaccin skyddar mot ett inokulat med Her2-positiva tumörceller. Dessutom skyddar Her2-VLP-vaccin mot utveckling av Her2-positiv bröstcancer i transgena möss, som normalt utvecklar bröstcancer i alla 10 bröstkörtlar före 15 veckors ålder.



Figur 2. Stiliserad genomskärning av en viruslik partikel (VLP) med fusionsprotein mellan VP2 och ett tumörprotein (VP = viruspartikelns strukturprotein).

tal- och huvud-halsregionen har uppmärksamats alltmer på senare tid [8, 9].

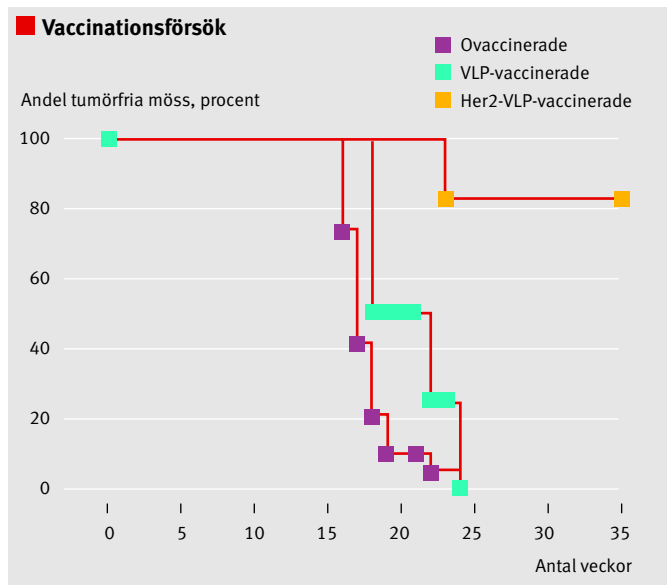
Alla HPV, med virushöljen på cirka 52–55 nm, har dubbelsträngat cirkulärt DNA på cirka 7 000 baspar, funktionellt indelat i en tidig, en sen och en regulatorisk region. Den tidiga regionens gener E1, E2 och E4–E7 är viktiga för HPV:s patogenes och transformerande förmåga. Hos »onkogena« HPV-typer binder E6 till p53 och E7 till pRB, båda välkända tumörsuppressorsproteiner. Genom dessa interaktioner med cellulära proteiner medverkar E6 och E7 till att förhindra cellens reglering av cellcykeln, vilket i sin tur bidrar till tumörutvecklingen. Den sena regionens gener kodar för proteinerna L1 och L2 i viruskapsiden; L1 är det dominerande proteinet.

I likhet med VP1 hos polyomavirus kan L1 bilda virushöljen av sig själv [7]. Det är bl a denna förmåga som utnyttjats i samband med vaccintillverkning av preventiva vacciner mot HPV16 [4].

Vaccin mot cervixcancer, kanske även tonsillcancer

Flera studier av framgångsrik vaccination med HPV-VLP mot infektion av vissa HPV-typer har nu rapporterats [4, 5, 10]. I en av dessa studier vaccinerades unga kvinnor (medianålder 20 år) vid tre tillfällen med exempelvis vaccin innehållande HPV6-, 11-, 16- och 18-VLP [6]. Kvinnorna följdes upp till tre år efter vaccinationen med serologi och gynekologisk provtagning. Resultaten visade entydigt att VLP-vaccination signifikant minskade risken för infektion med ovan nämnda HPV-typer.

Liknande resultat påvisas i andra studier. Stora förhoppningar finns därmed att vaccin mot vissa HPV-typer (t ex HPV16 och 18) också ska kunna förhindra utveckling av cervixcancer, där sambandet mellan förekomst av HPV och tumörutveckling är bäst etablerat. Eftersom det emellertid också finns ett samband mellan HPV-infektion och annan cancer (se ovan), är det möjligt att indikationerna för vaccination mot HPV utvidgas. HPV-vaccination skulle i framtiden t ex innefatta inte bara patienter med risk för cervixcancer utan även patienter med risk för ton-



Figur 3. Vaccination av 6 veckor gamla möss med viruslika partiklar (VLP) innehållande tumörproteinet Her2 ger skydd mot utveckling av bröstcancer under resten av deras livstid; detta är en musstam där alla honor annars får bröstcancer i samtliga bröstkörtlar. VLP utan Her2 skyddar däremot inte.

sillcancer, där omkring hälften av all cancer också är HPV-positiv [8].

För framtida generationer är således preventiv vaccination mot exempelvis HPV16 och andra onkogena HPV-typer att föredra. Preventiv HPV-vaccination måste dock följas upp, eftersom eliminering av vissa HPV-typer kan leda till att andra HPV-typer kan sprida sig – med fortsatt risk för tumörutveckling.

VLP som vaccin mot olika tumörtyper

Det finns ytterligare användningsområden för VLP. De har exempelvis använts i försök till genterapi [11]. I vår grupp använder vi VLPs förmåga att transportera tumörproteiner till immunsystemets celler för att stimulera immunsystemet. Vårt mål är att på detta sätt utveckla ofarliga vacciner för att förebygga och behandla cancer. Vissa cancertyper känns igen av immunförsvaret. Cancercellerna kan i sådana fall exempelvis ha överproduktion eller förändringar av vissa proteiner som kan vara viktiga för tumörens tillväxt, och detta kan upptäckas av immunförsvaret [12].

Målet med vaccin och immunterapi mot cancer är i dessa fall att få igång och stärka kroppens immunsvaret riktat mot just dessa främmande/överproducerade proteiner. Kroppens eget immunsystem kan då ta död på cancercellerna. Ytterligare ett mål är att kunna förebygga cancer genom att på ett tidigt stadium vaccinera för att få ett skydd mot specifika tumörproteiner. Vi arbetar med VLP från murint polyomavirus (MPyV), som har förmågan att mycket effektivt gå in i celler även hos människa.

VLP kan erhållas genom att producera ett enda av virusets proteiner i insektsceller. Dessa VLP innehåller inget annat än

»Efter endast en vaccination får majoriteten av dessa möss ett fullständigt skydd mot bröstcancer ... VLP-vaccinet är bättre än något annat vaccin som testats på dessa möss ...«

TABELL I. Andel tumörfria möss efter inokulation av den Her2-positiva tumören D2F2/E2 i vaccinerade och ovaccinerade BALB/c-möss (musstam som D2F2/E2 kan växa i).

Immunogen	Andel tumörfria BALB/c-möss
Her2-VLP-vaccinerade ¹	26/30 (87 %)
VLP-vaccinerade kontroller ¹	2/30 (7 %)
Ovaccinerade kontroller	3/30 (10 %)

¹Vaccinerade en gång subkutan 14 dagar före tumörinokulation

virusproteinet och är därigenom helt ofarliga. Genom att koppla ett tumörprotein till ett annat av virusets proteiner (VP2) kan vi bilda VLP som även innehåller tumörproteinet (Figur 2) [13]. När VLP som innehåller tumörprotein ges till mus eller människa kan de effektivt gå in i exempelvis dendritiska celler, som är antigenpresenterande celler [14]; tumörproteinet bryts där ned för att upptäckas av immunförsvaret. Därigenom får man ett starkt immunförsvaret mot tumörproteinet.

Her2 – tumörprotein för immunterapi

Protoonkogenen Her2 (också känd som erbB2 och neu) är en av de fyra receptormedlemmarna i »epidermal growth factor receptor«(EGFR)-familjen [15]. När en ligand binder till en av dessa receptorer bildar de dimerer, och denna dimerisering initierar sedan en komplex signaleringskaskad som aktiverar cellproliferation. Her2-receptorer binder inte till liganderna själva utan bildar heterodimerer med andra Her2-receptorer.

Her2-signaleringsystemet är aktivt framför allt under den embryonala perioden, medan uttryck av Her2 i normal vävnad hos vuxna är mycket lågt [15]. Her2-genen är emellertid amplifierad i många tumörer, och detta leder till överuttryck av Her2-onkoproteinet. Detta överuttryck av Her2, som t ex förekommer vid 25 procent av all bröstcancer, är associerat med aggressiva tumörer och dålig prognos [16]. Dessutom har det föreslagits att Her2 kan vara en markör för tamoxifenresistens [17].

Eftersom Her2 är selektivt överuttryckt i cancervävnad kan

det vara ett lämpligt protein för immunterapi. Detta sistnämnda faktum stöds av att både Her2-specifika antikroppar och T-celler har visats förekomma naturligt hos patienter med Her2-positiva tumörer, vilket tyder på att Her2-positiva tumörer kan vara immunogena [18, 19].

VLP-Her2 skyddar mot Her2-positiva tumörer

Vi har tagit fram VLP som innehåller tumörproteinet Her2 och visat att dessa VLP mycket effektivt kan föra in Her2 i celler. Vi har använt dessa VLP för att vaccinera en musstam där alla honor får bröstcancer före 5 månaders ålder. Efter endast en vaccination får majoriteten av dessa möss ett fullständigt skydd mot bröstcancer (Figur 3), och VLP-vaccinet är bättre än något annat vaccin som testats på dessa möss [13].

Samma VLP-vaccin kan också framgångsrikt vaccinera möss mot utväxt av Her2-positiva tumörer (Tabell I).

Vi vidareutvecklar nu detta vaccin och producerar även VLP-innehållande andra tumörproteiner, varav en innehåller tumörproteinet PSA (prostata-specifikt antigen), som finns i prostatacancer. Andra grupper använder likartade experimentella system för att vaccinera mot melanom [20]. Här har man använt sig av chimeriska polyomaviruspentamerer, vilka uttrycker antingen en immundominant peptid från ovalbumin eller en peptid från tyrosinasrelaterat protein som vaccin. Vaccination med dessa polyomaviruspentamerer inducerar cytotoxiskt T-cellsvar mot ovan nämnda peptider och kan användas som terapeutiskt vaccin mot ett inokulat av melanom som uttrycker dessa peptider [20].

Både för prevention och cancerbehandling

Att tillverka effektiva, men samtidigt ofarliga vacciner är en förutsättning för vaccination mot cancer och tumörvirus. VLP har stora möjligheter att bli användbara inte bara för prevention av livmoderhalscancer utan även vid behandling av ett antal olika cancersjukdomar.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

- Cole CN, Conzen SD. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology, 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Williams; 2001. p. 2141-74.
- Howley PM. Papillomaviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, editor. Fields virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1996. p. 947-78.
- Dalianis T. Studies on the polyoma virus tumor-specific transplantation antigen (TSTA). Adv Cancer Res. 1990;55:57-85.
- Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, et al. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. Lancet. 2004;364:1757-65.
- Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, et al. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. Lancet Oncol. 2005;6:271-8.
- Brady JN, Consigli RA. Chromatographic separation of the polyoma virus proteins and renaturation of the isolated VP1 major capsid protein. J Virol. 1978;27:436-42.
- Kirnbauer R, Taub J, Greenstone H, Roden R, Durst M, Gissmann L, et al. Efficient self-assembly of human papillomavirus type 16 L1 and L1-L2 into virus-like particles. J Virol. 1993;67:6929-36.
- Dahlstrand HM, Dalianis T. Presence and influence of human papillomaviruses (HPV) in tonsillar cancer. Adv Cancer Res. 2005;93:59-89.
- zur Hausen H. Papillomavirus infections – a major cause of human cancers. Biochim Biophys Acta. 1996;1288:F55-78.
- Lehtinen M, Malm C, Apter D, Heikkilä R, Heino P, Rimpilä K, et al. Preventive vacciner mot papillomvirus och cervixcancer när snart kliniken. Läkartidningen. 2003;100:3408-12.
- Heidari S, Krauzewicz N, Kalantari M, Vlastos A, Griffin BE, Dalianis T. Persistence and tissue distribution of DNA in normal and immunodeficient mice inoculated with polyomavirus VP1 pseudocapsid complexes or polyomavirus. J Virol. 2000;74:11963-5.
- Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. Lancet. 1967;1:1171-4.
- Tegerstedt K, Lindencrona JA, Curcio C, Andreasson K, Tullus C, Fornio G, et al. A single vaccination with polyomavirus VP1/VP2Her2 virus-like particles prevents outgrowth of HER-2/neu-expressing tumors. Cancer Res. 2005;65:5953-7.
- Tegerstedt K, Andreasson K, Vlastos A, Hedlund KO, Dalianis T, Ramqvist T. Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically cross react with murine polyomavirus VP1 VLPs. J Gen Virol. 2003;84:3443-52.
- Waterfield MD. Epidermal growth factor and related molecules. Lancet. 1989;1:1243-6.
- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. Science. 1987;235:177-82.
- Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. J Natl Cancer Inst. 2003;95:353-61.
- Disis ML, Smith JW, Murphy AE, Chen W, Cheever MA. In vitro generation of human cytolytic T-cells specific for peptides derived from the HER-2/neu protooncogene protein. Cancer Res. 1994;54:1071-6.
- Pupa SM, Menard S, Andreola S, Colnaghi M. I. Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. Cancer Res. 1993;53:5864-6.
- Brinkman M, Walter J, Grein S, Thies MJ, Schulz TW, Herrmann M, et al. Beneficial therapeutic effects with different particulate structures of murine polyomavirus VP1-coat protein carrying self or non-self CD8 T cell epitopes against murine melanoma. Cancer Immunol Immunother. 2005;54:611-22.