



Oponentský posudek na disertační práci „Rekombinantní viry vakcínie určené pro nádorovou terapii: Analýza biologických a biochemických vlastností“

Mgr. Kamila Žůrková předkládá disertační práci na téma vakcinace proti nádorovému E7 antigenu papillomaviru HPV-16.

Disertace je sestavena jako soubor čtyř publikovaných článků opatřený úvodem a souhrnnou diskusí, včetně rozsáhlého seznamu literárních zdrojů (630 citací). Mgr. Žůrková je první autorkou tří z přiložených článků. Prezentované původní práce byly publikované během let 2007 – 2011 v recenzovaných časopisech s decentním impakt faktorem (1.2-2.4) (Neoplasma, Oncology Reports, Virology Journal). Práce byla provedena na oddělení Experimentální virologie Ústavu hematologie a krevní transfuze, které je renomovaným pracovištěm zabývajícím se problematikou papillomavirů a nádorů děložního čípku, pod vedením RNDr. Šárky Němečkové.

Autorka a spoluautoři uvedených prací měli za cíl vytvořit co nejúčinnější vakcínu proti karcinomům děložního čípku, které jsou způsobeny lidskými onkogenními papillomaviry. Tato vakcína by měla rozšířit účinek existujících preventivních vakcín a mít terapeutický vliv na již existující nádory. K tvorbě této vakcíny byly využívány rekombinanty viru vakcínie, který poskytuje výběr z řady existujících kmenů použitelných pro bezpečnou vakcinaci. Pro imunizaci byl zvolen antigen E7 z lidského papillomaviru 16 (HPV-16). E7 antigen byl pomocí rekombinace vložen do viru vakcínie nebo byl použit ve formě DNA vakcíny. Dříve bylo ukázáno, že vakcinace pomocí E7 antigenu vyvolávala u pacientek slabou cytotoxickou odpověď, relativně nízký titr protilátek a nepříliš výrazné změny klinických příznaků. Proto se autoři rozhodli využít při vakcinaci také geny pro pomocné molekuly vložené do viru vakcínie. Jednalo se o gen kódující GM-CSF (kolonie stimulující faktor pro granulocyty/makrofágy), gen pro Flt3 ligand (FL) a gen pro solubilní receptor typu II pro TGF- β (sT β RII) fúzovaný s Fc fragmentem a fragmentem genu Jun. GM-CSF i FL by měly podpořit aktivaci cytotoxických T buněk cílících E7 antigen, a tím i destrukci nádorové tkáně imunitním systémem. Gen pro sT β RII by měl potlačit nejen stimulační účinky TGF- β na růst nádoru, ale potlačit taktéž inhibici diferenciaci cytotoxických T buněk způsobenou TGF- β . Použité imunizační přístupy vyvolaly, byť částečné a přechodné, potlačení růstu nádorů při preventivní nebo léčebné vakcinaci. Poslední článek se zabývá replikační schopností *in vitro* i *in vivo* jednoduchých rekombinant viru vakcínie obsahujících FL a proteinovým složením jejich virových partikulí.

K vlastnímu obsahu předkládané disertační práce nemám zásadnější připomínky, jen několik drobnějších poznámek:

Literární přehled je dobře zpracovaný, obsahuje kapitoly věnující se různým tématům obsaženým v práci. Do tohoto přehledu poznatků by bylo vhodné zařadit celistvou kapitolu o dendritických buňkách, jejichž problematika je pojednána na různých místech. Pro větší názornost by si tato úvodní část zasloužila více obrázků.

Kapitola 2.4.6. „Konstrukce rekombinantní vakcínie“ je spíše metodická a mohla by být zařazena až před přiložené články ve výsledkové části. Do stejného místa by bylo vhodné umístit informace o původu a vlastnostech použitých buněk TC-1 a TC-1/A9 a použitých virových kmenů MVA a P-13. Tyto informace jsou uvedeny v diskusí, myslím si však, že jsou pro čtenáře potřebné před vlastním seznámením se s dosaženými výsledky.



Ústav molekulární genetiky AV ČR, v.v.i.

Cíle práce jsou jasně definované a dosažené výsledky jsou přehledně shrnuty. Diskuse je odpovídající, srovnává výsledky se závěry získanými při testování protinádorových vakcín na jiných pracovištích.

Poznámky k formální části práce:

Zarazilo mě slovo „čelenž“ uvedené v diskusi v českém fonetickém znění, mám za to, že by bylo méně matoucí uvést anglický termín v uvozovkách „challenge“.

Čtení článků mi znepríjemnila nízká kvalita jejich vložených kopií – zejména obr.1 v kapitole 3.1 je zcela nečitelný.

Z konkrétních dotazů k obsahu práce by mě zajímalo:

1. Jaká je kinetika replikace živého kmene vakcínie P13 a jeho použitých jednoduchých a dvojitých rekombinant, především *in vivo*?
2. Jaká je intenzita a trvání exprese z jednotlivých použitých promotorů? Jsou silnější H5 a E/L promotory, které řídily expresi pomocných molekul, nebo 7.5k promotor, který řídil expresi E7 antigenu?
3. Jak byla určena exprese GM-CSF z rekombinantního replikačně nekompetentního viru vakcínie MVA?
4. Proč jsou účinky imunizace pouze přechodné, hlavně v případě použití GM-CSF, částečně též FL? Jde o nedostatečnou stimulaci imunitní odpovědi nebo naopak o její inhibici?
5. Vytváří se po imunizaci paměťové buňky proti E7 antigenu? Při použití FL studovali autoři produkci IFN γ po stimulaci antigenem E7 12 dní a 5 týdnů po imunizaci. Výsledky pro jednotlivé rekombinanty byly různé. Dochází také k vytvoření paměťových buněk reagujících na antigen viru vakcínie E3?
6. Při použití sT β IR jde o vyřazení negativního působení TGF β . Musí být tento blok dlouhodobý nebo stačí pouze krátkodobá a přechodná exprese sT β RII z rekombinanty viru vakcínie? Při použití sT β RII je také částečně účinná léčebná vakcinace, růst nádorů je pozdržen a obnoví se teprve 50 až 55 dní po vakcinaci. Nebylo by dalším přínosem použití dlouhodobější exprese sT β RII?
7. Co si autorka myslí o použití rekombinant viru vakcínie při přípravě protinádorových vakcín, které jsou založeny na dendritických buňkách aktivovaných *in vitro*?

Závěrem bych chtěla konstatovat, že disertační práce Mgr. Žůrkové dokládá její odbornou úroveň, schopnost samostatně pracovat a získávat nové vědecké poznatky. Při celkovém pohledu považuji předloženou disertaci za solidní příspěvek pro další studium protinádorových vakcín. Doporučuji, aby práce byla přijata jako podklad pro udělení titulu PhD.

V Praze dne 5. dubna 2011

Kateřina Trejbalová, PhD.