

Abstrakt

Modulace nádorového mikroprostředí představuje možnost, jak inhibovat růst nádorů a posílit protinádorovou imunitní odpověď. V předložené práci jsme použili pro modulaci nádorového mikroprostředí dvě strategie. Zaprvé, jsme zkonstruovali rVACV ko-exprimující tumor supresorový gen pro vazebný protein typu 3 pro růstové faktory podobné inzulinu (IGFBP-3) a gen kódující fúzní imunogen SigE7LAMP. Exprese IGFBP-3 byla řízena buď časným vakciovým promotorem H5 nebo syntetickým časně/pozdním (E/L) promotorem. Zjistili jsme, že exprese IGFBP-3 řízená H5 promotorem vede k produkci většího množství proteinu než exprese řízená E/L promotorem. Imunizace myši rVACV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 inhibovala růst nádorů TC-1 efektivněji než imunizace kontrolním virem P13-SigE7LAMP-TK⁻. Zároveň indukovala také silnější odpověď T-lymfocytů proti VACV antigenům. Pozorovali jsme, že vysoká exprese IGFBP-3 vedla ke zvýšení míry replikace viru a to jak *in vitro*, tak *in vivo*, což mělo za následek déletrvající antigenní stimulaci. Vysoká míra produkce IGFBP-3 rovněž korelovala s lepší adsorpcí viru P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 na buňky CV-1 v porovnání s P13-SigE7LAMP-TK⁻. Identifikovali jsme dva rozdíly ve struktuře IMV mezi viry P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 a P13-SigE7LAMP-TK⁻. IMV P13-SigE7LAMP-H5-IGFBP-3 do své struktury inkorporovaly protein IGFBP-3 a navíc obsahovaly větší množství fosfatidylserinu ve své vnější membráně, což pravděpodobně způsobilo zvýšený příjem těchto IMV buňkami prostřednictvím makropinocytózy. Pro měření obsahu PS jsme použili průtokovou cytometrii, kdy jsme purifikované viriony VACV imobilizovali pomocí protilátek na mikrokuličkách.

Zadruhé, jsme zkonstruovali DNA vakcínu proti asparaginylové endopeptidáze legumain, která je ve vysoké míře exprimována M2 polarizovanými TAM. Pro zvýšení efektivity DNA imunizace proti legumainu, jsme navrhli několik modifikací jeho aminokyselinové sekvence. Tyto zahrnovaly mutagenézi RGD motivu, která vedla k inhibici maturace legumainu a změnu v buněčné lokalizaci. Dále jsme provedli inzerci pomocného epitopu p30 odvozeného od tetanového toxinu, který je schopný aktivovat pomocné CD4⁺ T-lymfocyty. Obě použité modifikace signifikantně posílily imunitní odpověď proti legumainu. Jejich kombinace ovšem další signifikantní zvýšení nepřinesla. DNA vakcinace indukuje T_H1 i T_H2 odpověď, z nichž pouze T_H1 podporuje indukci protinádorové CD8⁺ CTL. Pro posílení T_H1 a CTL odpovědi jsme použili adjuvans CpG-ODN nebo depleci Treg pomocí protilátky proti CD25. Podání CpG-ODN nemělo žádný efekt. Deplece Treg ovšem signifikantně posílila imunitní odpověď indukovanou konstruktem LgmnRGG.TT11. Imunizace za použití LgmnRGG.TT11 byla schopna signifikantně inhibovat růst nádorů, ale neovlivnila tvorbu plicních metastáz ani počet TAM.