

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie

Charles University in Prague, Faculty of Science
Department of Genetics and Microbiology

Doktorský studijní program: Molekulární a buněčná biologie, genetiky a virologie

Ph.D. study program: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology

Autoreferát dizertační práce
Summary of the Ph.D. Thesis



**Studie vlivu imunologických adjuvans na experimentální
léčbu nádorů indukovaných HPV pomocí
rekombinantních VACV a DNA vakcín**

**Study of the effect of immunological adjuvants on
experimental treatment of HPV-induced tumors
by recombinant VACV and DNA vaccines**

MUDr. Pavel Gabriel

Školitel/Supervisor: RNDr. Šárka Němečková, DrSc

Praha, 2014

Doktorské studijní programy v biomedicině

*Univerzita Karlova v Praze
a Akademie věd České republiky*

Program: Molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie
Předseda oborové rady: Prof.RNDr.Stanislav Zadražil, DrSc

Školící pracoviště: Laboratoř rekombinačních vakcín
Oddělení experimentální virologie
Ústav hematologie a krevní transfuze
U Nemocnice 1, 128 20 Praha 2

Školitel: RNDr. Šárka Němečková, DrSc.

S disertací je možno se seznámit v příslušných knihovnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze.

OBSAH

1. SEZNAM ZKRATEK.....	3
2. ABSTRAKT.....	4
3. ÚVOD.....	5
4. CÍLE PRÁCE.....	6
5. MATERIÁL A METODIKA.....	6
6. VÝSLEDKY A DISKUZE.....	8
7. ZÁVĚRY.....	11
8. POUŽITÁ LITERATURA.....	22
CURRICULUM VITAE.....	23
VLASTNÍ PUBLIKACE.....	25

CONTENTS

1. LIST OF ABBREVIATIONS.....	3
2. ABSTRACT.....	13
3. INTRODUCTION.....	14
4. AIMS OF THE STUDY.....	15
5. MATERIALS AND METHODS.....	15
6. RESULTS AND DISCUSSION.....	17
7. CONCLUSIONS.....	20
8. REFERENCES.....	22
CURRICULUM VITAE	24
BIBLIOGRAPHY.....	25

1. SEZNAM ZKRATEK (LIST OF ABBREVIATIONS)

C57Bl/6	strain of laboratory mouse
CC	CC chemokine
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DNA	deoxyribonucleic acid
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethyl aminopropyl) carbodiimide
ELISA	enzyme-linked immunosorbent screening assay
ELISPOT	enzyme-linked immunosorbent spot assay
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HLA	human Leucocyte Antigen
HPV	Human papillomavirus
HPV16 E6 E7	oncoproteins E6, E7 encoded by HPV16
i.d	intra-dermal(y)
i.n.	intra-nasal(y)
i.p.	intra-peritoneal(y)
i.v.	intra-venous(y)
IFN	interferon
MHC	major histocompatibility complex
MIP	macrophage inflammatory protein 1 alpha
MVA	Modified Vaccinia virus Ankara
PCR	polymerase Chain Reaction
rVACV	recombinant Vaccinia Virus
SigE7GGGLAMP	fusion protein consisting of HPV16-E7 and signal sequence of LAMP1
TC-1	HPV16-E6, HPV16-E7 and H-ras transformed murine (C57Bl/6 mice) cell line
TC-1/A9	tumor cells characterized by expression of HPV16 oncogenes and downregulation of H-2b molecules
vCCI	viral CC-chemokine inhibitor, secreted protein of 35 kDa, expressed by most poxviruses, which binds CC-chemokines with high affinity
WT1	Wilms' tumor 1

2. ABSTRAKT

O úspěchu nádorové vakcíny rozhodují jak faktory související s vakcínou, které určují hlavní parametry účinné imunitní odpovědi, jako je její velikost a kvalita, tak faktory související s hostitelem představované imunosupresivními mechanismy, které umožňují nádoru uniknout rozeznání imunitním systémem nebo negativně ovlivňují funkci efektorových T-buněk.

V případě VACV může v současnosti, kdy je z důvodů bezpečnosti dávána přednost oslabeným nereplikujícím se virům, nastat problém s jejich nedostatečnou imunogenností. Proto jsou vyvíjeny pomocí delecí neesenciálních genů vakcinační vektory na bázi oslabených rVACV schopných replikace, které navozují silnou imunitní odpověď. Za účelem eliminace vlivu imunosupresivních mechanismů nádorů jsou do vektorů vnášeny geny pro různá imunologická adjuvans (např. geny pro cytokiny, či kostimulační molekuly).

První část práce popisuje naše studium vlivu vCCI na biologické vlastnosti rVACV odvozených z kmene Praha. Při testování delečních a inzerčních mutant vCCI exprimujících s nádorem asociovaný protein HPV16 E7 jsme zjistili, že secernovaný vCCI atenuuje virus *in vivo*, což korelovalo se sníženou hladinou odpovídajících CC chemokinů v krvi při porovnání s rodičovským virem. Hodnocení specifické CTL odpovědi metodou ELISPOT IFN- γ ukázalo, že imunogennost rVACV produkujícího sekreční vCCI je podobná jako rodičovského viru nebo delečních mutant. Imunizace rekombinantním virem produkujícím sekreční vCCI měla nižší léčebný účinek proti nádorům TC-1. Virový CCI snížil E7 specifickou odpověď navozenou imunizací biobalistickou metodou „gene gun“ DNA vakcínami pBSC-SigE7 LAMP a pBSC-vCCI.

Druhá část práce popisuje naše studium vlivu GM-CSF na imunizaci myší vysoce imunogenními DNA vakcínami při jeho lokální produkci virem MVA injikovaným do nádorů se sníženou expresí molekul MHC I. Dvě dávky DNA vakcíny v kombinaci s nejméně dvěma po sobě jdoucími i.t. dávkami MVA-GM-CSF byly schopné signifikantně inhibovat růst nádorů. Při analýze buněčné imunitní odpovědi vůči proteinu HPV16 E7 metodou ELISPOT IFN- γ , jsme zjistili, že *in situ* exprese genu GM-CSF nezvýšila systémovou E7 specifickou T buněčnou odpověď. Dále jsme zjistili, že lokální injekce MVA-GM-CSF způsobily zvýšení počtu intratumorálních CD3 + T buněk a že DNA vakcinace vedla ke zvýšení exprese molekul MHC typu I na nádorových buňkách *in vivo*.

Závěrečná část práce obsahuje popis přípravy linie modelových nádorových buněk vhodných pro testování různých metod imunoterapie nádorů exprimujících WT1.

3. ÚVOD

Přes významné pokroky v terapii jsou maligní onemocnění stále předním celosvětovým zdravotním problémem, který vyžaduje, pro získání optimálních výsledků, zavedení nových léčebných postupů (Vergati et al., 2010). V současnosti je proto věnována velká pozornost imunoterapii, která by, v případě účinnosti, byla schopná aktivovat imunitní systém pacienta a využít jeho obranné schopnosti k eliminaci nádoru.

Významnou podskupinou této léčby je aktivní imunoterapie nádorů, reprezentovaná nádorovými vakcínami, jejichž cílem je navození specifické imunitní odpovědi proti tumor specifickým antigenům (TSA) a antigenům asociovaným s nádory (TAA) (Vergati et al., 2010). VACV má pro užití v podobě terapeutické nádorové vakcíny mnohé příznivé vlastnosti. Díky úspěšné aplikaci a významné charakterizaci během celosvětového programu eradikace pravých neštovic (Fenner, 1989) společně s rozvojem strategií pro vytváření rekombinantních virů, které efektivně exprimují cizí proteiny, se z VACV stal velice slibný vakcinační vektor (Paoletti, 1996). Nevýhodou kmenů používaných k vymýcení neštovic byl bohužel vzácný výskyt závažných komplikací po očkování (Lane et al., 1969).

Činnost oddělení Experimentální virologie ÚHKM je dlouhodobě zaměřena na imunoterapii transplantovaných nádorů exprimujících onkoproteiny HPV16 E6 a E7 pomocí rVACV. Naší snahou je získat bezpečný, oslabený virus navozující účinnou protinádorovou imunitní reakci, který by byl současně schopný působit proti imunosupresivnímu mikroprostředí uvnitř nádoru. V rámci vytyčeného cíle jsou studovány různé neesenciální geny ovlivňující virulenci viru, jako např. geny pro imunomodulátory interferující s imunitní odpovědí hostitele nebo tzv. geny hostitelského spektra, či geny pro různé cytokiny a růstové faktory. Některé z produktů těchto genů jsou pro své pozitivní působení v rámci protinádorových vakcín nazývány imunologická adjuvans. Mezi ně můžeme řadit také cytokin GM-CSF a solubilní inhibitor CC chemokinů (vCCI). Vzhledem k velkému vlivu CC chemokinů na indukci imunity navozené virem a na formování imunosupresivního prostředí nádoru jsme vytvořili rekombinantní viry s různými formami genu vCCI.

Tato práce popisuje konstrukci vektorů na bázi rVACV a DNA vakcín obsahujících imunologická adjuvans GM-CSF a vCCI a následné testování jejich biologických vlastností, především imunizačních schopností a protinádorových účinků. Součástí práce je dále popis přípravy linie modelových nádorových buněk vhodných pro testování různých metod imunoterapie nádorů exprimujících WT1.

4. CÍLE PRÁCE

- 1) Stanovení vlivu vCCI na biologické vlastnosti rVACV
 - Vytvoření a *in vitro* a *in vivo* charakterizace rekombinantních virů
 - Testování imunogennosti a protinádorového účinku vektorů s různými formami vCCI
- 2) Studium vlivu různých rekombinant viru vakcinie exprimujících GM-CSF podaných různou cestou na protinádorový efekt navozený DNA vakcinací
 - Testování vlivu lokálně exprimovaného GM-CSF po intratumorální aplikaci MVA-GM-CSF na imunoterapii DNA vakcínou
- 3) Příprava transgenní leukemické nádorové linie stabilně exprimující WT1 antigen

5. MATERIÁL A METODIKA

Plazmid pD357 určený k delecí vCCI genů z viru vakcinie jsme získali od Dr. Patela z MRC Virology Unit, University of Glasgow. Rekombinační plazmidy pD357-Rev. s genem pro vCCI a pD357-Rev+Sig., s genem pro sekreční formu vCCI a expresní plazmid pBSC-Sig vCCI, který obsahoval stejný gen, jsme připravili pomocí základních metod práce s DNA podle manuálu „Molecular Cloning: A laboratory manual“ (Sambrook et al., 1989) a Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausbel et al., 1995). Správnost vytvořených konstruktů jsme ověřili sekvenováním.

Při přípravě rVACV založených na klonu P13 oslabeného vakcinačního kmene Praha, které exprimovaly různé formy vCCI a upravený nádorově specifický antigen E7GGG odvozený od HPV16 pod kontrolou časně-pozdního H5 promotoru, jsme prováděli rekombinaci a selekci podle standardních postupů (Mackett et al. 1984, Paoletti et al., 1984, Perkus et al., 1986). Správné rekombinanty jsme identifikovali metodou PCR. Produkci vCCI připravenými rVACV jsme detekovali western blotem a jeho schopnost vázat chemokin MIP-1 α pomocí pokusu se síťovacím činidlem EDC a MIP-1 α značeným radioaktivním ¹²⁵I.

Hladiny chemokinů a hladiny protilátek proti VACV v séru myší infikovaných VACV jsme analyzovali metodou ELISA. Množení virů jsme testovali po intraperitoneální inokulaci rVACV stanovením množství virové DNA v ováriích metodou real time PCR. Analýzu vlivu sekreční formy vCCI produkované virem P13-Sig-vCCI-E7GGG na imunitní buňky jsme prováděli barvením buněk izolovaných ze slezin imunizovaných myší monoklonálními protilátkami a následnou detekcí povrchových markerů definujících různé subpopulace

splenocytů průtokovou cytometrií.

Abychom zjistili vliv vCCI na navození E7 specifické CTL odpovědi v nepřítomnosti virové infekce imunizovali jsme myši proti E7 antigenu DNA vakcínami pBSC-SigE7LAMP a pBSC-vCCI či kontrolní pBSC , které byly podány biobalistickou metodou „gene gun“ .

Cytotoxická odpověď T lymfocytů (CTL) byla detekována metodou ELISPOT IFN- γ . Protinádorový efekt imunizace rVACV i DNA vakcínami proti TC-1 nádorům byl testován při terapeutickém a preventivním uspořádání.

Při studiu vlivu různých rVACV exprimujících GM-CSF podaných různou cestou na protinádorový efekt navozený DNA vakcinací jsme myši C57BL/6 s nádory TC-1/A9, které jsou charakterizovány expresí HPV16 onkogenů a sníženou expresí molekul H-2b (Smahel et al., 2003) imunizovali vysoce imunogenní DNA vakcínou E7GGG.GUS exprimující fúzní gen modifikovaného HPV16 E7 (E7GGG) s β -glukuronidázou E. coli (GUS) (Smahel et al., 2004) DNA vakcíny jsme také podali metodou “gene gun” 7. a 14. den po s.c. injekci nádorových buněk. Myšim byly podáno i.p., i.m. nebo i.t. injekcí 10^5 PFU P13-GM-CSF nebo 10^6 PFU MVA-GM-CSF v době první (event. i druhé) imunizace DNA vakcínou. Nejúčinnější intratumorální aplikaci jsme použili k zjišťování vlivu tohoto způsobu podání MVA-GM-CSF na imunoterapii chirurgicky vytvořené minimální reziduální nemoci TC-1/A9 nádorů, na specifickou E7 T buněčnou odpověď, kterou jsme detekovali metodou ELISPOT IFN- γ a na mikroprostředí nádoru, které jsme zkoumali analýzou buněčné skladby nádoru pomocí imunohistochemického barvení histologických řezů a pomocí průtokové cytometrie.

V průběhu přípravy transgenní leukemické nádorové linie stabilně exprimující WT1 antigen jsme při konstrukci plazmidu BK-CMV/WT1-321, který kódoval zkrácený a na C konci upravený WT1 použili základní metody práce s DNA jako při práci s vCCI. Finální plazmid byl překontrolován sekvenací. Dále byla zjišťována schopnost tohoto plazmidu navodit expresi zkonstruovaného proteinu. Plazmidem pBK-CMV/WT1-321 byly metodou kalcium fosfátové precipitace transfekovány buňky 293T. Jimi produkované proteiny byly analyzovány metodou western blot. Stejným plazmidem (jak v cirkulární, tak linearizované formě po naštěpení enzymem Alw44L/Apa LI) byly poté metodou elektroporace transfekovány nádorové buňky C1498. Získané klony byly nakonec testovány na přítomnost zkráceného WT1 metodami PCR a western blot.

6. VÝSLEDKY A DISKUZE

Abychom mohli studovat vliv vCCI na biologické vlastnosti VACV, připravili jsme z viru P13-E7GGG dvojnásobnou deleční mutantu viru (P13- Δ vCCI-E7GGG), kde byl gen pro vCCI v obou lokusech C23L/B29R nahrazen genem pro β -galaktosidásu. K rekombinaci jsme použili plazmid pD357. Aby bylo následně možné vytvořit revertantu tohoto viru RevP13- Δ vCCI-E7GGG, zkonstruovali jsme plazmid pD357-Rev. Při přípravě plazmidu pD357-Rev jsme provedli sekvenování genu pro vCCI. Srovnání N koncového úseku vCCI viru Praha 13 s aminokyselinovou sekvencí stejné oblasti vCCI dalších poxvirů prokázalo, že tento gen pro vCCI nekóduje 8 aminokyselin nezbytných pro funkci signální sekvence. Proto jsme zkonstruovali plazmid pD357-Rev+Sig., pomocí něhož jsme připravili virus P13-Sig-vCCI-E7GGG obsahující gen vCCI viru P13 s kompletní signální sekvencí vložený do obou lokusů C23L/B29R, který tak exprimoval sekreční formu vCCI

Protože se nám nepodařilo vCCI detekovat metodou western blot pomocí specifických králičích antisér, která nám laskavě poskytl Dr. Patel, rozhodli jsme se připravit vlastní specifické myší antisérum proti vCCI pomocí DNA imunizace. Za tím účelem jsme připravili expresní plasmid pBSC-Sig vCCI exprimující gen pro vCCI VACV kmenu Lister. Analýza produkce vCCI rVACV western blotem ukázala, že CV1 buňky infikované virem P13-Sig-vCCI-E7GGG produkovaly vCCI stejné velikosti jako virus LIVP. Při testování schopnosti vCCI vázat chemokin MIP-1 α pokusem se síťovacím činidlem vykazovaly chemokin vazebnou aktivitu pouze supernatanty buněk infikovaných virem P13-Sig-vCCI-E7GGG. Tyto výsledky ukazují, že prodloužení signální sekvence vCCI vedlo k produkci sekrečního vCCI. Při stanovení biologické aktivity sekreční formy vCCI produkované *in vivo* analýzou hladiny chemokinů v krvi myší infikovaných P13-Sig-vCCI-E7GGG metodou ELISA jsme zjistili, při porovnání se skupinou myší infikovaných virem P13-E7GGG, snížení hladiny chemokinů RANTES, Eotaxin, TARC a MDC. Testování virulence rVACV určením množení virů v ováriích myší po i.p. inokulaci viru pomocí stanovení množství virové DNA metodou real time PCR ukázalo, že virus Rev P13 Δ vCCI-E7GGG se v myších ováriích množí méně, než ostatní rVACV, což znamená, že produkce sekreční formy vCCI vedla k atenuaci P13 VACV *in vivo*. Toto zmenšené množení P13-Sig-vCCI-E7GGG korelovalo s tvorbou nižšího titru protilátek proti VACV u tohoto viru v porovnání rodičovským virem P13-E7GGG při testování 35. den po imunizaci.

Dále jsme se snažili zjistit, jestli imunita zaměřená proti vCCI může ovlivnit množení

viru P13-Sig-vCCI- E7GGG *in vivo*. Myši jsme nejdříve imunizovali pomocí biobalistické metody „gene gun“ plazmidem pBSC-Sig-vCCI a čtrnáct dní po poslední dávce jsme jim i.p. podali virus P13-Sig-vCCI-E7GGG. Třetí a čtvrtý den po infekci jsme jim odebrali ovária, ve kterých jsme metodou real time PCR stanovili množství virové DNA. Analýzou výsledků nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly mezi porovnávanými skupinami, z čehož vyplývá, že replikace rVACV *in vivo* nebyla ovlivněna specifickou imunitní odpovědí proti vCCI. Účinnost DNA vakcinace plazmidem pBSC-Sig-vCCI jsme potvrdili detekcí specifických protilátek proti vCCI western blotem v sérech jednotlivých imunizovaných myší. Při detekci E7 specifické CTL odpovědi metodou ELISPOT IFN- γ po infekci myší rVACV exprimujícími modifikovaný HPV16 E7 protein a různé formy vCCI jsme zjistili, že produkce sekreční formy vCCI nezvyšovala navozenou imunitní odpověď. Analýzou vlivu sekreční formy vCCI na imunitní buňky detekcí subpopulací splenocytů myší imunizovaných virem P13-Sig-vCCI- E7GGG nebyly při porovnání s rodičovským virem P13-E7GGG zjištěny signifikantní rozdíly. Při detekci E7 specifické CTL odpovědi metodou ELISPOT IFN- γ po imunizaci vakcínou pBSC-SigE7LAMP a 1 μ g nebo 2 μ g plazmidu pBSC-vCCI či kontrolního plazmidu pBSC, které byly podány metodou „gene gun“ jsme zjistili, že produkce sekreční formy vCCI plazmidem pBSC- vCCI nevedla, při porovnání s plazmidem pBSC, ke zvýšení, ale ke snížení specifické E7 specifické CTL odpovědi. Rozdíl byl statisticky signifikantní při podání 2 μ g plazmidu pBSC- vCCI. Snížení bylo závislé na dávce, protože přidání 2 μ g plazmidu pBSC-vCCI snížilo CTL odpověď více než přidání 1 μ g téhož plazmidu. Při testování vlivu produkce sekreční formy vCCI na protinádorový efekt imunizace proti TC-1 nádorům vykazoval virus P13-Sig-vCCI- E7GGG při porovnání s rodičovským virem P13-E7GGG horší výsledky jak při preventivním, tak při terapeutickém uspořádání pokusu. Vliv koexprese vCCI plazmidem pBSC-Sig-vCCI na navození protinádorového efektu DNA vakcínou pBSC-SigE7LAMP proti TC1 nemohl být, vzhled k výraznému protinádorovému efektu této vakcíny, v preventivním uspořádání pokusu hodnocen. V terapeutickém uspořádání pokusu jsme při porovnání vlivu plazmidu pBSC-Sig-vCCI s kontrolním pBSC mohli pozorovat mírné zlepšení protinádorového efektu. Ovšem při analýze výsledků nebyly zjištěny statisticky signifikantní rozdíly.

Při studiu vlivu rVACV exprimujících GM-CSF podaných i.p., i.m. nebo i.t. injekcí na protinádorový efekt navozený DNA vakcinací myši C57BL/6 s nádory TC-1/A9 se sníženou expresí molekul H-2b jsme zjistili, že podání nereplikujícího se MVA-GM-CSF vedlo k lepším výsledkům než použití replikujícího se P13-GM-CSF. Při porovnávání tří různých cest podání viru byl nejvyšší účinek pozorován u opakovaných i.t. injekcí MVA-GM-CSF.

Také v jiných studiích byla protinádorová účinnost GM-CSF nejvyšší při jeho podání do mikroprostředí nádorů, kde měl vliv na aktivační stav antigen prezentujících buněk v regionálních lymfatických uzlinách (Kass et al., 2001), (Vuylsteke et al., 2004). Podobně GM-CSF tvořený po i.t. injekci MVA-GM-CSF působil pouze lokálně, protože nebyl schopen zvýšit odpověď E7 specifických T buněk navozených DNA vakcínou, kterou jsme testovali metodou ELISPOT IFN- γ . Dvě dávky DNA vakcíny v kombinaci s nejméně dvěma po sobě jdoucími i.t. aplikacemi MVA-GM-CSF byly schopné signifikantně inhibovat růst nádorů. Při studiu vlivu lokální aplikace MVA-GM-CSF na imunoterapii chirurgicky navozené minimální reziduální nemoci TC-1/A9 nádorů pomocí DNA vakcinace jsme zjistili, že i.t. podání MVA-GM-CSF zlepšuje imunoterapii minimální reziduální nemoc. TC-1/A9 nádorů. Tyto výsledky nás vedly k úvaze, že role MVA-GM-CSF při lokální terapii TC-1/A9 nádorů může spočívat v úpravě nádorového mikroprostředí. Při analýze buněčné skladby TC-1/A9 nádoru léčených kombinací DNA vakcíny s i.t. aplikovaným MVA-GM-CSF pomocí imunohistochemického barvení histologických řezů jsme detekovali menší oblasti se zvýšeným množstvím CD3+ T buněk. Při analýze buněčné skladby TC-1/A9 nádoru léčených stejnou kombinací pomocí průtokové cytometrie jsme detekovali opět pouze statisticky signifikantně větší množství CD3+ pozitivních buněk. Při analýze exprese MHCI molekul na povrchu buněk izolovaných z nádorů TC-1/A9 léčených kombinací DNA vakcíny s i.t. aplikovaným MVA-GM-CSF jsme pozorovali zvýšení exprese MHCI u všech skupin, kterým byla aplikována DNA vakcína. I.t. podání MVA-GM-CSF nemělo na expresi MHCI vliv.

Prvním krokem přípravy transgenní leukemické nádorové linie stabilně exprimující WT1 antigen, která měla vzniknout z myší buněčné linie myelomonocytární leukemie C1498 byla příprava plazmidu pBK-CMV/WT1-321 s genem pro WT1. Tento plazmid kóduje zkrácenou formu myšího WT1 genu, která postrádá 121 aminokyselin na C konci. Vzniklému proteinu tak chybí DNA vazebná doména, jejíž vinou by mohly modelové nádorové buňky produkující WT1 podléhat apoptóze. Na nově vytvořený C konec jsme přidali gen pro oligopeptid FLAG, aby byl zkrácený WT1 snadno detekovatelný pomocí odpovídající protilátky. Při analýze proteinů produkovaných buňkami 293T po transfekci plazmidem pBK-CMV/WT1-321 metodou western blot byly detekovány proteiny správné velikosti. Stejným plazmidem (jak v cirkulární, tak linearizované formě po naštěpení enzymem Alw44L/Apa LI) byly poté metodou elektroporace transfekovány nádorové buňky C1498. Při testování klonů, které byly jako pozitivní vybrány metodou PCR, na přítomnost zkráceného WT1 western blotem bohužel nebyl u žádného z těchto klonů nalezen protein správné velikosti.

7. ZÁVĚRY

V rámci obou projektů této práce byl testován vliv imunologických adjuvans na navození protinádorového účinku prostřednictvím rVACV. V případě manipulace s genem vCCI mohl být vzhledem k jeho funkci chemokin vazebného imunomodulačního proteinu předpokládán vliv jak na úrovni viru, tak na úrovni mikroprostředí nádoru, jehož imunosupresivní vlastnosti mohl, díky své schopnosti vázat chemokiny CCL2 a CCL5, pozitivně ovlivnit.

Při studiu genu vCCI byly sestrojeny deleční mutanty pro gen vCCI VACV kmenu P13. Dále byly připraveny revertanty s opět vloženým genem vCCI. Protože sekvenace N-konce genu vCCI kmenu Praha prokázala nepřítomnost funkční signální sekvence, byly zkonstruovány revertní viry s vloženými nasyntetizovanými oligonukleotidy, čímž byla obnovena funkční signální sekvence. Produkce proteinu vCCI a jeho chemokin vazebná aktivita byla ověřena western blotem a experimentem s použitím MIP-1 α ¹²⁵I a síťovacího činidla.

Během testování schopnosti jednotlivých rVACV produkujících různé formy proteinu vCCI navodit protinádorový efekt proti TC-1 nádorům při preventivním a terapeutickém uspořádání experimentu, nebyly mezi jednotlivými rekombinantami zjištěny signifikantní rozdíly. Tento závěr koreloval s výsledky zjištěnými analýzou specifické buněčné imunity proti proteinu HPV E7 testované metodou ELISPOT IFN- γ a barvení pomocí tetrameru, kde také nebyly mezi jednotlivými rekombinantami zjištěny signifikantní rozdíly. Odpovídající korelace nebyla zjištěna ani při analýze populací splenocytů pomocí průtokové cytometrie.

Viry produkující sekreční formu vCCI byly analýzou množství virové DNA v ováriích infikovaných myší a titrem specifických antiVACV protilátek v séru charakterizovány jako atenuované. Současně měly srovnatelné imunizační schopnosti.

Pomocí experimentu srovnávajícího imunogennost rekombinant kódujících různé formy genu vCCI po imunizaci DNA vakcínou pBSCvCCI nebyl prokázán vliv imunity proti tomuto proteinu na imunizační vlastnosti virů. Vzhledem k nízkým hladinám proteinu vCCI dosaženým pomocí rVACV nebyl předpokládán jeho vliv na nádorové mikroprostředí.

Aplikace DNA vakcíny exprimující sekreční formu genu vCCI vSigCCI vedla k indukci slabší specifické imunity měřené metodou ELISPOT IFN- γ při společné imunizaci s plazmidem, který expimoval gen SigE7LAMP. Velikost tohoto efektu byla závislá na množství DNA vakcíny. Při tomto způsobu imunizace ovšem došlo k mírnému zesílení protinádorového účinku proti TC-1 nádorům, a to jak při preventivním, tak při terapeutickém

uspořádání experimentu. Vzhledem k teoretické představě o působení vCCI na součásti imunity (vazba CCL2 a CCL5 chemokinů) během navození protinádorové imunitní reakce, lze předpokládat vliv na imunosupresivní prostředí nádoru.

Při kombinované imunoterapii nádorů TC-1/A9 s nižší expresí MHCI pomocí DNA vakcíny pBSC/E7.GGG.GUS, aplikované metodou „gene gun“ a doprovázené injekcí rVACV exprimující GM-CSF, jež byly podány různými způsoby (i.n., i.p., i.t.), byla jako nejúčinnější vzhledem k dosaženému protinádorovému efektu vyhodnocena terapie DNA vakcínou spojená s opakovaným podáním MVA-GM-CSF do nádoru.

V rámci analýzy buněk nádorů bylo zjištěno pouze vyšší procento CD3+ T buněk infiltrujících nádor, což pozitivně korelovalo s podáním viru MVA-GM-CSF do nádoru a vyšší expresí MHCI nádorovými buňkami.

Společným cílem obou projektů bylo ověření vlivu imunologických adjuvans na protinádorové vlastnosti VACV a DNA vakcín použitých pro imunoterapii nádorů indukovaných papilomaviry.

Ukázalo se, že jak protein vCCI, tak lokálně exprimovaný GM-CSF mohou působit jako imunologická adjuvans posilující protinádorový efekt. Jejich úspěšné použití je však omezeno vedlejšími účinky, jako je např. navození inhibice účinku GM-CSF imunosupresivními T buňkami, které budou muset být brány v potaz při budoucích výzkumech.

Výsledky práce vytvářejí prostor pro další výzkumy s použitými adjuvans. Cílené zásahy do procesu navození imunitní reakce prostřednictvím proteinů vCCI a GM-CSF, které by byly doprovázeny důkladnou analýzou probíhajících procesů obzvláště metodami umožňujícími dynamické zobrazování *in vivo*, jako je např. dvoufotonová mikroskopie, by mohly přispět k lepšímu pochopení vztahu výsledného efektu se sledovanými parametry imunity (Deguine et al., 2010). Tyto metody mohou podpořit další zkoumání patogeneze virové infekce, interakce viru s imunitou hostitele, či mechanismu navození protivirové a protinádorové imunity. Tak by mohly být v budoucnu konstruovány vakcíny, které by definovanými zásahy do imunity navozovaly požadované efekty.

2. ABSTRACT

The success of cancer vaccines depends on factors associated with the vaccine, which define the main parameters of effective immune responses such as its size and quality, as well as on factors related with the host, represented by the immunosuppressive mechanisms that allow the tumor to escape recognition by the immune system or negatively influence the function of effector T-cells.

In the case of VACV attenuated, non-replicating viruses are at present preferred for safety reasons. A problem may arise concerning their lack of immunogenicity. Through the deletions of non-essential genes, vaccination vectors are therefore developed based on attenuated rVACV capable of replication, which induce a strong immune response. Genes of various immunological adjuvants (e.g., genes for cytokines and costimulatory molecules) are inserted into the vectors for the purpose of eliminating the influence of the immunosuppressive mechanisms of tumors.

The first part of the work describes our study of the influence of vCCI on biological properties of rVACV derived from the Prague strain. Testing of vCCI deletion and insertion mutants expressing tumor associated protein HPV16 E7 has shown that secreted vCCI attenuated the virus *in vivo*, which correlated with reduced levels of the corresponding CC chemokines in the blood compared with the parental virus. Examination of the specific CTL response by ELISPOT IFN- γ method showed that the immunogenicity of the rVACV producing secretory vCCI was similar to that of the parental virus or deletion mutant in the C23L/B29R locus. Immunization with the secretory vCCI-producing recombinant virus had a lower therapeutic effect against TC-1 tumors. Viral CCI downregulated the E7-specific response induced by gene-gun-mediated immunization with the DNA vaccines pBSC-SigE7 LAMP and pBSC-vCCI.

The second part of the work describes our study of the influence of GM-CSF on the immunization of mice with highly immunogenic DNA vaccines in the course of its local production by MVA virus injected into tumors with reduced expression of MHC molecules. Two doses of the DNA vaccine in combination with at least two consecutive i.t. doses of MVA-GM-CSF were able to inhibit significantly the growth of tumors. The analysis of the cellular immune response to HPV16 E7 protein by ELISPOT IFN- γ revealed that the *in situ* expression of GM-CSF gene did not enhance systemic specific T cell response to E7. Furthermore we found that the local injections of MVA-GM-CSF induced an increase of intratumoral CD3 + T cell counts and that the DNA vaccination resulted in up-regulation of MHC type I molecules on tumor cells *in vivo*. The final part of the work contains a description of the preparation of the model line of cancer cells suitable for testing different methods of immunotherapy of tumors expressing WT1 antigen.

3. INTRODUCTION

Despite the significant advances in therapy, malignant diseases are still the leading worldwide health problem that requires, in order to obtain optimal results, the introduction of new therapeutic procedures (Vergati et al., 2010). Attention is therefore currently paid to immunotherapy, which, if found efficient, would be able to activate the patient's immune system and make use of its defense capabilities for the elimination of tumor.

An important subset of this treatment is the active immunotherapy of tumors, represented by tumor vaccines whose aim is to induce a specific immune response against tumor specific antigens (TSA) and antigens associated with tumors (TAA) (Vergati et al., 2010). VACV has many properties favorable for its application in the form of therapeutic cancer vaccine. Thanks to its successful and considerable characterization during the global smallpox eradication program (Fenner, 1989), together with the development of strategies for the creation of recombinant viruses which effectively express foreign proteins, VACV has become a very promising vector (Paoletti, 1996). A disadvantage of the strains used for smallpox eradication was unfortunately the rare occurrence of serious complications following the vaccination (Lane et al., 1969).

The work of the Department of Experimental Virology, IHBT, is in the long term focused on immunotherapy of transplanted tumors expressing oncoproteins HPV16 E6 and E7 with rVACV. Our aim is to acquire a safe, attenuated virus inducing an effective anticancer immune response that would be able to simultaneously act against the immunosuppressive microenvironment inside the tumor. The objectives include the study of different non-essential genes that affect virus virulence, such as the genes for immunomodulators interfering with the immune response of the host, or so-called host range genes, or genes for various cytokines and growth factors. For their positive effect within the anticancer vaccines, some of the products of these genes are called immunological adjuvants. Among them we can also place the cytokine GM-CSF and the soluble inhibitor of CC Chemokines (vCCI). Due to the large influence of CC chemokines on the induction of immunity induced by the virus and the formation of the immunosuppressive tumor environment we have created recombinant viruses with different forms of the vCCI gene.

This work describes the construction of vectors based on rVACV and DNA vaccines containing the immunological adjuvants GM-CSF and vCCI, and the subsequent testing of their biological properties, particularly immunization efficiency and anticancer effects. Part of the work is a description of the preparation of the model line of cancer cells suitable for testing different methods of immunotherapy of tumors expressing WT1 antigen.

4. AIMS OF THE STUDY

- 1) Determination of the influence of vCCI on biological properties of rVACV formation and *in vitro* and *in vivo* characterization of recombinant viruses
 - testing of immunogenicity and anticancer effect of vectors with different forms of vCCI
- 2) Study of the influence of different recombinant vaccinia virus expressing GM-CSF administered in different ways on the antitumor effect induced by DNA vaccinations
 - testing of the impact of locally expressed GM-CSF after intratumoral application of MVA-GM-CSF on immunotherapy with DNA vaccines
- 3) Creation of transgenic leukemic cancer lines stably expressing WT1 antigen

5. MATERIALS AND METHODS

The pD357 plasmid for the deletion of vCCI gene from the vaccinia virus was obtained from A. Patel from the MRC Virology Unit, University of Glasgow. Recombination plasmids pD357-Rev with the gene for vCCI and pD357-Rev+Sig with the gene for the secretory form of vCCI, and the expression plasmid pBSC-Sig vCCI which contained the same gene were prepared using the basic methods of work with DNA, according to the manual "Molecular Cloning: A laboratory manual" (Sambrook et al., 1989) and Current Protocols in Molecular Biology "(Ausbel et al., 1995). The accuracy of generated constructs has been verified by sequencing.

In the course of preparation of rVACV based on P13 clone of attenuated vaccination strain Prague, which expressed various forms of vCCI and modified tumor specific antigen E7GGG derived from HPV16 under control of the early-late H5 promoter, we carried out recombination and selection according to standard procedures (Mackett et al. 1984, Paoletti et al., 1984, Perkus et al., 1986) Correct recombinants were identified by PCR.

The production of vCCI by prepared rVACV was detected by western blot and its ability to bind chemokine MIP-1 α by using a crosslinking experiment with EDC and MIP-1 α marked with radioactive ¹²⁵I. The levels of chemokines and levels of antibodies against VACV in sera of mice infected with VACV were analyzed by ELISA. The multiplication of viruses was tested after intraperitoneal inoculation of rVACV by determining the amount of viral DNA in mouse ovaries using real time PCR. Analysis of the influence of the secretory form of vCCI produced by P13-Sig-vCCI-E7GGG virus on immune cells was carried out by staining cells isolated from spleens of immunized mice with monoclonal antibodies, and subsequent detection of surface markers that define the different subpopulations of splenocytes using flow cytometry.

To determine the effect of vCCI on induction of the E7-specific CTL response in

the absence of virus infection, we immunized mice against E7 antigen with DNA vaccines pBSC-SigE7LAMP and pBSC-vCCI or control pBSC by a gene gun. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) response was detected by ELISPOT IFN- γ . Anti-tumor effect of immunization with rVACV and DNA vaccines against TC-1 tumors was tested in therapeutic and preventive arrangements of the experiment.

In the course of study of the influence of different rVACV expressing GM-CSF administered in different ways on the anti-tumor effect of DNA vaccines we immunized C57BL/6 mice bearing TC-1/A9 tumors, which are characterized by expression of HPV16 oncogenes and downregulated expression of molecules of H-2b (Smahel et al., 2003), with the highly immunogenic DNA vaccine E7GGG.GUS expressing the fused gene of modified HPV16 E7 (E7GGG) with β -glucuronidase of *E. coli* (GUS) (Smahel et al., 2004). DNA vaccines were also administered by gene gun on days 7 and 14 after s.c. injection of tumor cells. Mice were given i.p., i.m. or i.t. injections of 10^5 PFU P13-GM-CSF or 10^6 PFU MVA-GM-CSF at the time of the first (and second) immunization with the DNA vaccine. The most effective intratumoral application was used for determination of the impact of i.t. MVA-GM-CSF administration on the immunotherapy of surgically induced minimal residual disease of TC-1/A9 tumors on the E7 specific T cell response, which was detected by ELISPOT IFN- γ , and on tumor microenvironment, which was examined by the analysis of tumor cellular composition by immunohistochemical staining of histological sections and by flow cytometry.

Basic methods of work with DNA, such as those used when working with vCCI, were used during the preparation of transgenic tumor lines stably expressing WT1 antigen for the construction of the plasmid BK-CMV/WT1-321, which encoded shortened WT1 modified at the C end. The final plasmid was checked by sequencing. The ability of this plasmid to induce the expression of the constructed protein was further detected. 293T cells were transfected with plasmid pBK-CMV/WT1-321 by the method of calcium phosphate precipitation. The proteins produced by the cells were analyzed by western blotting. C1498 tumor cells were then transfected by the same plasmid (in both the circular and the linearized form after cutting with enzyme Alw44L/Apa) by electroporation. The clones so obtained were finally tested for the presence of WT1 gene by PCR and western blotting.

6. RESULTS AND DISCUSSION

In order to study the influence of vCCI on biological properties of VACV, double deletion mutants of P13-E7GGG virus were prepared (P13- Δ vCCI-E7GGG), where the vCCI was replaced in both loci C23L/B29R with the gene for β -galactosidase. We used the pD357 plasmid for recombination. To prepare the revertant of this virus (RevP13- Δ vCCI-E7GGG), we generated the pD357-Rev plasmid. The sequencing of the vCCI gene was done during the creation of the pD357-Rev plasmid. The comparison of the N end of vCCI of the Prague 13 virus with the amino acid sequence of the same vCCI area from other poxviruses revealed that this gene for vCCI does not encode the 8 amino acids necessary for the function of the signal sequence. Therefore we constructed the pD357-Rev+Sig plasmid, whereby we prepared a P13-Sig-vCCI-E7GGG virus carrying the vCCI gene of P13 virus with complete signal sequences inserted in both loci C23L/B29R, which expressed the secreted vCCI.

Because we failed to detect vCCI by western blot with specific rabbit antisera that were kindly provided by Dr. Patel, we decided to prepare our own specific mouse antisera against vCCI using DNA immunization. For this purpose we have prepared the expression plasmid pBSC-Sig vCCI expressing the vCCI gene from VACV strain Lister. Analysis of the production of vCCI by western blotting showed that CV1 cells infected with the virus P13-Sig-vCCI-E7GGG produced vCCI of the same size as did the LIVP virus. Testing of the ability of the vCCI to bind the MIP-1 chemokine by a cross-linking experiment showed a chemokine binding activity only in the case of supernatants from cells infected with the P13-Sig-vCCI-E7GGG. These results show that extension of the signal sequence of vCCI led to the production of secretory vCCI. In the course of determination of biological activity of secretory form of vCCI produced *in vivo* by ELISA analysis of the amount of chemokines in the blood of mice infected with the P13-Sig-vCCI-E7GGG, we found reduced levels of chemokines RANTES, Eotaxin, TARC and MDC after comparison with the group of mice infected with the P13-E7GGG,. Testing of the rVACV virulence by determining the virus multiplication in mouse ovaries after i.p. inoculation of the virus via an assessment of viral DNA using real time PCR showed that the virus RevP13 Δ vCCI- E7GGG multiplies in mouse ovaries to a lesser extent than the other rVACVs, which means that the production of the secretory form of vCCI led to attenuation of the P13 VACV *in vivo*. This reduced multiplication of the P13-Sig-vCCI-E7GGG correlated with the formation of a lower titer of anti-VACV antibodies when compared with parental P13-E7GGG virus in testing on day 35 after the immunization.

We also tried to determine whether the immunity against vCCI may affect the propagation of the virus P13-Sig-vCCI-E7GGG *in vivo*. First we immunized mice by a gene gun with the pBSC-Sig-vCCI plasmid and, fourteen days after the last dose, we administered i.p the P13 Sig-vCCI-E7GGG virus. On the third and fourth day after the infection we dissected the ovaries, in which we determined the amount of viral DNA by real time PCR. Analysis of the results showed no statistically significant differences between the compared groups, implying that the rVACV replication *in vivo* is

not affected by the specific immune responses toward vCCI. Efficiency of DNA vaccination with the pBSC-Sig-vCCI plasmid was confirmed by the detection of specific antibodies against vCCI by western blotting in sera of immunized mice.

The detection of E7-specific CTL responses by ELISPOT IFN- γ after infecting the mice with rVACV expressing modified HPV16 E7 protein and various forms of vCCI revealed that the production of secretory form of vCCI had not increased the induced immune response. Analysis of the effect of the secretory form of vCCI on the immune cells via the detection of splenocyte subpopulations of mice immunized with virus P13-Sig-vCCI-E7GGG showed no significant differences when compared with the parental virus P13-E7GGG.

During the detection of E7-specific CTL responses by ELISPOT IFN- γ after immunization with the pBSC-SigE7LAMP vaccine and 1 μ g or 2 μ g of the pBSC-vCCI plasmid or the control pBSC plasmid by a gene gun, we found that the production of the secretory form of vCCI by the pBSC-vCCI plasmid did not increase E7-specific CTL responses but reduced them, in comparison with the pBSC plasmid. The difference was statistically significant after the administration of 2 μ g of the pBSC-vCCI plasmid. The reduction was dose dependent, because addition of 2 μ g of the pBSC-vCCI plasmid reduced CTL response more than the addition of 1 μ g of the same plasmid.

Testing of the impact of production of the secretory form of vCCI on the antitumor effect of immunization against TC-1 tumors with the P13-Sig-vCCI-E7GGG virus showed worse results in both the preventive and the therapeutic arrangement of the experiment when compared with the parental virus P13-E7GGG. The influence of coexpression of vCCI by the pBSC-Sig-vCCI plasmid on induction of anticancer effect by the pBSC-SigE7LAMP DNA vaccine against the TC-1 cells could not be evaluated in the preventive arrangement of the experiment due to the significant antitumor effect of this vaccine. In the therapeutic arrangement of the experiment we could see, after comparison of the influence of the pBSC-Sig-vCCI plasmid with control pBSC, a slight improvement of the antitumor effect. However, analyzes of results did not show any statistically significant differences.

On studying the influence of rVACV expressing GM-CSF administered by i.p., i.m. or i.t. injections on the antitumor effect induced by the DNA vaccination of C57BL/6 mice with TC-1/A9 tumors characterized by reduced expression of molecules of H-2b, we found that the administration of nonreplicating MVA-GM-CSF led to better results than the use of replicating P13-GM-CSF. After comparing the three different routes of administration of the virus, the highest effect was observed after repeated i.t. injections of MVA-GM-CSF. Also in other studies the antitumor efficacy of GM-CSF was the highest after its administration into the tumor microenvironment, which had an effect on the activation status of antigen presenting cells in regional lymph nodes (Kass et al., 2001, Vuylsteke et al., 2004). Similarly, GM-CSF produced after i.t. injection of MVA-GM-CSF had only a local effect because it was not able to enhance the E7 specific T cell response induced by the DNA vaccine, which we tested by ELISPOT IFN- γ . Two doses of the DNA vaccine combined with at least two consecutive i.t. applications of MVA-GM-CSF were able to inhibit significantly the growth of tumors. During the

study of the influence of local administration of MVA-GM-CSF on the immunotherapy of surgically-induced minimal residual disease of TC-1/A9 tumors by the DNA vaccination we found that the i.t. administration of MVA-GM-CSF improved the immunotherapy of minimal residual tumor disease of TC-1/A9 tumors.

These results led us to the consideration that the role of MVA-GM-CSF in local therapy of TC-1/A9 tumors may consist in an alteration of the tumor microenvironment. Analysis of the cellular composition of TC-1/A9 tumors treated with a combination of DNA vaccines with i.t. applied MVA-GM-CSF using the immunohistochemical staining of histological sections led to the detection of distinct areas with increased counts of CD3 + T cells. During flow cytometric analysis of the cellular composition of TC-1/A9 tumors treated with the same combination, only statistically significantly greater amount of CD3 + positive cells was detected. Analysis of the expression of MHCI molecules on the surface of cells isolated from TC-1/A9 tumors treated with combination of DNA vaccines with i.t. applied MVA-GM-CSF showed an increased expression of MHCI by all groups to which the DNA vaccines have been administered. I.t. application of MVA-GM-CSF had no influence on MHCI expression.

The first step in the preparation of transgenic leukemic cancer lines stably expressing WT1 antigen, which should arise from the C1498 mouse cell line of myelomonocytic leukemia, was the creation of the C1498 pBK-CMV/WT1-321 plasmid with gene for WT1. This plasmid encodes a shortened form of the mouse WT1 gene that lacks 121 amino acids at the C end. Therefore the generated protein lacks the DNA binding domain through whose action the model tumor cells producing WT1 could succumb to apoptosis. To make truncated WT1 easily detectable by the corresponding WT1 antibodies, we added the gene for oligopeptide FLAG on the newly created C end. Proteins of the correct size were detected during the western blotting analysis of proteins produced by cells after transfection with the pBK 293T-CMV/WT1-321 plasmid. C1498 tumor cells were then transfected by the same plasmid (in both circular and linearized form after cutting with Alw44L/Apa enzyme) using electroporation. Western blotting testing of the clones that were previously selected by PCR as positive for the presence of truncated WT1, a protein of the correct size was unfortunately not found in any of these clones.

7. CONCLUSIONS

The influence of immunological adjuvants on the induction of an antitumor effect through rVACV has been tested in both projects of this work. In the case of manipulation with the vCCI gene could be presumed, due to its function of a chemokine binding immunomodulatory protein, influence both at the level of the virus and at the level of the tumor microenvironment, on whose immunosuppressive properties vCCI could have a positive effect thanks to its ability to bind the CCL5 and CCL2 chemokines. Deletion mutants of the vCCI VACV strain P13 gene were constructed in the study of the vCCI gene. Furthermore, revertants with reinserted vCCI gene were prepared. Because the sequencing of the N-end of the vCCI gene of the strain Praha demonstrated the absence of the functional signal sequence, revertant viruses with inserted synthesized oligonucleotides were constructed and the functional signal sequence was thus restored. The production of the vCCI protein and its chemokine binding activity was verified by western blotting and a cross-linking experiment with the use of MIP-1 α ¹²⁵I and a cross-linking agent.

During the testing of the capabilities of rVACV producing various forms of the vCCI protein to induce the antitumor effect against TC-1 tumors in preventive and therapeutic setting of the experiment, no significant differences between the recombinants have been detected. This conclusion correlated with the results obtained by analyzing the specific cellular immunity against HPV E7 protein tested by ELISPOT IFN- γ , where significant differences between particular recombinants were also not detected. The corresponding correlation was not found by flow cytometric analysis of splenocytes. Viruses producing the secretory form of vCCI were characterized by analyzing the quantity of the virus DNA in the ovaries of infected mice and by the detection of the titer of specific anti-VACV antibodies in sera as attenuated. At the same time they had similar immunization abilities.

The experiment comparing the immunogenicity of recombinants encoding different forms of the vCCI gene after immunization with the pBSCvCCI DNA vaccine did not demonstrate the effect of the immunity against this protein on immunization properties of viruses. Its effect on the tumor microenvironment was not expected due to low levels of the vCCI protein achieved by rVACV. The application of DNA vaccine expressing the secretory form of the vCCI gene vSigCCI led to induction of weaker specific immunity, as measured by the ELISPOT IFN- γ during immunization with plasmid that expressed the SigE7LAMP gene. The size of this effect was dependent on the amount of DNA vaccine. However, a slight reinforcement of the anticancer effect against TC-1 tumors both in preventive and therapeutic setting of the experiment occurred within the application of this method of immunization. An impact on the immunosuppressive environment of the tumor can be expected based on the theoretical notion about the effect of vCCI on the components of immunity (binding of CCL2 and CCL5 chemokines) during induction of antitumor immune responses.

Due to the antitumor effect achieved, DNA vaccine therapy associated with repeated administration of MVA-GM-CSF into the tumor was evaluated as the most effective during combined

immunotherapy of TC-1/A9 tumors having lower expression of MHCI with DNA vaccines pBSC/E7.GGG.GUS applied by a gene gun and accompanied by injection of rVACV expressing GM-CSF, administered via different routes (i.n., i.t., i.p.).

Analysis of tumor cells has shown only a higher percentage of CD3+ T cells infiltrating the tumor, which positively correlated with the administration of the virus MVA-GM-CSF into the tumor and higher expression of MHCI by tumor cells.

The common goal of both projects was the verification of the influence of immunological adjuvants on antitumor properties of VACV and DNA vaccines used for immunotherapy of tumors induced by Papillomaviruses.

It turned out that both the vCCI protein and locally expressed GM-CSF may act as immunological adjuvants reinforcing the antitumor effect. Their successful use, however, is limited by side effects such as induced inhibition of GM-CSF effect by immunosuppressive T cells, that will have to be taken into account in future research.

The results of this work open a space for more research with the adjuvants under study. Targeted interventions in the process of inducing immune responses through proteins vCCI and GM-CSF, which would be accompanied by a thorough analysis of the ongoing processes, particularly by the methods allowing dynamic imaging *in vivo* such as two photon microscopy, could contribute to a better understanding of the relationship between the resulting effect and tracked immunity parameters (Deguine et al., 2010). These methods can support further exploration of the pathogenesis of viral infections, interaction of the virus with the host immunity or the mechanism of induction of antiviral and antitumor immunity. In the future this could facilitate the construction of vaccines that would induce desirable effects by defined interventions in immunity.

8. POUŽITÁ LITERATURA (REFERENCES)

1. Deguine, J., Breart, B., Lemaitre, F., Di Santo, J. P., Bousso, P., 2010. Intravital imaging reveals distinct dynamics for natural killer and CD8(+) T cells during tumor regression. *Immunity*. 33, 632-644.
2. Fenner, F., 1989. Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res.Virol.* 140, 465-466.
3. Kass, E., Panicali, D. L., Mazzara, G., Schlom, J., Greiner, J. W., 2001. Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor produced by recombinant avian poxviruses enriches the regional lymph nodes with antigen-presenting cells and acts as an immunoadjuvant. *Cancer Res.* 61, 206-214.
4. Lane, J. M., Ruben, F. L., Neff, J. M., Millar, J. D., 1969. Complications of smallpox vaccination, 1968. *N.Engl.J.Med.* 281, 1201-1208.
5. Paoletti, E., 1996. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93, 11349-11353.
6. Smahel, M., Pokorna, D., Mackova, J., Vlasak, J., 2004. Enhancement of immunogenicity of HPV16 E7 oncogene by fusion with *E. coli* beta-glucuronidase. *J.Gene Med.* 6, 1092-1101.
7. Smahel, M., Sima, P., Ludvikova, V., Marinov, I., Pokorna, D., Vonka, V., 2003. Immunisation with modified HPV16 E7 genes against mouse oncogenic TC-1 cell sublines with downregulated expression of MHC class I molecules. *Vaccine* 21, 1125-1136.
8. Vergati, M., Intrivici, C., Huen, N. Y., Schlom, J., Tsang, K. Y., 2010. Strategies for cancer vaccine development. *J.Biomed.Biotechnol.* 2010.
9. Vuylsteke, R. J., Molenkamp, B. G., Gietema, H. A., van Leeuwen, P. A., Wijnands, P. G., Vos, W., van Diest, P. J., Scheper, R. J., Meijer, S., de Gruijl, T. D., 2004. Local administration of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor increases the number and activation state of dendritic cells in the sentinel lymph node of early-stage melanoma. *Cancer Res.* 64, 8456-8460.

CURRICULUM VITAE

- Adresa zaměstnavatele:** Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení experimentální virologie
U Nemocnice 2094/1 , 128 20, Praha 2
- Jméno:** MUDr. Pavel Gabriel
Datum narození: 26.2.1969
Telefon: +420 221 977 389
E-mail: pavel.gabriel@uhkt.cz
Vzdělání
- 2006 – dosud Přírodovědecká fakulta UK, Praha
- doktorské studium biomedicíny (kombinovaná forma)
- studijní program: molekulární a buněčná biologie, genetika a virologie
- 1998 – 2006 Přírodovědecká fakulta UK, Praha
- externí postgraduální doktorandské studium - obor virologie (nedokončeno)
- 1987 – 1995 1.lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze
- Pracovní zkušenosti**
1997 – dosud Ústav hematologie a krevní transfuze
Oddělení experimentální virologie
- Účast na projektech:
- Využití dendritických buněk infikovaných atenuovanými rekombinačními viry vakcinie k imunizaci
 - Imunizace proti nádorům vyznačujícím se různými únikovými mechanismy
 - Kombinovaná imunoterapie nádorů vyvolaných lidským papillomavirem
 - Faktory virulence viru vakcinie a jejich role při indukci buněčné imunity
 - Vektory pro genovou terapii zacílenou na buňky stromatu pevných nádorů
 - Vývoj experimentální vakcíny proti WT 1 k imunoterapii nádorů

CURRICULUM VITAE

Name: MUDr. Pavel Gabriel
Birth date: 26.2.1969
Affiliation: Department of Experimental Virology
Institute of Hematology and Blood Transfusion
U Nemocnice 1, 128 20 Prague 2, Czech Republic
Phone: +420 221 977 389
Email: pavel.gabriel@uhkt.cz

Education:

2007 - Doctoral PhD study, Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague, programme: Molecular and Cellular Biology, Genetics and Virology
1998 – 2006 Postgraduate PhD study, Faculty of Natural Sciences, Charles University, Prague, section: Virology (not finished)
1987 – 1995 First Faculty of Medicine, Charles University in Prague

Working experience:

1997- Institute of Hematology and Blood Transfusion, Department of Experimental Virology, Prague, Czech Republic

Participation in Projects:

- The application of dendritic cells infected with attenuated recombinant vaccinia viruses for immunization
- Combined therapy of metastasising tumours induced by HPV 16 E8/E7 and ras oncogene
- Immunization against Tumors Characterized by Different Escape Mechanisms
- Factors of virulence of vaccinia virus and their role in induction of cell mediated immunity
- Vectors for gene therapy targeted on stromal cells of solid tumors
- Experimental vaccines against WT1 for immunotherapy of tumors

VLASTNÍ PUBLIKACE (BIBLIOGRAPHY)

Publikace, které jsou podkladem dizertace (List of publications involved in the PhD. Thesis)

- 1) **GABRIEL, P.**; BABIAROVA, K.; ZURKOVA, K.; KRYSTOFOVA, J.; HAINZ, P.; KUTINOVA, L.; NEMECKOVA, S. Chemokine binding protein vCCI attenuates vaccinia virus without affecting the cellular response elicited by immunization with a recombinant vaccinia vector carrying the HPV16 E7 gene. *Viral immunology*. 2012, vol. 25, no. 5, s. 411-422. , IF: 1.750, rok: 2012
- 2) NEMECKOVA, S.; SMAHEL, M.; HAINZ, P.; MACKOVA, J.; ZURKOVA, K.; **GABRIEL, P.**; INDROVA, M.; KUTINOVA, L. Combination of intratumoral injections of vaccinia virus MVA expressing GM-CSF and immunization with DNA vaccine prolongs the survival of mice bearing HPV16 induced tumors with downregulated expression of MHC class I molecules. *Neoplasma*. 2007, vol. 54, no. 4, s. 326-333., IF: 1.208, rok: 2007

Publikace bez vztahu k tématu dizertace (List of publications not related to PhD. Thesis)

- 1) POKORNÁ, D.; POLÁKOVÁ, I.; KINDLOVÁ, M.; DUŠKOVÁ, M.; LUDVÍKOVÁ, V.; **GABRIEL, P.**; KUTINOVÁ, L.; MÜLLER, M.; ŠMAHEL, M. Vaccination with human papillomavirus type 16-derived peptides using a tattoo device. *Vaccine*. 2009, vol. 27, no. 27, s. 3519-3529., IF: 3.616, rok: 2009
- 2) MACKOVA, J.; STASIKOVA, J.; KUTINOVA, L.; MASIN, J.; HAINZ, P.; SIMSOVA, M.; **GABRIEL, P.**; SEBO, P.; NEMECKOVA, S. Prime/boost immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. *Cancer Immunology and Immunotherapy*. 2006, vol. 55, no. 1, s. 39-46., IF: 4,313, rok: 2006
- 3) MACKOVA, J.; KUTINOVA, L.; HAINZ, P.; KRYSTOFOVA, J.; SROLLER, V.; OTÁHAL, P.; **GABRIEL, P.**; NEMECKOVA, S. Adjuvant effect of dendritic cells transduced with recombinant vaccinia virus expressing HPV16-E7 is inhibited by co-expression of IL12. *International journal of oncology*. 2004, vol. 24, no. 6, s. 1581-1588., IF: 3.056, rok: 2004
- 4) NĚMEČKOVÁ, Š.; HAINZ, P.; OTÁHAL, P.; **GABRIEL, P.**; ŠROLLER, V.; KUTINOVÁ, L. Early gene expression of vaccinia virus strains replicating (Praha) and non-replicating (modified vaccinia virus strain Ankara, MVA) in mammalian cells. *Acta Virologica*. 2001, vol. 45, no. 4, s. 243-247., IF: 0,644, rok: 2001
- 5) NĚMEČKOVÁ, Š.; KUTINOVÁ, L.; HAINZ, P.; ŠUBRTOVÁ, J.; OTÁHAL, P.; **GABRIEL, P.** Virus vakcinie jako vektor pro transdukcii dendritických buněk. *Časopis lékařů českých*. 2002, roč. 141, č. S1, s. 23-25., IF: 0,0

Plakátová sdělení (Poster presentations)

- 1) BABIAROVÁ, K.; KUTINOVÁ, L.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P.; **GABRIEL, P.**; MUSIL, J.; NĚMEČKOVÁ, Š. Nová experimentální vakcína proti WT1 pro imunoterapii nádorů. [Prezentováno: *Pražský hematologický den 2011*. Praha, 13.10.2011.].
- 2) BABIAROVÁ, K.; KUTINOVÁ, L.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P.; **GABRIEL, P.**; MUSIL, J.; NĚMEČKOVÁ, Š. Nová experimentální vakcína proti WT1 pro imunoterapii nádorů. [Prezentováno: *V. Bratislavské hematologické a transfuziologické dni s mezinárodní účastí*. Bratislava, 20.-22.10.2012.].
- 3) **GABRIEL, P.**; BABIAROVÁ, K.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P.; KUTINOVÁ, L.; NĚMEČKOVÁ, Š. Chemokine binding protein of vaccinia virus enhances therapeutic immunization against HPV16E6/E7 expressing tumors. [*4th European congress of virology*. Cernobbio, Italy, 7.-11.4.2010].
- 4) LUČANSKÝ, V.; SOBOTKOVÁ, E.; TACHEZY, R.; DUŠKOVÁ, M.; BABIAROVÁ, K.; MOCOVA, K.; MACKOVÁ, J.; **GABRIEL, P.**; SUTTNAR, J.; KUTINOVÁ, L.; ŠMAHEL, M.; NĚMEČKOVÁ, Š.; VONKA, V. DNA vaccines against bcr-abl-transformed cells. [*15th world congress on advances in oncology and 13th international symposium on molecular medicine*. Loutraki, Greece: Medical School University of Crete, 2009]
- 5) BABIAROVA, K.; MOCOVA, K.; KUTINOVA, L.; HAINZ, P.; **GABRIEL, P.**; KRYSTOFOVA, J.; NEMECKOVA, S. Deletion of viral 3-(beta)-hydroxysteroid dehydrogenase (3beta HSD) enhances the immunogenicity of MVA virus. 2008. [*17th international poxvirus and iridovirus conference*. Grainau (Bavaria): Paul-Ehrlich-Institut, 2008,]
- 6) NĚMEČKOVÁ, Š.; KUTINOVÁ, L.; ŽŮRKOVÁ, K.; HAINZ, P.; BABIAROVÁ, K.; **GABRIEL, P.**; KRYŠTOFOVÁ, J. Faktory virulence viru vakcinie a jejich role při indukci buněčné imunity. [*24. kongres Československé společnosti mikrobiologické*. Liberec(CZ), 2.10.-5.10.2007].
- 7) NEMECKOVA, S.; MACKOVA, J.; STASIKOVA, J.; KUTINOVA, L.; MASIN, J.; HAINZ, P.; SIMSOVA, M.; **GABRIEL, P.**; SEBO, P. Experimental immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and vaccinia virus MVA. [*22nd international papillomavirus conference and clinical workshop*. Vancouver: UCSF, 2005]
- 8) MACKOVÁ, J.; STAŠÍKOVÁ, J.; KUTINOVÁ, L.; MAŠÍN, J.; HAINZ, P.; ŠIMŠOVÁ, M.; **GABRIEL, P.**; ŠEBO, P.; NĚMEČKOVÁ, Š. Použití adenylát cyklázy CyaA Bordetelly pertussis a viru MVA v imunoterapii nádorů indukovaných lidským papillomavirem 16 u myšního modelu. [*Virus a buňka : genetická konference*. Praha, PřF UK(CZ), 1.-2.2.2005]

- 9) MOCO VÁ, K.; LUČANSKÝ, V.; KUTINOVÁ, L.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P.; **GABRIEL, P.**; RITTICH, Š.; LESNÁ, D.; SOBOTKOVÁ, E.; ŠMAHEL, M.; VONKA, V.; NĚMEČKOVÁ, Š. Využití rekombinantního viru vakcínie a DNA vakcín v imunizaci proti Bcr-Abl, onkogenu chronické myeloidní leukémie. [*Virus a buňka : genetická konference*. Praha, PŘF UK(CZ), 1.-2.2.2005]
- 10) NEMEČKOVA, S.; SMAHEL, M.; HAINZ, P.; MACKOVA, J.; **GABRIEL, P.**; KUTINOVA, L. Simultaneous intratumoral injection of vaccinia virus MVA expressing GM-CSF and immunisation with DNA vaccine delivered by gene gun prolong the survival of mice carrying HPV16 induced tumors with down-regulated expression of MHC class I molecules. [*13th annual congress of the European society of gene therapy* Prague: ESGT, 2005]
- 11) NĚMEČKOVÁ, Š.; KUTINOVÁ, L.; MACKOVÁ, J.; ŠROLLER, V.; **GABRIEL, P.**; OTÁHAL, P.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P. Anti-cancer immunity induced by recombinant vaccinia virus with deletion of genes responsible for virus immune evasion. [*XVth international poxvirus and iridovirus conference*. Oxford: Keble College, 2004]
- 12) MACKOVA, J.; STASIKOVA, J.; KUTINOVA, L.; MASIN, J.; HAINZ, P.; SIMSOVA, M.; **GABRIEL, P.**; SEBO, P.; NEMEČKOVA, S. Immunotherapy of HPV16-induced tumors with E7 protein delivered by Bordetella adenylate cyclase and modified vaccinia virus Ankara. [*Vaccines 3 : frontiers in vaccine development*. Paris: Institut Pasteur, 2004]
- 13) MACKOVÁ, J.; NĚMEČKOVÁ, Š.; KUTINOVÁ, L.; KRYŠTOFOVÁ, J.; HAINZ, P.; OTÁHAL, P.; ŠROLLER, V.; **GABRIEL, P.** The effects of gene deletions in recombinant vaccinia virus (rVV) genome on anticancer immunity induced by rVV based vaccine. [*14th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Prague / Czech Republic, May 1–4, 2004*]
- 14) NEMEČKOVA, S.; KUTINOVA, L.; OTÁHAL, P.; SUBRTOVA, J.; **GABRIEL, P.**; HAINZ, P. Immunotherapy with dendritic cells infected with recombinant vaccinia viruses expressing HPV16 E7LAMP gene. [*HPV vaccines and immunotherapies : symposium* , Cambridge: Robinson College University of Cambridge, 2003]
- 15) ŠUBRTOVÁ, J.; KUTINOVÁ, L.; HAINZ, P.; ŠROLLER, V.; OTÁHAL, P.; **GABRIEL, P.**; NĚMEČKOVÁ, Š. Co-expression of interleukin 12 affects immunogenicity of recombinant vaccinia virus producing modified E7 protein of human papillomavirus 16. [*Functional genomics and disease*. Praha: European Science Foundation, 2003]
- 16) **GABRIEL, P.**; SUBRTOVA, J.; KUTINOVA, L.; HAINZ, P.; SROLLER, V.; OTÁHAL, P.; NEMEČKOVA, S. Immunotherapy with dendritic cells infected with several modifications of recombinant vaccinia virus expressing HPV16E7. [*Biotherapy of cancer*. Munich: Ludwig-Maximilian University]

- 17) ŠUBRTOVÁ, J.; KUTINOVÁ, L.; HAINZ, P.; ŠROLLER, V.; OTÁHAL, P.; **GABRIEL, P.**; NĚMEČKOVÁ, Š. Rekombinantní virus vakcínie exprimující upravený protein E7 lidského papillomaviru 16 a interleukin-12 jako modelová vakcína proti nádorům vyvolaným papillomaviry. [*Sigma-Aldrich konference mladých chemiků, biochemiků a molekulárních biologů*. Devět Skal : Žďárské vrchy: Sigma-Aldrich, 2003]
- 18) NĚMEČKOVÁ, Š.; KUTINOVÁ, L.; OTÁHAL, P.; ŠUBRTOVÁ, J.; **GABRIEL, P.**; HAINZ, P. Anti-tumor immunity induced by dendritic cells infected with recombinant vaccinia virus expressing HPV16 E7 gene. [*7th international symposium on dendritic cells*. Bamberg: s.n, 2002]
- 19) **GABRIEL, P.**; HAINZ P.; OTÁHAL P.; SUBRTOVA J. AND NEMECKOVA S. Phenotypic and functional changes of mouse dendritic cells after infection with vaccinia virus: comparison of three different strains [6th International Symposium, Biological Therapy of Cancer, Munich, Germany, September 12-15, 2001]

Prezentace (Oral presentations)

- 1) Prezentace na konferencích PhD studentů ÚHKT na téma:
Studium genu pro inhibitor CC chemokinů 35k (CCI) [2010, 2011]
Konstrukce leukemické nádorové linie exprimující zkrácený WT1 protein [2012]
Studie vlivu imunologických adjuvans na experimentální léčbu nádorů indukovaných HPV pomocí rekombinantních VACV a DNA vakcín [2014]
- 2) **GABRIEL, P.** Study of the 35kDa CC-chemokine binding protein from VV [*Společná konference postgraduálních studentů projektu GAČR. Praha, 2008.*]
- 3) **GABRIEL, P.** First results of the 35kDa CC-chemokine binding protein from VV-LIVP investigation [*Společná konference postgraduálních studentů projektu GAČR. Praha, 2008.*].
- 4) **GABRIEL, P.** Construction and characterization of recombinant vaccinia virus with deletion and reinsertion of the gene encoding the 35kDa CC-chemokine binding protein. [*Společná konference postgraduálních studentů projektu GAČR. Praha, 6.6.2007.*]
- 5) **GABRIEL, P.** Reinsertion of the VV gene encoding the 35kDa CC-chemokine binding protein with 35k signal sequence from VV-Lister. [*Společná konference postgraduálních studentů projektu GAČR. Praha, 22.11.2007.*]
- 6) **GABRIEL, P.**; MACKOVÁ, J.; KUTINOVÁ, L.; HAINZ, P.; KRYŠTOFOVÁ, J.; ŠROLLER, V.; OTÁHAL, P.; NĚMEČKOVÁ, Š. Immunotherapy with dendritic cells infected with several modifications of recombinant vaccinia virus expressing HPV16E7. [*Molecules involved in carcinogenesis : workshop programme*. Slaný: British Council, 2005]