

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Hana Pilná

Experimentální a klinicky využitelné vakcíny na bázi viru vakcínie

Experimental and clinically used vaccines based on vaccinia virus

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Zora Mělková, Ph.D.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. května 2016

Podpis

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce MUDr. Zoře Mělkové, Ph.D. za cenné rady a poznámky při psaní této práce.

Abstrakt

Virus vakcinie (VACV) je obalený DNA virus patřící do rodu *Orthopoxviridae*. Jedná se o laboratorní virus, který nemá v přírodě známého přirozeného hostitele, a jehož přesný původ zůstává doposud neobjasněn. Jeho význam pro člověka je ovšem značný. V první řadě to byly právě různé kmeny VACV, které byly použity pro přípravu vakcín při eradikaci pravých neštovic. I dnes je vynakládáno nemalé úsilí na přípravu efektivnějších a bezpečnějších vakcín proti pravým neštovicím, a to mimo jiné kvůli stále existujícím obavám, že by variola virus – původce pravých neštovic - mohl být zneužit jako biologická zbraň. Pokrok v genovém inženýrství umožnil další využití potenciálu VACV jako vektoru, neboť VACV umožňuje inkorporaci cizorodé genetické informace a její exprese v hostiteli. Navíc se VACV replikuje výlučně v cytoplasmě, což snižuje riziko začlenění virové DNA do DNA hostitele. Tyto a další vlastnosti dělají z VACV ideálního kandidáta na vektor pro přípravu vakcín proti celé řadě heterologních infekčních a onkologických onemocnění. Tato práce podává přehled klinicky využívaných a některých experimentálních vakcín odvozených z VACV.

Klíčová slova: virus vakcinie, pravé neštovice, vakcíny, rekombinantní vakcíny, onkolytická terapie

Abstract

Vaccinia virus (VACV) is an enveloped DNA virus belonging in the *Orthopoxviridae* genus. It is a laboratory virus in which the natural host and exact origin remain unclear. However it is of great significance for human kind. First of all, different VACV strains were used for preparation of vaccines used in the smallpox eradication campaign. Even today a significant effort is made to prepare more efficient and safer vaccines against smallpox, namely because of still remaining concerns that variola virus – causative agent of smallpox – could be misused as a biological weapon. Advances in genetic engineering allowed use of VACV for additional purposes, namely as a vaccination and expression vector. VACV enables insertion of large pieces of foreign DNA into its genome and expression of this DNA in a host. Furthermore VACV replicates exclusively in a cytoplasm, decreasing a risk of incorporation of the viral DNA into the host genome. These and other features make VACV an ideal candidate as a vector for preparation of recombinant vaccines against various infectious and oncological diseases. This thesis provides a summary of both clinically used and experimental vaccines derived from VACV.

Key words: vaccinia virus, smallpox, vaccines, recombinant vaccines, oncolytic therapy

Obsah

Abstrakt

Obsah

Seznam zkratk

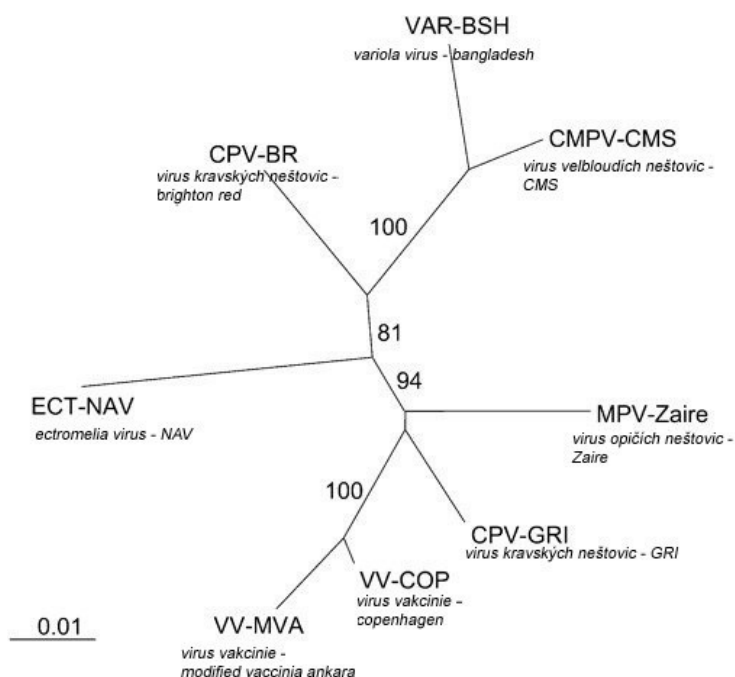
1	Úvod.....	1
2	Vakcíny proti pravým neštovicím a heterologním infekčním chorobám.....	3
2.1	První generace.....	3
2.2	Druhá generace	6
2.2.1	Vakcíny druhé generace proti pravým neštovicím	6
2.2.2	Vakcíny druhé generace proti heterologním chorobám	8
2.3	Třetí generace.....	9
2.3.1	Vakcíny třetí generace proti pravým neštovicím	9
2.3.2	Vakcíny třetí generace proti heterologním chorobám	11
2.4	Čtvrtá generace.....	13
3	Onkolytické vakcíny.....	17
4	Závěr.....	21
5	Literatura.....	22

Seznam zkratek

Zkratka	Význam česky	Význam anglicky
+	Pozitivní	Positive
AD	Atopická dermatitida	Atopic Dermatitis
AIDS	Syndrom získané imunodeficiency	Acquired Immune Deficiency Syndrome
CPV	Virus kravských neštovic	Cowpox virus
ECTV	Ektromelia virus	Ectromelia virus
GM-CSF	Faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
HBV	Virus hepatitidy B	Hepatitis B virus
HIV	Virus lidské imunodeficiency	Human Immunodeficiency Virus
IFN	Interferon	Interferon
Ig	Imunoglobulin	Immunoglobulin
IL	Interleukin	Interleukin
ITR	Invertované koncové repetice	Inverted terminal repeats
JX	Jennerex	Jennerex
MHC	Hlavní histokompatibilní komplex	Major Histocompatibility Complex
MHC II	MHC glykoprotein II	MHC glycoprotein II
MRC-5	Lidské plicní fibroblasty	Human lung fibroblasts
MVA	Modifikovaný virus vakcinie Ankara	Modified Vaccinia virus Ankara
NK buňky	"Přirození zabijáci"	Natural Killer cells
NYCBH	New York City Board of Health	New York City Board of Health
ORF	Otevřený čtecí rámeček	Open reading frame
PVE	Post vakcinační encefalitida	Post vaccination encephalitis
Serpin	Inhibitor serinových proteáz	Serine protease inhibitor
SIV	Virus opičí imunodeficiency	Simian Immunodeficiency Virus
Th	Pomocné T lymfocyty	Helper T lymphocytes
TK	Thymidin kináza	Thymidine kinase
TNF- α	Tumor-nekrotizující faktor- α	Tumor necrosis factor- α
VACV	Virus vakcinie	Vaccinia virus
VARV	Variola virus	Variola virus
VGf	Růstový faktor viru vakcinie	Vaccinia virus growth factor
WR	Western Reserve	Western Reserve

1 Úvod

Virus vakcinie (VACV) patří do rodu *Orthopoxviridae*. Orthopoxviry jsou obalené DNA viry s velkým genomem – průměrně 250 kbp. Strukturní proteiny jednotlivých orthopoxvirů jsou si vzájemně velmi podobné, což umožňuje imunizaci pomocí VACV proti dalším orthopoxvirovým infekcím. Dalšími zástupci tohoto rodu jsou variola virus (VARV) – původce pravých neštovic, virus opičích neštovic a v neposlední řadě virus kravských neštovic (CPV) – kmen původně použitý Jennerem při prvotní vakcinaci proti neštovicím. (Jacobs et al. 2009). Bez ohledu na to, jaký význam má VACV pro člověka, jeho původ zůstává nejasný. Teorií o původu VACV je několik. Dle jedné je VACV výsledkem rekombinace CPV a VARV (Bedson and Dumbell 1964), dle další je VACV odvozená spíše od viru koňských neštovic. Této teorii nahrává i skutečnost, že v počátcích vakcinace proti neštovicím se používaly právě léze koňských neštovic, jelikož ty kravské se vyskytovaly vzácněji (Symons et al. 2002). Studie příbuznosti genomů na základě sekvenční podobnosti koncových částí genomu orthopoxvirů ukázaly, že VARV je nejvíce příbuzný viru velbloudích neštovic (CMPV) a VACV má blíže k CPV než k VARV (Gubser 2004) (viz Obr. č. 1).



Obr. č. 1: Fylogenetický strom sestavený na základě sekvenčních podobností 12 genů ležících na obou koncích genomu orthopoxvirů. Upraveno dle (Gubser 2004)

Ani po úspěšné eradikaci pravých neštovic zájem o VACV neopadl a i nyní je věnováno značné úsilí přípravě vakcín, které by byly účinnější, způsobovaly méně komplikací, jako

například myokarditidu, post-vakcinační encefalitidu, eczema vaccinatum či generalizovanou vakcínii a nevedly ke kontaktnímu přenosu VACV z očkovaných jedinců na osoby s nimi ve styku (Casey et al. 2005). I když byla hrozba pravých neštovic coby běžně se vyskytující choroby eliminována, zásoby VARV nebyly nikdy zcela zlikvidovány, a přetrvávají tedy obavy, že by VARV mohl být zneužit jako biologická zbraň (Henderson 2014). VARV má k tomuto účelu vhodné vlastnosti – snadno se replikuje, je přenosný vzduchem a jedinci již nakažení jsou silně nakažliví před, v průběhu i po skončení vlastního onemocnění (Molero-Abraham et al. 2015). Nicméně i když pomíneme hrozbu bioterorismu, nelze vyloučit, že by mohla být současná populace znovu vystavena VARV, a to v důsledku rozmrzání permafrostu a starých pohřebišť s oběťmi minulých epidemií neštovic (Stone 2002).

Díky velikosti genomu VACV je možné do neesenčních oblastí genomu vložit heterologní DNA, kterou pak VACV exprimuje (Mackett et al. 1982). Taktéž celý replikační cyklus VACV probíhá v cytoplasmě, což z VACV dělá ideálního kandidáta na vektor pro přípravu vakcín proti celé řadě heterologních infekčních chorob virového, bakteriálního i eukaryotického původu. VACV se také ukázal jako vhodný nástroj pro boj s onkologickými chorobami.

Cílem této práce je podat přehled klinicky využívaných a některých experimentálních vakcín připravených na základě VACV pro vakcinaci lidí.

2 Vakcíny proti pravým neštovicím a heterologním infekčním chorobám

Vakcinace je procedura provozovaná od 18. století a za dobu své existence prošla mnohými proměnami. Se zvyšujícími se nároky na bezpečnost a efektivitu vakcinačních látek mají dnešní vakcíny s těmi původními společného jen málo.

Vývoj vakcín na základě VACV se dá rozdělit do čtyř generací, které budou nyní popsány blíže.

2.1 První generace

V průběhu celosvětové eradikace neštovic byla pro přípravu vakcín používána celá řada kmenů VACV, které byly množeny na kůži živých zvířat jako byly ovce, králíci a hovězí dobytek. Jejich názvy ve většině případů nějakým způsobem odkazovaly na geografické rozšíření jejich používání, místo jejich původu nebo instituce (Sánchez-Sampedro et al. 2015). Nejpoužívanější kmeny pro přehlednost uvedeny v tabulce.

Kmen VACV	Oblast využití
New York City Board of Health (NYCBH)	USA
Lister	Evropa, Asie, Afrika, USA
Bern	Německo, Rakousko
Paris	Francie, Sýrie, Turecko
Copenhagen	Dánsko
Tashkent	SSSR
Ecuador-Moscow 1963 (EM-63)	SSSR
B-15	SSSR
Temple of Heaven (Tian Tan)	Čína
Dairen	Japonsko
Ikeda	Japonsko
Praha	Československo

Tabulka 1: Seznam kmenů VACV využitých při eradikační kampani. Upraveno dle (Sánchez-Sampedro et al. 2015, Kutinová et al. 1996).

Kmeny se od sebe liší především v telomerických oblastech, zatímco centrální část genomu zůstává převážně shodná. Telomerické oblasti se liší především inzercemi/delecemi a drobnějšími přestavbami, na základě čehož byl navržen rekombinační model, který s menšími obměnami vysvětluje vznik většiny kmenů VACV. Také se zdá, že pro většinu kmenů je esenciální zachování genu DVX_212 kódujícího homologu receptoru pro interferon α/β , který viru umožňuje inhibovat funkci hostitelských interferonů a uniknout tak efektivně

protivirové odpovědi. Na základě sekvenčních podobností jednotlivých genomů se dá předpokládat, že se všechny dnes známé kmeny VACV vyvinuly z jednoho předka. Ovšem ani tento rodičovský kmen nebyl zjevně homogenní a množením viru pomocí skarifikace na zvířatech a při jejich transportu do různých částí světa došlo k vývoji jednotlivých kmenů (Li Qin et al. 2015).

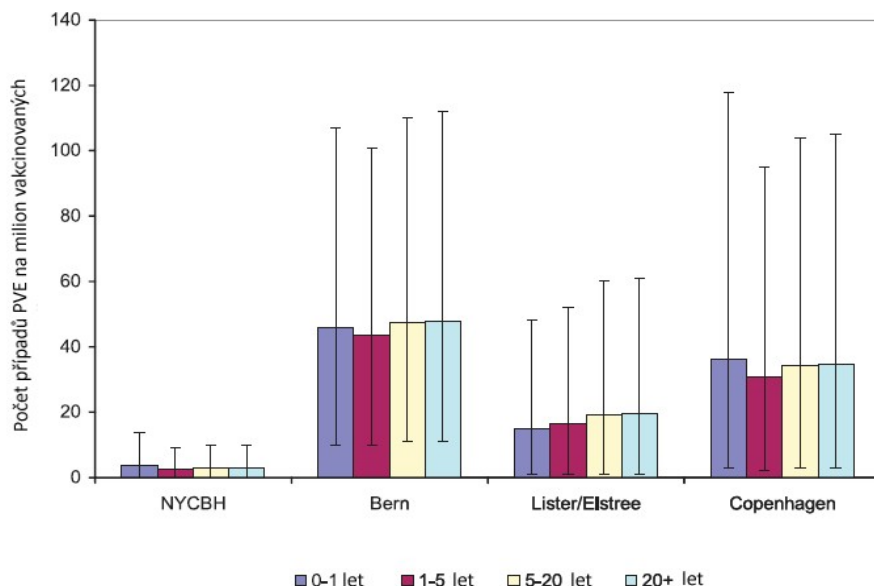
První vakcíny se připravovaly z lymfy živých zvířat infikovaných metodou skarifikace jako v případě Dryvax, kdy byla lymfa odebírána po 22- až 28-násobném pasážování (Rosenthal et al. 2001). Vakcíny tak obsahovaly celou řadu kontaminantů a subtypů viru s odlišnými vlastnostmi. Jen v jedné dávce Dryvax vakcíny vyráběné Wyeth laboratořemi byly nalezeny minimálně 4 různé varianty VACV-NYCBH, které se lišily deletcemi v pravé telomerické oblasti. Dominantním typem viru byly klony podobné ACAM2000 (cca 60%), dále klony podobné Duke viru – virus izolovaný z pacientky diagnostikované s *vaccinia necrosum* - (cca 40%) a konečně méně než 1 % klonů bylo podobných CLONE3 a DPP17 – nově objevený klon v této dávce Dryvax (L. Qin et al. 2011). Jedním z rozdílů mezi těmito klony je stav výše zmíněného genu kódujícího homolog receptoru pro interferon α/β . Tento gen je neporušený v CLONE3, zkrácený v Duke a zcela chybí v ACAM2000, což může být příčinou toho, že CLONE3 je z těchto tří nejvíce patogenní (G. Li et al. 2006). Jelikož se vakcíny připravovaly po celém světě stejným způsobem, není překvapivé, že sekvenace dalších kmenů podaly podobné výsledky (Li Qin et al. 2013, Garcel et al. 2009).

Postup výroby vakcín první generace je z dnešního pohledu nepřijatelný, i když Dryvax vakcína byla použita znovu v roce 2002, kdy v USA došlo k obnovení očkovacího programu proti pravým neštovicím pro vybraný armádní a zdravotnický personál (Poland et al. 2005). Od jejího užívání se s definitivní platností upustilo až na začátku roku 2008, kdy už byla k dispozici vakcína nové generace.

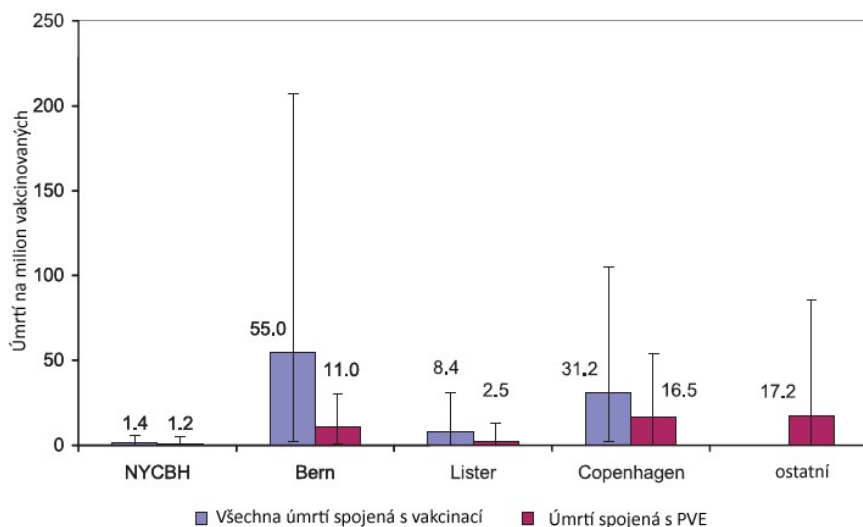
Očkování vakcínami první generace vedlo k celé řadě postvakcinačních komplikací, které byly mnohdy velmi vážné, až končící smrtí. Mezi takové lze zařadit choroby centrálního nervového systému zahrnující post-vakcinační encefalitidu, encefalopatii, neuropatii a demyelinizaci vedoucí ke kómatu, až smrti. Další komplikací je *vaccinia necrosum* (dnes spíše progresivní vakcinie) projevující se horečkou a nekrotizujícími lézemi na různých částech těla, která též může být fatální i přes léčbu specifickým imunoglobulinem proti VACV (Vaccinia IgG, hyperimunní sérum). Komplikací s možnými fatálními důsledky je i eczema vaccinatum. Dále byly časté kožní komplikace jako generalizovaná vakcinie a autoinokulace, které byly často nepříjemné nicméně obvykle neohrožující na životě (Lane et al. 1969). Postvakcinační komplikace se však vztahovaly i na osoby v kontaktu s čerstvě očkovánými. K přenosu docházelo přibližně s incidencí 5,4 na 100 000 vakcinovaných, dle odhadu z dat získaných při vakcinaci členů armády USA a řady dobrovolníků (Wertheimer et al. 2012). Riziko přenosu viru z vakcinované osoby je vysoké především pro lidi trpící ekzémy či

atopickou dermatitidou (AD), kteří jsou z pravidelného očkování vyloučeni. Nebezpečí se ovšem vztahuje i na pacienty s jiným onemocněním kůže jako infekce virem planých neštovic, herpesviry aj. (Lane et al. 1969; Reed et al. 2012). Další vážnější, nově popsanou komplikací je myoperikarditida, jejíž výskyt po vakcinaci je odhadován na 7,8 případů na 100 000 vakcinovaných (Halsell et al. 2003)

Studie zaměřené na výskyt postvakcinační encefalitidy (PVE), ukázaly jasné rozdíly v rizicích spojených s používáním jednotlivých kmenů VACV. Při statistickém zpracování dat a při výpočtu očekávaných komplikací vztažených na 1 milion vakcinovaných vyšlo najevo, že nejbezpečnější vakcíny byly z NYCBH s výskytem PVE 2,9 případů na milion očkovaných, dále Lister s pravděpodobností výskytu 26,2 případů na milion očkovaných, Copenhagen s 33,3 případů a Bern s 44,9 očekávaných případů PVE na milion očkovaných. Podobné tendence byly nalezeny i v případech úmrtí spojených s vakcinací s projevy PVE u dětí bez ohledu na jejich věk. Rozdíly ve vakcinaci různými kmeny byly též ve věku, kdy byla vakcinace nejvíce nebezpečná a kdy se PVE projevovala s nejvyšší četností. U NYCBH byl výskyt PVE nejvyšší před jedním rokem věku, klesl mezi prvním a třetím rokem věku a opětovně vzrostl po třetím roce věku vakcinovaného. U ostatních kmenů je patrný vyšší výskyt PVE s rostoucím věkem. Obecně platilo, že výskyt PVE u revakcinovaných byl v případě všech kmenů nižší (Kretzschmar et al. 2006).



Obr. č. 2: Graf závislosti výskytu PVE na kmenu VACV a věku vakcinovaného. Upraveno dle (Kretzschmar et al. 2006)



Obr. č. 3: Graf závislosti úmrtí na kmenu VACV.

Upraveno dle (Kretzschmar et al. 2006)

2.2 Druhá generace

Jak už bylo výše zmíněno, nestandardizované postupy při přípravě vakcín první generace jsou z dnešního hlediska nepřijatelné. Byly tedy vyvinuty vakcíny druhé generace, které jsou kultivovány na buněčných kulturách.

2.2.1 Vakcíny druhé generace proti pravým neštovicím

Pro přípravu vakcín druhé generace byl v USA použit kmen NYCBH. Byly náhodně vybrány tři tisíce dávek vakcíny Dryvax a vyizolována řada klonů, které byly otestovány ve svých schopnostech vytvářet léze, zarudnutí a v míře neurovirulence (Weltzin et al. 2003). Byl vybrán klon pojmenovaný ACAM1000, který byl v preklinických testech sledován stejně kompetentním v navození ochrany před letálními infekcemi CPV, ECTV a VACV Western Reserve jako rodičovský kmen, a zároveň méně neuroviruletním než původní vakcína Dryvax. Pro výrobu vakcinační látky byl devětkrát pasážován na kultuře lidských plicních fibroblastů (buňkách MRC-5) a vyčištěn ultrafiltrací. Po událostech 11. září 2001 měla firma Acambis vyrobit a dodat 209 milionů vakcín proti pravým neštovicím, které by byly uskladněny pro případ bioteroristického útoku. Aby byli schopni tento požadavek splnit, spojili se s Baxter BioScience, kde byly pro produkci vakcín použity buňky ledvin afrických kočkodanů zelených (Vero buňky) a vakcinační klon byl nazván ACAM2000. Bylo ověřeno, že je sekvenčně shodný s ACAM1000. Fáze I klinických testů ukázala, že ACAM1000 i ACAM2000 jsou dobře přijímané, imunogenní vakcíny doprovázené jen mírnými vedlejšími účinky, které byly většinou spojené s místem inokulace (Monath et al. 2004). Nejčastější nežádoucí účinky, které byly hlášeny i z dalších později provedených klinických testů, byly

svědění v místě vpichu, bolest v lymfatických uzlinách, únava, bolesti hlavy, malátnost. V několika případech i srdeční problémy, které ale nakonec plně odezněly (Frey et al. 2009).

Fáze II klinického zkoušení provedená pro porovnání vakcíny ACAM2000 a Dryvax potvrdila, že navození protilátkové odpovědi je srovnatelné u obou vakcín. Též výskyt nežádoucích účinků byl podobný a komplikace byly shodné s těmi hlášenými z fáze I. Nedošlo k žádnému úmrtí, autoinokulaci, k rozvoji multifornního erythemu, generalizované vakcinie, eczema vaccinatum ani k dalším závažnějším kožním problémům. Nedošlo ani k rozvoji PVE nebo oční infekce. Nicméně tyto komplikace jsou vzácné a studie nebyla dost rozsáhlá na to, aby je odhalila. Jeden subjekt byl diagnostikován s myoperikarditidou, byl ale následně zcela vyléčen (Artenstein et al. 2005). ACAM2000 byl shledán vhodným i ve fázi III klinického testování, a to i bez ohledu na zvýšený výskyt myokarditidy po vakcinaci. V roce 2008 ve Spojených státech oficiálně nahradil vakcínu Dryvax ("CDC | Notice to Readers: Newly Licensed Smallpox Vaccine to Replace Old Smallpox Vaccine" 2008 [online])

Při porovnávání sekvencí ACAM2000 s CLONE3 vyizolovaným z vakcíny Dryvax, byly kromě již zmiňovaného homologu receptoru pro interferon α/β identifikovány další tři geny, jejichž inaktivace má s největší pravděpodobností vliv na sníženou virulenci ACAM2000. Je to ortholog ankyrinů, které jsou v repetičích kódovány v ITR oblastech genomu, a jejichž počet ovlivňuje hostitelské spektrum viru. Dále gen pro thymidin kinázu, který je u CLONE3 o 23 aminokyselin delší než u ACAM2000. A gen pro receptor tumor-nekrotizujícího faktoru- α (TNF- α), který je u ACAM2000 také zkrácen. Dalším receptorem vážícím TNF- α , který byl nalezen u mnoha kmenů VACV je modifikátor cytokinové odpovědi C (CrmC), ve kterém u ACAM2000 chybí jedna doména bohatá na cysteiny, což snižuje jeho afinitu k TNF- α a přispívá k atenuaci (Osborne et al. 2007).

ACAM2000 je v dnešní době jediná licencovaná vakcína proti pravým neštovicím pocházející z druhé generace ("WHO | Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 2015" [online]). Od NYCBH byly odvozeny i další vakcíny, jako CJ-50300, která byla opětovně reprodukována v buňkách MRC-5, ovšem bez purifikace z jednotlivých plaků. Při testech na zdravých dobrovolnících se ukázalo, že je srovnatelná s vakcínami první generace jak v navození protilátkové a buněčné imunitní odpovědi, tak ve vedlejších účincích (Jang et al. 2010).

Byly připraveny i další vakcíny druhé generace, které nebyly připraveny z purifikovaných plaků. Například vakcína RIVM odvozená od kmene Lister byla jen jednou pasážovaná na kultuře buněk z králíčích ledvin. Vakcinace 50 000 indonéských dětí mladších 15ti let ukázala, že úspěšnost očkování touto vakcínou byla srovnatelná s vakcínami první generace (Hekker et al. 1976). Další testovanou vakcínou odvozenou od kmene Lister byla CEP, třikrát pasážovaná v primárních buňkách kuřecích embryí.

V preklinických testech vyšlo najevo, že ochrana při infekci CPV, byla stejně účinná jako u vakcín první generace (Ferrier-Rembert et al. 2007).

2.2.2 Vakcíny druhé generace proti heterologním chorobám

Rekombinantní vakcíny jsou připravovány *in vivo* homologní rekombinací v buňkách infikovaných VACV, do kterých je vpraven vektor s heterologní DNA, která má být virem exprimována. Jedním z genů, který se projevil jako vhodný pro inzerci cizorodé DNA je gen pro thymidin kinázu (TK) nacházející se ve fragmentu *HindIII* F (Panicali and Paoletti 1982). *TK* gen je neesenciální pro replikaci VACV v tkáňových kultúrách, ale jeho vyřazení vede k atenuaci virulence *in vivo* (Buller et al. 1985). Rekombinantní VACV je možné připravit jak z jednotlivých purifikovaných plaků (Kutinová et al. 1996), tak bez purifikace (Poon et al. 2009).

Experimentálních a klinicky využitelných vakcín na bázi druhé generace byla připravena celá řada. Jako příklad může sloužit pentavalentní pandemická vakcína na bázi kmene Wyeth proti viru chřipky A, exprimující geny pro hemagglutinin H5, neuraminidázu N1, nukleoprotein a dva matrixové proteiny. Kromě nich byl přidán ještě gen pro cytokin IL-15, který má funkci silného biologického adjuvans, jelikož výrazně stimuluje imunitní odpověď a snižuje virulenci vektoru. Vakcína se na zvířecím modelu ukázala jako dobře přijímaná a schopná navodit dostatečnou ochranu (Poon et al. 2009). Další vakcíny jsou pro přehled uvedeny v následující tabulce.

Použitý kmen	Infekční choroba
Lister	hepatitida B, horečka Lassa
Wyeth	horečka Lassa, antrax
Copenhagen	vzteklina, lidský cytomegalovirus, spalničky
Western Reserve	malárie, chřipka, HIV/AIDS, Leishmanioza, hepatitida B, vzteklina, antrax, virus japonské encefalitidy, brucelóza, respirační syncyciální virus

Tabulka 2: Seznam experimentálních a preklinicky testovaných vakcín druhé generace proti heterologním chorobám. Upraveno dle (Sánchez-Sampedro et al. 2015)

Vakcíny založené na replikujícím se VACV se sice projeví jako dostatečně účinné, nicméně doprovázené relativně velkým množstvím nežádoucích účinků. Také velká část populace by v případě potřeby nemohla být očkovaná, jelikož kontraindikacemi jsou ekzém či atopická dermatitida v době očkování nebo již prodělaná v minulosti, jakékoli další akutní či chronické kožní problémy zahrnující popáleniny, plané neštovice, opar a lupénku.

Imunosuprese zahrnující HIV/AIDS, leukémii, lymfomy, transplantaci orgánů a další imunosuprese či imunodeficiencie, které jsou kontraindikací očkování jakýmkoliv živým virem. Další kontraindikace zahrnují těhotenství, kojení, alergie na komponenty vakcíny a věk nižší než 1 rok. Kromě posledních tří se tyto kontraindikace vztahují nejen na vakcinovaného, ale i na osoby jemu blízké (Smith-Akin 2003)

2.3 Třetí generace

Vakcíny první i druhé generace se sice prokázaly jako dostatečně imunogenní, nicméně s ohledem na rozšíření atopického ekzému a s navyšujícím se počtem imunokompromitovaných jedinců, by v případě nutné plošné vakcinace nemohlo být vakcinováno asi 25 % populace (Kemper et al. 2002). Dalším faktorem vedoucím k vývoji bezpečnějších vakcín je narůstající počet infikovaných virem opičích neštovic. Tato infekce se projevuje velmi podobně jako infekce VARV, a to především v západní a centrální Africe, kde celou situaci opětovně komplikuje infekce HIV (Parker et al. 2007). Pozornost se tedy přesunula na kmeny, které prodělaly vysoké množství pasážování a byly vzniklými delecemi silně atenuovány.

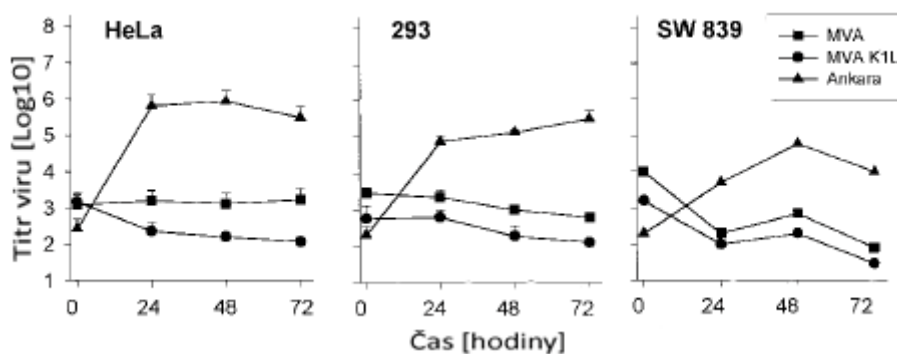
2.3.1 Vakcíny třetí generace proti pravým neštovicím

Vysoce atenuované kmeny použité pro přípravu vakcíny proti pravým neštovicím jsou dva. Nejvíce pozornosti je v poslední době věnováno modifikovanému viru vakcinie Ankara (MVA). MVA byl odvozen od mateřského kmene CVA skrze 574 pasážování na kultuře primárních embryonálních kuřecích fibroblastů (CEF). Už prvních 382 pasáží dalo vzniknout prekurzoru, tzv. CVA382, který obsahuje čtyři velké delece vedoucí k výrazné atenuaci. V dalších 190 pasážích došlo ke vzniku dalších dvou delecí, které ovšem na atenuaci viru nemají významný vliv. MVA je tedy celkově kratší o 31 kbp v porovnání s mateřským kmenem (Meyer et al. 1991). Atenuovaný fenotyp MVA je způsoben nejen delecemi, ale i řadou mutací ve strukturních i imunitní odpověď modulujících genech. Většina genů v koncových oblastech genomu byla deletována, fragmentována nebo zkrácena, jako 14k virulentní faktor, který je z části deletován, nebo inhibitor serinových proteáz-1 (serpin-1), který ovlivňuje hostitelské spektrum a u MVA úplně chybí. Mutace genu *K4L*, jehož produkt je homologem fosfolipázy D, vede k neschopnosti šíření viru mezi buňkami (Antoine et al. 1998). MVA tedy vytváří pouze nezralé viriony, které nejsou schopné opustit primárně infikovanou buňku. V porovnání s mateřským kmenem zůstává titr MVA v lidských buněčných kulturách na nízké hladině, a to bez ohledu na to, zda do ní byl zpětně vsazen gen *K1L* ovlivňující hostitelské spektrum (viz obr. č. 4) (Carroll and Moss 1997).

IMAVUNE/IMVANEX je vakcína připravená z MVA je vyráběna firmou Bavarian Nordic a licencovaná k užití v Evropské unii a Kanadě. Spolu s ACAM2000 je jediná doporučená Světovou zdravotnickou organizací k vakcinaci proti pravým neštovicím ("WHO |

Global Advisory Committee on Vaccine Safety, 2015” [online]). Vakcína sice nebyla vystavena přímé konfrontaci s VARV, ovšem prokázala se jako účinná při navození ochrany proti viru opičích neštovic u makaků (Stittelaar et al. 2005). Při testování na osobách s atopickou dermatitidou (AD) se ukázalo, že IMVAMUNE je schopná indukovat srovnatelnou imunitní odpověď u atopických i zdravých jedinců. Mírné nežádoucí účinky byly pozorovány u 31,8 % subjektů s AD v porovnání s 22,5 % u zdravých subjektů, ale neprokázaly se jako omezující či nebezpečné. A přestože pacienti s diagnostikovanou závažnou AD byli ze studie vyčleněni, není důvod se domnívat, že by vakcína fungovala v jejich případě jinak. Veškeré srdeční potíže vázané na vakcinaci byly spojené se zvýšenou hladinou troponinu I a spontánně odezněly (Greenberg et al. 2015). Vakcína se prokázala jako dostatečně imunogenní a bezpečná i u HIV-pozitivních subjektů s hladinou CD4+ T lymfocytů v rozmezí 200 – 750 buněk/mL, byť titer protilátek byl výrazně nižší než u HIV-negativních jedinců. Vakcinace nevedla k vážným nežádoucím účinkům, k poklesu množství CD4+ T lymfocytů, ani ke zvýšení počtu HIV partikulí v těle pacientů (Overton et al. 2015).

Další silně atenuovaný kmen, který si však stále zachoval schopnost se reprodukovat v savčích buňkách, je LC16m8 odvozený z klonu LC16mO Lister kmene. V porovnání s LC16mO má jen šest bodových mutací, které vedly ke čtyřem aminokyselinovým záměnám, z nichž nejvýraznější je delece guanosinu v genu *B5R* pro obalový protein Env potřebný k rychlému šíření viru, která vytvořila stop kodon a zkrátila tak produkt na 29 % jeho původní délky. V porovnání s vakcínou Dryvax sice vyvolává slabší protilátkovou i IFN- γ odpověď, ale je méně virulentní a stále dostatečně imunogenní (Kennedy et al. 2011; Morikawa et al. 2005). LC16m8 je licencován v Japonsku a prokázal se jako bezpečný při vakcinaci 90 000 dětí mezi léty 1973 až 1976, kdy vakcinace proběhla bez vážných nežádoucích účinků. LC16m8 je též dostatečně imunogenní u imunosuprimovaných myší, což naznačuje, že by mohl být dalším kandidátem na vakcínu pro imunodeficientní osoby (Yokote et al. 2014).



Obr. č. 4: Graf závislosti množství viru na čase ve třech různých lidských buněčných kulturách. Upraveno dle (Carroll and Moss 1997).

2.3.2 Vakcíny třetí generace proti heterologním chorobám

Jak už bylo zmíněno výše, MVA je neschopná reprodukovat se ve většině savčích buněk. Nicméně schopnost exprimovat heterologní geny zůstala zachována, jelikož k bloku v morfogenezi nových virionů a jejich uvolnění z infikované buňky dochází až v posledních krocích celého procesu. Exprese genů tedy probíhá i v savčích buňkách bez problémů a s vysokou účinností, což z MVA spolu s faktem, že je dobře přijímána i imunodeficientními pacienty, dělá ideální vektor pro přípravu vakcín (Sutter and Moss 1992).

MVA byla použita pro přípravu celé řady aktuálně klinicky testovaných vakcín proti HIV. Do genomu MVA byly vloženy geny pro celé, nebo částečně zkrácené HIV proteiny. Pro dostatečnou protilátkovou odpověď je ovšem nutné imunizaci opakovat. Dalším způsobem, jak zvýšit efektivitu vakcinace, je preimunizace DNA vakcínami, které nesou stejné nebo sekvenčně velmi podobné HIV fragmenty jako MVA vakcíny. Tento přístup vedl k navození lepší buněčné imunitní odpovědi než vakcinace pouze MVA, byť opakovaná (Mehendale et al. 2013; Goepfert et al. 2014). Dalším typem jsou MVA vakcíny nesoucí uměle připravené geny jen pro epitopy HIV proteinů typické pro cytolytické a pomocné T lymfocyty. Tato varianta se sice prokázala jako bezpečná, nicméně málo imunogenní, a to i přes použití preimunizace DNA vakcínou (Gorse et al. 2012).

Další nemocí, proti které jsou z MVA vyvíjeny vakcíny, je chřipka typu A. Pozornost byla zaměřena na proteiny, které jsou schopné navodit imunitní odpověď i proti dalším subtypům chřipkového viru. Vakcína připravená z MVA a genu pro hemagglutinin pandemického chřipkového kmene H1N1 A/California/04/2009 se v kulturách lidských imunitních buněk odebraných různě starým jedincům ukázala jako schopná navodit protilátkovou odpověď proti minimálně čtyřem dalším typům viru. Účinnost vakcíny se též ukázala být závislá na věku vakcinovaného, jelikož u buněk odebraných dětem mladším 5ti let nebyla detekována žádná protilátková odpověď, u starších dětí byla odpověď nízká a nejvyšší byla u dospělých (Mullin et al. 2016). Gen pro hemagglutinin nese i další vakcína MVA-H5-sfMR. Tento gen pochází z chřipkového kmene H5N1 A/Vietnam/1194/2007. Vakcína se ukázala jako dobře přijímaná a veškeré mírné vedlejší účinky většinou spojené s místem inokulace do 72 hodin odezněly. Vakcinace byla provedena opakovaně, aby bylo zajištěno dostatečné množství protilátek, při čemž bylo ověřeno, že protilátky proti samotnému vektoru nijak neovlivňují tvorbu protilátek proti chřipkovým antigenům (Kreijtz et al. 2014).

Potenciál MVA jako vektoru se ovšem nevztahuje jen na virová onemocnění. Klinické testy jsou prováděny i s rekombinantními MVA, které nesou bakteriální či eukaryotické geny. Jako příklad může sloužit vakcína MVATG18377 proti tuberkulóze. MVA nesoucí 14 antigenů reprezentujících tři fáze infekce *Mycobacterium tuberculosis*. Jediná imunizace stačila k navození masivní CD4⁺ i CD8⁺ T lymfocytární odpovědi v myších a primátech

(Leung-Theung-Long et al. 2015). Klinicky testovanou vakcínou proti tuberkulóze je MVA85A exprimující antigen Ag85A, která navozuje silnou T lymfocytární odpověď, a to i u HIV pozitivních jedinců podstupujících antiretrovirovou terapii. Ovšem z druhé fáze klinických testů vyšlo najevo, že v kombinaci s dětskou vakcínou Bacillus Calmette-Guérin nenavozuje ochranu proti onemocnění (Tameris et al. 2014). Další heterologní choroby, proti kterým jsou vyvíjeny vakcíny na základě MVA, jsou uvedeny v tabulce.

Infekční onemocnění	Exprimovaný antigen
Klinicky testované	
Hepatitida B	Povrchový antigen (HBsAg)
Hepatitida C	Nestrukturní proteiny NS3, NS4, NS5B
Malárie	TRAP antigen, epitopy různých antigenů, apikální membránový protein (AMA1), povrchový protein merozoita (MSP1), polyprotein z šesti pre-erythrocytických antigenů <i>P. falciparum</i> , protein cirkumsporozoita (CS)
Preklinicky testované	
Hepatitida B	Epitopy typické pro cytotoxické a pomocné T lymfocyty
Hepatitida C	Obalové glykoproteiny E1 a E2, jaderný protein C, p7 protein, nestrukturní proteiny NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5B
Chikungunya	Obalové proteiny E1, E2, E3, protein 6K, kapsidový protein C
Horečka Dengue	Obalové glykoproteiny
Ebola	Obalové glykoproteiny
Krymsko-Konžská hemorragická horečka	Obalový glykoprotein
SARS	Nukleo-kapsidový protein, spike protein
MERS	Spike protein
RSV	Glykoproteiny F, G
Rift valley horečka	Glykoproteiny Gn, Gc
Vzteklina	Glykoprotein
Japonská encefalitida	Membránový protein, obalový protein, epitopy typické pro B lymfocyty, cytotoxické a pomocné T lymfocyty
Spalničky	Hemaglutinin, fúzní protein
Cytomegalovirus	Glykoproteiny B, gH/gL, povrchové proteiny UL55, UL128, UL130, UL131A, jaderný protein UL123/e4, tegumentární proteiny UL83 a pp65
Herpesvirus	Glykoprotein D

Parainfluenza	Glykoproteiny F, HN
Bubonický mor	V antigen <i>Yersenia pestis</i>
Leishmanióza	Homolog receptoru pro aktivovanou C kinázu (LACK), tryparedoxin peroxidáza (TRYP)
Toxoplazmóza	Protein ROP2
Chagasova choroba	TcG2, TcG4 proteiny

Tabulka 3: Klinicky a preklinicky testované vakcíny proti heterologním chorobám na bázi MVA. Upraveno dle (Sánchez-Sampedro et al. 2015)

Byť je MVA v rámci třetí generace věnováno nejvíce pozornosti, i ostatní vysoce atenuované kmeny jsou testovány jako vektory. Již výše zmíněný LC16m8 se ukázal jako schopný exprimovat obalový protein Env lidské T-buněčné leukemie a navodit silnou protilátkovou odpověď v králičím modelu (Shida et al. 1988). Dalším kmenem s deficitní replikací v savčích buňkách, který je ale stále schopen exprimovat heterogenní DNA, je Dairen I kmen (DIs), odvozený od kmene DIE používaného v Japonsku třináctinásobným pasážíváním na kuřecích embryonálních fibroblastech. DIs v porovnání s mateřským kmenem přišel o geny *K1L* a *C7L*, které mají vliv na hostitelské spektrum (Ishii et al. 2002). Rekombinantní DIs exprimující p27 protein z SIV podán intranasálně se v myším modelu ukázal jako schopný navodit silnou protilátkovou odpověď (IgG, IgA, IgM) trvající minimálně rok (Yoshino et al. 2008). Dalšími potenciálními kandidáty na vektory jsou kmeny M65 a M101, které byly odvozené od kmene WR 65 a 101 pasážemi na kultuře buněk Friendovy erythroleukemie (buňky FEL) (Sanchez-Sampedro et al. 2013).

2.4 Čtvrtá generace

U vakcín čtvrté generace byla pozornost zaměřena na geny modulující imunitní odpověď hostitele. Cílem manipulací s těmito geny je dosáhnout vektoru, který by byl stejně bezpečný jako MVA a zároveň více imunogenní, aby tak nebylo nutné imunizaci několikrát opakovat jako je tomu u MVA.

NYVAC je vysoce atenuovaný klon odvozený od kmene Copenhagen, konkrétně z izolátu VC-2. NYVAC byl připraven přesnou delecí osmnácti otevřených čtecích rámců (ORF), které kódují dva enzymy nukleotidového metabolismu – thymidin kinázu a velkou podjednotku ribonukleotid reduktázy, dále virový hemaglutinin, zbytek ORF genu *A26L*, který je zodpovědný za tvorbu inkluzních tělísek typu A (ATI), ORF B13R a B14R kódující inhibitor serinových proteáz a dvanáct ORF od *C7L* až po *K1L* spojených s hostitelským spektrem. (Schematicky znázorněno na obrázku číslo 5.)

NYVAC je silně omezený ve schopnosti se efektivně reprodukovat v lidských či obecně savčích buňkách. Jeho morfogeneze je zablokována již při vzniku nezralých virionů. Zachoval si však schopnost silné exprese heterologních antigenů, což umožňuje vyvolání dostatečně silné imunitní odpovědi a zároveň zamezuje náhodnému přenosu viru z vakcinovaného na subjekty v jeho okolí (Najera et al. 2006, Tartaglia et al. 1992). Infekce lidských buněk tímto virem vede ke změně regulace exprese 368 genů spadajících do šesti odlišných klastrů. Mimo jiné dochází k expresi kaspázy 9 a dalších genů podílejících se na apoptóze. Zvýšená je i produkce faktoru aktivujícího transkripci (ATF-3), fosforylace eukaryotického iniciačního translačního faktoru 2- α a nukleárního faktoru- κ B (NF- κ B), což vede ke zvýšené produkci IL-6. Dále je posílena exprese buněčných adhezivních molekul a molekul podílejících se na modulaci imunitní odpovědi jako ISG15 (gen stimulovaný interferonem) a CD80 (Guerra et al. 2006).

Nejvíce pozornosti při přípravě vakcín z NYVAC je věnováno vakcínám proti HIV. Jedna taková byla připravena z HIV podtypu C (čínského kmene CRF_07) exprimující peptidy Gag, Pol, Env a Nef. U zdravých HIV negativních jedinců vyvolala specifickou T lymfocytární odpověď směřovanou především na Env, ovšem jen u poloviny testovaných (Bart et al. 2008). Imunogenicita byla zvýšena při podání DNA vakcíny před samotnou imunizací pomocí NYVAC. Vakcinace v tomto případě vedla k produkci CD4+ T lymfocytů u všech subjektů a v menší míře CD8+ T lymfocytů. Ovšem protilátková odpověď byla i zde slabá a po 48 týdnech nedetekovatelná, což neodpovídá předpokladu, že účinná vakcína proti HIV by měla vyvolat dostatečné množství specifických T lymfocytů i neutralizačních protilátek (McCormack et al. 2008). Dále byla připravena terapeutická vakcína ze subtypu B, exprimující Env a tripeptid Gag-Pol-Nef. U HIV pozitivních podstupujících antiretrovirovou terapii vyvolala až trojnásobné zvýšení hladiny již existujících CD4+ T lymfocytů, dvojnásobné u CD8+ T lymfocytů, stejně jako výskyt nových T lymfocytů vystavujících nové epitopy (Harari et al. 2012).

Ve srovnání s vakcínami proti HIV na bázi MVA vznikají preferenčně Env specifické CD4+ T lymfocyty, kdežto MVA vyvolává ve srovnatelné míře CD4+ i CD8+ T lymfocytární odpověď. Lymfocyty jsou v případě obou vakcín polyfunkční a exprimují IFN- γ a IL-2 zároveň. Na modelu primátů se ukázalo, že tento přístup nevedl k ochraně před infekcí virem, ale pouze k zastavení progresu nemoci u již nakažených (Mooij et al. 2008). Jelikož se zdá, že vyváženost imunitní odpovědi je vitální pro úspěšný boj s HIV, byla u strategie preimunizace DNA vakcínou následovaná NYVAC nebo MVA vakcínou měřena hladina buněk produkujících IFN- γ a IL-10 reprezentující Th1 a Th2 typ imunitní odpovědi. Hladina IL-10 byla ovšem na rozdíl od IFN- γ nedetekovatelná (Gómez et al. 2007).

Ve snaze optimalizovat imunogenní vlastnosti vakcín NYVAC byl do genomu vrácen dříve deletovaný C7L gen, což vedlo ke zvýšení produkce heterologního antigenu, vyššímu

množství IFN- γ exprimujících buněk i vyváženější odpovědi proti HIV antigenům, kdy specifické T lymfocyty byly cílené rovnoměrně na Env, Gag i tripeptid Gag-Pol-Nef. Přítomnost tohoto genu však neměla žádný vliv na replikaci viru (Nájera et al. 2010). Nepřítomnost tohoto genu vede k apoptóze a jeho navrácením se zvýšila míra atenuace viru (Nájera et al. 2006). Zvýšení exprese cizorodého antigenu bylo dosaženo i v případě, že byly navráceny geny *C7L* i *K1L*. V přítomnosti těchto dvou genů byla viru navrácena schopnost se replikovat v lidských buňkách. Po delecí genu *B19R* kódujícího solubilní vazebný protein pro interferon typu I byl virus stále schopný replikace, nicméně i nadále zůstal atenuovaný srovnatelně s MVA (Kibler et al. 2011).

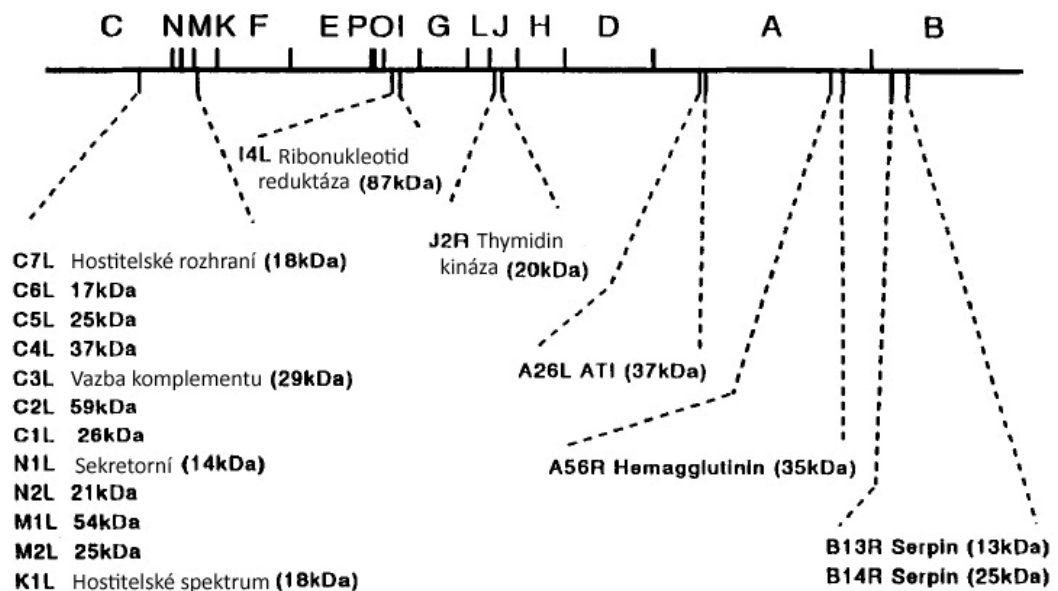
Další infekční onemocnění, proti nimž jsou vyvíjeny vakcíny na bázi NYVAC jsou mezi jinými pseudovzteklina, lidská T buněčná leukémie, malárie a japonská encefalitida. Kromě posledních dvou jmenovaných jsou všechny ve stadiu preklinického či experimentálního vývoje (Sánchez-Sampedro et al. 2015; Kanesa-thasan et al. 2001; Ockenhouse et al. 1998)

Jak již bylo zmíněno výše, MVA je jako vektor sice bezpečná, ale sama o sobě málo imunogenní. Delecemi určitých genů je však možné imunogenicitu zvýšit. Podobně jako u NYVAC, největší pozornost je věnována vakcínám proti HIV. Delecí genu *C12L* kódujícího solubilní receptor pro interleukin 18 bylo dosaženo několikanásobně vyššího počtu specifických CD4⁺ T lymfocytů produkujících TNF- α , IFN- γ , interleukin 2 i specifických CD8⁺ cytotoxických T lymfocytů. Imunitní odpověď byla rovněž širší, v porovnání s původní MVA byl vyšší počet detegovaných epitopů (Falivene et al. 2012). Podobného účinku bylo dosaženo i delecí genu *A41L* kódující receptor pro chemokiny (Clark 2006). Odstranění genu *C6L* rovněž vedlo ke zvýšení počtu CD8⁺ i CD4⁺ T lymfocytů produkujících IFN- γ a IL-2. Jejich specifita byla odlišná od té vyvolané virem bez delece. Delece tohoto genu vede i ke zvýšení exprese genů indukovatelných IFN- γ a IFN- α/β v makrofágách a dendritických buňkách odvozených od monocytů (García-Arriaza et al. 2011).

Delece genu *A35*, jehož produkt *in vitro* inhibuje prezentaci pomocí MHC II molekul, vede k silnému zvýšení produkce specifických IgG protilátek a také ke zvýšení hladiny specifických splenocytů produkujících IFN- γ . Produkt tohoto genu je též zodpovědný za inhibici zvýšení hladiny granulocytů a CD11b⁺ makrofágů vyvolaných infekcí. Nicméně delece tohoto genu neovlivňuje virulenci ani účinnost vektoru, která tak zůstává stejná jako u klasické MVA (Rehm and Roper 2011).

V neposlední řadě inaktivace genu *B15R* kódujícího virový receptor pro pyrogenní interleukin 1 β , který moduluje akutní fázi hostitelské odpovědi na virovou infekci, vede ve zvířecím modelu k zabránění vzniku horečky. Vyšší hladina specifických CD8⁺ T lymfocytů v porovnání s MVA bez delece byla detekována i šest měsíců po imunizaci (Staib et al. 2005).

Optimalizace buněčné imunitní odpovědi lze dosáhnout i volbou specifických promotorů. Například vložení heterologního antigenu pod kontrolu uměle připraveného hybridního okamžitě-časného promotoru vede k expresi antigenu již půl hodiny po infekci buněk, což vede k vyšší hladině CD8+ specifických T lymfocytů. Exprese pod tímto promotorem složeným z pentamerních elementů běžně používaného přirozeného p7.5 promotoru a pozdního elementu promotoru z genu pro ATI však vede k nižší hladině specifických protilátek v porovnání s expresí pod kontrolou dalšího syntetického promotoru pS. Použití uměle sestavených promotorů je tedy dalším způsobem, jak zvýšit imunogenicitu vakcín (Baur et al. 2010).



Obr. č. 5: Schematické znázornění delecí vedoucích ke vzniku NYVAC na podkladu *HindIII* restrikční mapy. Upraveno dle (Tartaglia et al. 1992)

3 Onkolytické vakcíny

V boji proti nádorovým onemocněním je testována celá řada virů jako reoviry, virus vezikulární stomatitidy, adenoviry nebo v neposlední řadě herpes simplex virus (Kim and Thorne 2009).

Virus vakcinie disponuje několika vlastnostmi, které z něj dělají ideálního kandidáta na zbraň proti onkologickým onemocněním. Rychle se replikuje a navozuje lýzi infikovaných buněk. Má široký tropismus k nádorům (Thorne et al. 2007), do nichž je schopný vstoupit a nevyžaduje specifické povrchové receptory pro vstup do buněk, jelikož zralé viriony infikují buňky prostřednictvím makropinocytózy (Mercer and Helenius 2008). Dalším pozitivním faktorem je již zmíněný replikační cyklus probíhající výlučně v cytoplasmě, což zamezuje integraci virové DNA do DNA hostitele. VACV je schopen navodit smrt buněk i jinými cestami než apoptózou, která je rakovinných buňkách často blokována. Konečně proti VACV byla vyvinuta řada antivirových léčiv jako vakciniový imunoglobulin, cidofovir nebo tecovirimat (ST-246). VACV je schopný působit proti nádorům hned několika mechanismy. Masivní replikace viru vede k lýzi rakovinných buněk, vyvolání přirozené i adaptivní imunitní odpovědi a v neposlední řadě je schopen indukovat apoptózu u endoteliálních buněk cévního zásobování tumoru, a tím způsobit jeho rozpad (Kim and Thorne 2009). (Schématicky shrnuto na obrázku číslo 6.)

Jednou z výhod vakcín odvozených od VACV je možnost systémové aplikace viru k nádoru bez nutnosti injikovat virus přímo do nádoru. Komplikace však mohou nastat ve chvíli, kdy má pacient preexistující protilátky proti VACV. I když bylo ve zvířecím modelu potvrzeno, že VACV je schopný indukovat protinádorovou odpověď i přes vysoký titr protilátek (Thorne et al. 2007), může docházet ke snižování efektivity léčby. Použitím virem infikovaných buněk jakožto nosičů, lze tomuto zabránit. Jednou z možností je využití imortalizovaných hematogenních buněk, které se na rozdíl od buněk ze solidních tumorů neakumulují v plicích (Power et al. 2007).

Delecí či přerušením některých genů v genomu VACV lze docílit zvýšení míry replikace v nádorových buňkách v porovnání se zdravými buňkami. Toto je mechanismus, který umožňuje systémovou aplikaci viru, jelikož virus je sice schopen infikovat široké spektrum buněk, ale účinně se replikuje jen v nádorových buňkách. Jedním příkladem takové vakcíny je GLV-1h68 odvozená od kmene Lister vložením tří expresních kazet do genů pro thymidin kinázu, hemaglutinin a do genu *F14.5L*, jehož aktivita zvyšuje virulenci (Zhang et al. 2009). Kazety exprimují β -galaktosidázu, β -glukuronidázu a fúzní protein luciferázy a fluorescenčního proteinu. V porovnání s mateřským kmenem vykazuje výrazně nižší toxicitu, lépe inhibuje růst nádorů a zabraňuje vzniku metastáz. Též míra replikace ve zdravých buňkách je značně nižší než u mateřského kmene (Zhang et al. 2007). Jednou z výhod této vakcíny je zvýšená schopnost replikace v buňkách rakoviny prsu podobných kmenovým

buňkám, které jsou více rezistentní na chemoterapii i ozařování než běžné rakovinné buňky (Wang et al. 2012). Další preklinicky testovanou vakcínou odvozenou od kmene Lister je GLV-2b372, která má vloženu expresní kazetu pro fluorescenční protein TurboFP635 v TK genu, který usnadňuje sledování šíření viru. Tato vakcína se ve zvířecím modelu prokázala jako schopná zredukovat až kompletně odstranit hepatocelulární karcinom, zatímco zdravé tkáně zůstaly neporušeny a nebyl v nich detekován žádný virus již dva týdny po imunizaci (Ady et al. 2015).

Vkládání heterologní DNA do genu pro TK se ukázalo jako spolehlivá metoda pro zvýšení efektivity onkolytických vakcín. VACV s takto přerušným genem je závislá na buněčné thymidin kináze, jejíž exprese je v rakovinných buňkách permanentně zvýšena. Pozitivní vliv na efektivitu onkolytických vakcín však nemá jen delece tohoto genu. Dalším genem, který je deletován ve vakcíně JX-963 odvozené od kmene WR, je gen pro vakciniový růstový faktor (VGF), jehož produkt hraje důležitou roli v autokrinní aktivaci signálních drah a v přípravě sousedních buněk na následující virovou infekci (Thorne et al. 2007). Dalšího zvýšení replikace specificky v nádorových buňkách bylo dosaženo delecí genů kódujících proteiny Serpin-1 a Serpin-2. Tato delece v kombinaci s delecí genů pro thymidin kinázu a VGF zvýšila protinádorovou odpověď, která je čistě lytického charakteru, jelikož stejné účinnosti bylo dosaženo i v imunodeficientních myších (Guo et al. 2005).

Samotná destrukce buněk silnou replikací viru, což je strategie, kterou uplatňují výše uvedené vakcíny, se ovšem ukázala jako nedostačující. K posílení efektivity vakcín jsou tedy do genomu VACV vkládány geny pro modulaci imunitní odpovědi. Jedním takovým je gen pro faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF). Tento gen byl vložen pod syntetický časně-pozdní promotor do genu pro TK jak u již zmiňované vakcíny JX-963, tak u klinicky testované JX-594 (Pexa-Vec) odvozené od kmene Wyeth a dalších preklinicky testovaných vakcín (Thorne et al. 2007; Kim et al. 2006; Deng et al. 2016). GM-CSF stimuluje proliferaci a diferenciaci progenitoru společného pro neutrofile, eozinofile a monocyty, zvyšuje míru exprese MHC II molekul a v neposlední řadě indukuje migraci dendritických buněk. Exprese GM-CSF též vede ke zvýšené míře migrace CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů a tkáňových makrofágů do nádoru (Mastrangelo et al. 1999). Posílení replikace JX-594 v rakovinných buňkách je zapříčiněno aktivací receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR)/Ras signální dráhy a inaktivací dráhy zodpovídající za odpověď interferonů prvního typu (Parato et al. 2012).

Klinické testy s JX-594 na pacientech s hepatocelulárním karcinomem ať už virového či jiného původu ukázaly, že tato vakcína vede kromě jiného k indukci cytotoxických T lymfocytů specifických pro β -galaktosidázu exprimovanou JX-594 a pro vakciniové antigeny. Dále dochází k rozpadu a poškození cévního zásobování tumoru a k indukci nekrózy rakovinných buněk (Heo et al. 2013). U pacientů s karcinomem vyvolaným virem hepatitidy B

(HBV) došlo též ke snížení hladiny virových partikulí v těle. A to jednak díky nekróze nádorových buněk, které jsou zdrojem viru, a jednak díky pravděpodobnému potlačení replikace HBV prostřednictvím cytokinů TNF- α a IFN- γ indukovaných VACV (Liu et al. 2008). I když byla tato vakcína dobře přijímaná – vedlejší účinky spojené s jejím podáním byly omezené na mírné chřipkovité projevy a případnou nevolnost – a navodila nekrózu u přímo injikovaných i neinjikovaných nádorů, nevedla k úplnému vyléčení, pouze k prodloužení života některých testovaných pacientů (Heo et al. 2013; Liu et al. 2008). Podobné výsledky byly získány i z testů na pacientech s nádory plic, melanomy a nádory konečníku a tlustého střeva (Park et al. 2008).

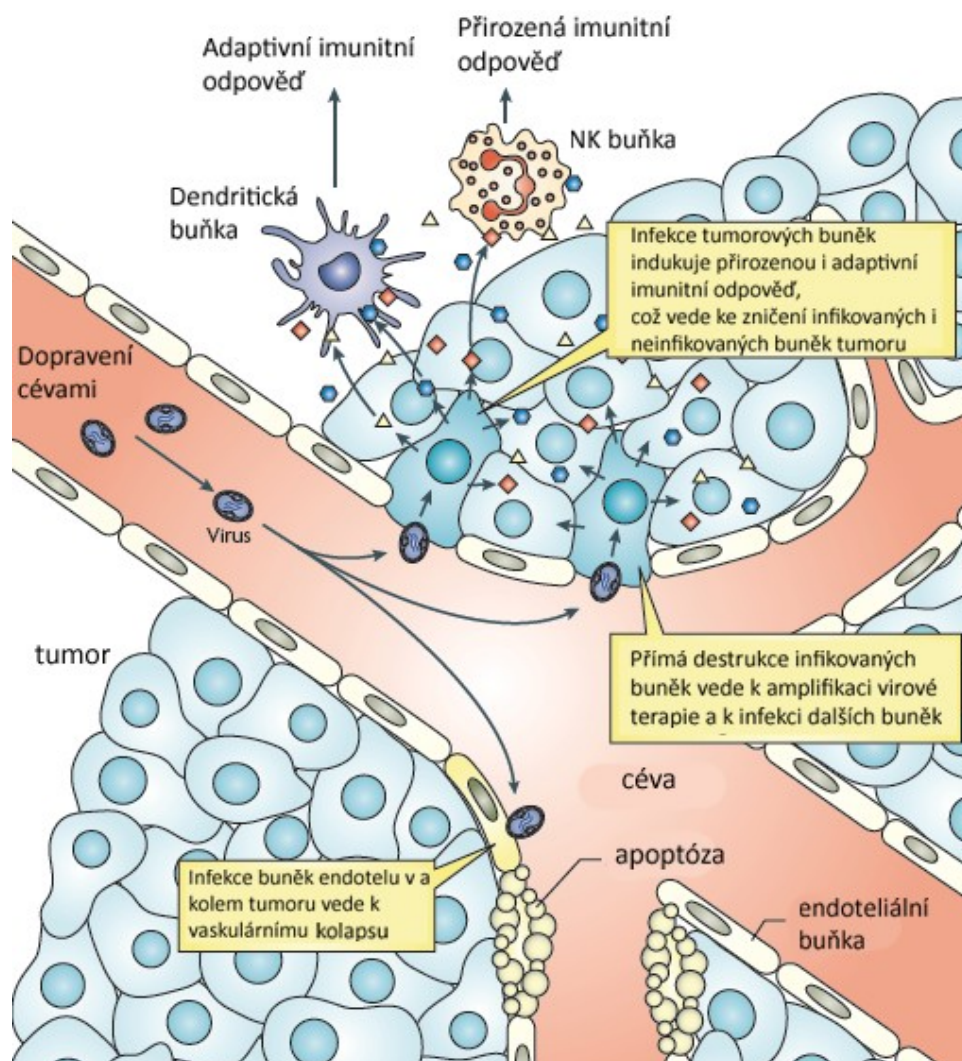
Další vakcínou kombinující delecí či přerušení genů s expresí molekul modulujících imunitní odpověď je tzv. JX-795 odvozená od WR. Gen pro IFN- β byl vložen opět do *TK* genu pod časně-pozdní promotor p7.5, což vede k expresi interferonu až v pozdějších fázích infekce a zvyšuje se pravděpodobnost, že se bude účinně exprimovat jen v rakovinných buňkách. Normální buňky časně po infekci aktivují interferonovou odpověď typu I a znemožní expresi IFN- β . Zvýšené selektivity tumorových buněk a atenuace viru je dosaženo delecí genu *B18R*, kódujícím solubilní homolog receptoru pro IFN typu I. Aplikace této vakcíny vedla ve zvířecím modelu se střevním tumorem k přímé lýzi buněk a indukci specifických cytotoxických T lymfocytů. U zvířat, u nichž došlo ke kompletní destrukci tumoru, byla vytvořena imunitní paměť zamezující opakovanému vytvoření tumoru (Kirn et al. 2007). V rámci tumorů plicního původu se ale mechanismus účinku liší. Vakcína je schopná navodit čistě onkolytickou odpověď, či odpověď závislou na CD8+ T lymfocytech, dle toho od jakých buněk je konkrétní tumor odvozen (Wang et al. 2012).

Molekul modulujících imunitní odpověď testovaných pro zlepšení efektivity onkolytických vakcín je celá řada. Jako další příklad může sloužit chemokin CCL5, jehož exprese vede ke zvýšení míry infiltrace NK buněk, CD4+, cytotoxických CD8+ T lymfocytů a CD11c+ dendritických buněk do prostředí tumoru. Rovněž zlepšuje schopnost viru přetrvat v tumoru i v době, kdy je virus imunitním systémem odklizen ze zbytku tkání (Li et al. 2011). Silná vaskularizace nádorů nabízí další možnost zvýšení efektivity vakcín, a to expresí receptoru pro vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF). Exprese tohoto receptoru vede u zvířecího modelu ke značné redukci velikosti renálních tumorů bez detekované toxicity pro játra (Guse et al. 2010). Dalším proteinem, jehož exprese má potenciál zlepšit protitumorový efekt vakcín je protein morfogeneze kostí (BMP-4) (Duggal et al. 2013).

Všechny výše uvedené onkolytické vakcíny jsou založené na replikujících se kmenech VACV. Trochu odlišná strategie byla použita u vakcíny na bázi MVA s vloženým sebevražedným genem pro fúzní protein odvozený od kvasinkové cytosin deaminázy a uracil fosforibosyltransferázy. Tento fúzní enzym exprimovaný v nádoru přeměňuje netoxickou

látku 5-fluorocystein na toxický 5-fluorouracil a 5-fluorouridin monofosfát, který inhibuje thymidylát syntázu a znemožňuje tím syntézu DNA (Erbs et al. 2008).

Onkolytické vakcíny mohou využívat ještě další strategii, a to expresi antigenů asociovaných s nádory. Jednou pro celou řadu nádorů specifickou povrchovou molekulou je 5T4 onkofetální antigen, který se za normálního stavu vyskytuje v buňkách trofoblastu, nicméně v dospělých zdravých tkáních takřka nikoliv (Southall et al. 1990). Terapeutická vakcína proti rakovině ledvin na bázi MVA exprimující tento antigen nese název TroVax. Klinické testy s touto vakcínou však nepřinesly očekávané výsledky. U pacientů se sice vyvinula vcelku silná protilátková i specifická buněčná odpověď a vakcína byla obecně dobře přijímaná a bezpečná, nicméně prodloužení života pacientů nebylo statisticky významné. Výsledky naznačují, že by léčba mohla být efektivnější při důkladném výběru pacientů s ohledem na celkový stav jejich imunitního systému a mikroprostředí konkrétního nádoru (Amato et al. 2008; Amato et al. 2010).



Obr. č. 6: Mechanismy účinku onkolytických vakcín. (Modré symboly = cytokiny; červené symboly = antigeny; žluté symboly = signály nebezpečí.) Upraveno dle (Kim and Thorne 2009)

4 Závěr

Virus vakcinie stejně jako další zástupci rodu *Orthopoxviridae* měl a stále má nezanedbatelný význam. Není zcela jasné, jak a kdy přesně se tento virus objevil, i když podobnost mezi jednotlivými viry ukazuje na možný vznik z viru kravských a koňských neštovic. Od konce 18. století prodělal VACV řadu změn. A to nejprve díky skarifikaci na živých zvířatech, kde se na změnách v genomu podílel imunitní systém hostitelských zvířat, a později cíleným zasahováním metodami genového inženýrství.

První ze čtyř generací vakcín připravovaná z lymfy infikovaných zvířat umožnila kompletní eradikaci pravých neštovic. Proti pravým neštovicím byly připraveny i vakcíny druhé a třetí generace, které jsou bezpečnější a v případě vakcín třetí generace aplikovatelné i na imunokompromitované jedince.

V genomu VACV se nachází celá řada genů, jejichž produkty interagují s imunitní odpovědí hostitele a modifikují ji. Právě manipulace s těmito geny umožňuje optimalizovat potenciál VACV jakožto vektoru. Mezi tyto geny patří gen pro homolog receptoru pro interferon α/β , thymidin kinázu, receptor pro TNF- α , modifikátor cytokinové odpovědi C, serpiny, homolog fosfolipázy D, hemaglutinin a obecně geny ovlivňující hostitelské spektrum.

Od doby, kdy bylo zjištěno, že VACV je schopen účinně exprimovat cizorodou DNA, byla připravena řada rekombinantních vakcín proti široké škále heterologních infekčních i onkologických onemocnění. Pozornost je věnována především onemocněním, u nichž jsou potíže s přípravou vakcín odvozených přímo od patogenů, které onemocnění způsobují, jako například HIV či virus hepatitidy B. Terapeutické vakcíny pro léčbu onkologických onemocnění pak využívají jak schopnosti VACV se silně replikovat v rakovinných buňkách a způsobovat jejich lýzi, tak stimulovat přirozenou i adaptivní imunitní odpověď.

Rekombinantní vakcíny na bázi VACV se ukázaly jako dobře přijímané a imunogenní. Rovněž preklinická i klinická testování vykazují slibné výsledky, a přestože žádná z rekombinantních vakcín nebyla doposud licencovaná, VACV je slibně se vyvíjejícím prostředkem pro boj s infekčními i onkologickými chorobami.

5 Literatura

- Ady, Justin W., Clark Johnsen, Kelly Mojica, Jacqueline Heffner, Damon Love, Amudhan Pugalenti, Laurence J. Belin, et al. 2015. "Oncolytic Gene Therapy with Recombinant Vaccinia Strain GLV-2b372 Efficiently Kills Hepatocellular Carcinoma." *Surgery* 158 (2): 331–38. doi:10.1016/j.surg.2015.03.044.
- Amato, R. J., R. E. Hawkins, H. L. Kaufman, J. A. Thompson, P. Tomczak, C. Szczylik, M. McDonald, et al. 2010. "Vaccination of Metastatic Renal Cancer Patients with MVA-5T4: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study." *Clinical Cancer Research* 16 (22): 5539–47. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2082.
- Amato, Robert J., Noel Drury, Stuart Naylor, Jaroslaw Jac, Somya Saxena, Amy Cao, Joan Hernandez-McClain, and Richard Harrop. 2008. "Vaccination of Prostate Cancer Patients with Modified Vaccinia Ankara Delivering the Tumor Antigen 5T4 (TroVax): A Phase 2 Trial." *Journal of Immunotherapy* 31 (6): 577–85.
- Antoine, G., F. Scheiflinger, F. Dorner, and F.G. Falkner. 1998. "The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses." *Virology* 244: 365–96.
- Artenstein, Andrew W., Casey Johnson, Thomas C. Marbury, Dennis Morrison, Paul S. Blum, Tracy Kemp, Richard Nichols, John P. Balsler, Michelle Currie, and Thomas P. Monath. 2005. "A Novel, Cell Culture-Derived Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naïve Adults." *Vaccine* 23 (25): 3301–9. doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.079.
- Bart, Pierre-Alexandre, Ruth Goodall, Tristan Barber, Alexandre Harari, Ana Guimaraes-Walker, Mona Khonkarly, Neil C. Sheppard, et al. 2008. "EV01: A Phase I Trial in Healthy HIV Negative Volunteers to Evaluate a Clade C HIV Vaccine, NYVAC-C Undertaken by the EuroVacc Consortium." *Vaccine* 26 (25): 3153–61. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.083.
- Baur, K., K. Brinkmann, M. Schwenecker, J. Patzold, C. Meisinger-Henschel, J. Hermann, R. Steigerwald, P. Chaplin, M. Suter, and J. Hausmann. 2010. "Immediate-Early Expression of a Recombinant Antigen by Modified Vaccinia Virus Ankara Breaks the Immunodominance of Strong Vector-Specific B8R Antigen in Acute and Memory CD8 T-Cell Responses." *Journal of Virology* 84 (17): 8743–52. doi:10.1128/JVI.00604-10.
- Bedson, H. S., and K. R. Dumbell. 1964. "Hybrids Derived from the Viruses of Variola Major and Cowpox." *Journal of Hygiene* 62 (02): 147–58.
- Buller, R Mark L, Geoffrey L. Smith, K Cremer, A L Notkins, and Bernard Moss. 1985. "Decreased Virulence of Recombinant Vaccinia Virus Expression Vectors Is Associated with a Thymidin Kinase-Negative Phenotype." *Nature* 317: 813–15.
- Carroll, Miles W., and Bernard Moss. 1997. "Host Range and Cytopathogenicity of the Highly Attenuated MVA Strain of Vaccinia Virus: Propagation and Generation of Recombinant Viruses in a Nonhuman Mammalian Cell Line." *Virology* 238: 198–211.
- Casey CG, Iskander JK, Roper MH, and et al. 2005. "ADverse Events Associated with Smallpox Vaccination in the United States, January-October 2003." *JAMA* 294 (21): 2734–43. doi:10.1001/jama.294.21.2734.
- Clark, R. H. 2006. "Deletion of Gene A41L Enhances Vaccinia Virus Immunogenicity and Vaccine Efficacy." *Journal of General Virology* 87 (1): 29–38. doi:10.1099/vir.0.81417-0.
- Deng, Lili, Jun Fan, Mingming Guo, and Biao Huang. 2016. "Oncolytic and Immunologic Cancer Therapy with GM-CSF-Armed Vaccinia Virus of Tian Tan Strain Guang9." *Cancer Letters* 372 (2): 251–57. doi:10.1016/j.canlet.2016.01.025.
- Duggal, Rohit, Ulrike Geissinger, Qian Zhang, Jason Aguilar, Nanhai G. Chen, Elena Binda, Angelo L. Vescovi, and Aladar A. Szalay. 2013. "Vaccinia Virus Expressing Bone Morphogenetic Protein-4 in Novel Glioblastoma Orthotopic Models Facilitates Enhanced Tumor Regression and Long-Term Survival." *Journal of Translational Medicine* 11 (1): 155.

- Erbs, P., A. Findeli, J. Kintz, P. Cordier, C. Hoffmann, M. Geist, and J. M. Balloul. 2008. "Modified Vaccinia Virus Ankara as a Vector for Suicide Gene Therapy." *Cancer Gene Therapy* 15 (1): 18–28.
- Falivene, Juliana, María Paula Del Médico Zajac, María Fernanda Pascutti, Ana María Rodríguez, Cynthia Maeto, Beatriz Perdiguero, Carmen E. Gómez, Mariano Esteban, Gabriela Calamante, and María Magdalena Gherardi. 2012. "Improving the MVA Vaccine Potential by Deleting the Viral Gene Coding for the IL-18 Binding Protein." Edited by Adriano Boasso. *PLoS ONE* 7 (2): e32220. doi:10.1371/journal.pone.0032220.
- Ferrier-Rembert, Audrey, Robert Drillien, Bernard Meignier, Daniel Garin, and Jean-Marc Crance. 2007. "Safety, Immunogenicity and Protective Efficacy in Mice of a New Cell-Cultured Lister Smallpox Vaccine Candidate." *Vaccine* 25 (49): 8290–97. doi:10.1016/j.vaccine.2007.09.050.
- Frey, Sharon E., Frances K. Newman, Jeffrey S. Kennedy, Francis Ennis, Getahun Abate, Daniel F. Hoft, and Thomas P. Monath. 2009. "Comparison of the Safety and Immunogenicity of ACAM1000, ACAM2000 and Dryvax® in Healthy Vaccinia-Naive Adults." *Vaccine* 27 (10): 1637–44. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.079.
- Garcel, Aude, Julien Perino, Jean-Marc Crance, Robert Drillien, Daniel Garin, and Anne-Laure Favier. 2009. "Phenotypic and Genetic Diversity of the Traditional Lister Smallpox Vaccine." *Vaccine* 27 (5): 708–17. doi:10.1016/j.vaccine.2008.11.063.
- García-Arriaza, Juan, José Luis Nájera, Carmen E. Gómez, Nolawit Tewabe, Carlos Oscar S. Sorzano, Thierry Calandra, Thierry Roger, and Mariano Esteban. 2011. "A Candidate HIV/AIDS Vaccine (MVA-B) Lacking Vaccinia Virus Gene C6L Enhances Memory HIV-1-Specific T-Cell Responses." Edited by Maciej S. Lesniak. *PLoS ONE* 6 (8): e24244. doi:10.1371/journal.pone.0024244.
- Goepfert, P. A., M. L. Elizaga, K. Seaton, G. D. Tomaras, D. C. Montefiori, A. Sato, J. Hural, et al. 2014. "Specificity and 6-Month Durability of Immune Responses Induced by DNA and Recombinant Modified Vaccinia Ankara Vaccines Expressing HIV-1 Virus-Like Particles." *Journal of Infectious Diseases* 210 (1): 99–110. doi:10.1093/infdis/jiu003.
- Gómez, Carmen Elena, Jose Luis Nájera, Eva Pérez Jiménez, Victoria Jiménez, Ralf Wagner, Marcus Graf, Marie-Joelle Frachette, Peter Liljeström, Giuseppe Pantaleo, and Mariano Esteban. 2007. "Head-to-Head Comparison on the Immunogenicity of Two HIV/AIDS Vaccine Candidates Based on the Attenuated Poxvirus Strains MVA and NYVAC Co-Expressing in a Single Locus the HIV-1BX08 gp120 and HIV-1IIIB Gag-Pol-Nef Proteins of Clade B." *Vaccine* 25 (15): 2863–85. doi:10.1016/j.vaccine.2006.09.090.
- Gorse, G. J., M. J. Newman, A. deCamp, C. M. Hay, S. C. De Rosa, E. Noonan, B. D. Livingston, et al. 2012. "DNA and Modified Vaccinia Virus Ankara Vaccines Encoding Multiple Cytotoxic and Helper T-Lymphocyte Epitopes of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Are Safe but Weakly Immunogenic in HIV-1-Uninfected, Vaccinia Virus-Naive Adults." *Clinical and Vaccine Immunology* 19 (5): 649–58. doi:10.1128/CVI.00038-12.
- Greenberg, Richard N, Yadira Hurley, Dinh V. Dinh, Serena Mraz, Javier Gomez Vera, Dorothea von Bredow, Alfred von Krempelhuber, et al. 2015. "A Multicenter, Open-Label, Controlled Phase II Study to Evaluate Safety and Immunogenicity of MVA Smallpox Vaccine (IMVAMUNE) in 18–40 Year Old Subjects with Diagnosed Atopic Dermatitis." Edited by David Joseph Diemert. *PLOS ONE* 10 (10): e0138348. doi:10.1371/journal.pone.0138348.
- Gubser, C. 2004. "Poxvirus Genomes: A Phylogenetic Analysis." *Journal of General Virology* 85 (1): 105–17. doi:10.1099/vir.0.19565-0.
- Guerra, S., L. A. Lopez-Fernandez, A. Pascual-Montano, J. L. Najera, A. Zaballos, and M. Esteban. 2006. "Host Response to the Attenuated Poxvirus Vector NYVAC: Upregulation of Apoptotic Genes and NF- B-Responsive Genes in Infected HeLa Cells." *Journal of Virology* 80 (2): 985–98. doi:10.1128/JVI.80.2.985-998.2006.

- Guo, Z. S. 2005. "The Enhanced Tumor Selectivity of an Oncolytic Vaccinia Lacking the Host Range and Antiapoptosis Genes SPI-1 and SPI-2." *Cancer Research* 65 (21): 9991–98. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-1630.
- Guse, K., M. Sloniecka, I. Diaconu, K. Ottolino-Perry, N. Tang, C. Ng, F. Le Boeuf, et al. 2010. "Antiangiogenic Arming of an Oncolytic Vaccinia Virus Enhances Antitumor Efficacy in Renal Cell Cancer Models." *Journal of Virology* 84 (2): 856–66. doi:10.1128/JVI.00692-09.
- Halsell, Jeffrey S., James R. Riddle, J. Edwin Atwood, Pierce Gardner, Robert Shope, Gregory A. Poland, Gregory C. Gray, et al. 2003. "Myopericarditis Following Smallpox Vaccination Among Vaccinia-Naive US Military Personnel." *JAMA* 289 (24): 3283–89.
- Harari, Alexandre, Virginie Rozot, Matthias Cavassini, Felicitas Bellutti Enders, Selena Viganò, Gonzalo Tapia, Erika Castro, et al. 2012. "NYVAC Immunization Induces Polyfunctional HIV-Specific T-Cell Responses in Chronically-Infected, ART-Treated HIV Patients: Clinical Immunology." *European Journal of Immunology* 42 (11): 3038–48. doi:10.1002/eji.201242696.
- Hekker, A. C., J. M. Bos, N. Kumara Rai, J. Keja, G. Cuboni, B. Emmet, and J. Djalins. 1976. "Large-Scale Use of Freeze-Dried Smallpox Vaccine Prepared in Primary Cultures of Rabbit Kidney Cells." *Bulletin of the World Health Organization* 54 (3): 279.
- Henderson, D. A. 2014. "John Bartlett and Bioterrorism." *Clinical Infectious Diseases* 59 (suppl 2): S76–79. doi:10.1093/cid/ciu393.
- Heo, Jeong, Tony Reid, Leyo Ruo, Caroline J Breitbach, Steven Rose, Mark Bloomston, Mong Cho, et al. 2013. "Randomized Dose-Finding Clinical Trial of Oncolytic Immunotherapeutic Vaccinia JX-594 in Liver Cancer." *Nature Medicine* 19 (3): 329–36. doi:10.1038/nm.3089.
- Ishii, Koji, Yoshiaki Ueda, Kazuhiro Matsuo, Yoshiharu Matsuura, Takashi Kitamura, Kenzo Kato, Yasuyuki Izumi, et al. 2002. "Structural Analysis of Vaccinia Virus DIs Strain: Application as a New Replication-Deficient Viral Vector." *Virology* 302 (2): 433–44. doi:10.1006/viro.2002.1622.
- ⁱ*Jacobs, Bertram L., Jeffrey O. Langland, Karen V. Kibler, Karen L. Denzler, Stacy D. White, Susan A. Holechek, Shukmei Wong, Trung Huynh, and Carole R. Baskin. 2009. "Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and Future." *Antiviral Research* 84 (1): 1–13. doi:10.1016/j.antiviral.2009.06.006.
- Jang, Hee-Chang, Choong Jong Kim, Kye Hyoung Kim, Kwang-Hee Lee, Young-Ho Byun, Baik-Lin Seong, Giulietta Saletti, et al. 2010. "A Randomized, Double-Blind, Controlled Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of CJ-50300, a Newly Developed Cell Culture-Derived Smallpox Vaccine, in Healthy Volunteers." *Vaccine* 28 (36): 5845–49. doi:10.1016/j.vaccine.2010.06.063.
- Kanesa-athan, Niranjana, John J Smucny, Charles H Hoke, Donald H Marks, Eiji Konishi, Ichiro Kurane, Douglas B Tang, David W Vaughn, Peter W Mason, and Robert E Shope. 2001. "Safety and Immunogenicity of NYVAC-JEV and ALVAC-JEV Attenuated Recombinant Japanese Encephalitis Virus Δ Poxvirus Vaccines in Vaccinia-Nonimmune and Vaccinia-Immune Humans." *Vaccine* 19: 483–91.
- Kemper, Alex R., Matthew M. Davis, and Gary L Freed. 2002. "Expected Adverse Events in a Mass Smallpox Vaccination Campaign." *Effective Clinical Practice* 5 (2): 84–90.
- Kennedy, J. S., M. Gurwith, C. L. Dekker, S. E. Frey, K. M. Edwards, J. Kenner, M. Lock, et al. 2011. "Safety and Immunogenicity of LC16m8, an Attenuated Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive Adults." *Journal of Infectious Diseases* 204 (9): 1395–1402. doi:10.1093/infdis/jir527.
- Kibler, Karen V., Carmen E. Gomez, Beatriz Perdiguero, Shukmei Wong, Trung Huynh, Susan Holechek, William Arndt, et al. 2011. "Improved NYVAC-Based Vaccine Vectors." *PLoS One* 6 (11): e25674.
- Kim, J, J Oh, B Park, D Lee, J Kim, H Park, M Roh, J Je, J Yoon, and S Thorne. 2006. "Systemic Armed Oncolytic and Immunologic Therapy for Cancer with JX-594, a Targeted Poxvirus Expressing GM-CSF." *Molecular Therapy* 14 (3): 361–70. doi:10.1016/j.ymthe.2006.05.008.

- *Kirn, David H., and Steve H. Thorne. 2009. "Targeted and Armed Oncolytic Poxviruses: A Novel Multi-Mechanistic Therapeutic Class for Cancer." *Nature Reviews Cancer* 9 (1): 64–71.
- Kirn, David H., Yaohe Wang, Fabrice Le Boeuf, John Bell, and Steve H. Thorne. 2007. "Targeting of Interferon-Beta to Produce a Specific, Multi-Mechanistic Oncolytic Vaccinia Virus." *PLoS Med* 4 (12): e353.
- Kreijtz, Joost HCM, Marco Goeijenbier, Fleur M. Moesker, Lennert van den Dries, Simone Goeijenbier, Heidi LM De Gruyter, Michael H. Lehmann, et al. 2014. "Safety and Immunogenicity of a Modified-Vaccinia-Virus-Ankara-Based Influenza A H5N1 Vaccine: A Randomised, Double-Blind Phase 1/2a Clinical Trial." *The Lancet Infectious Diseases* 14 (12): 1196–1207.
- Kretzschmar, Mirjam, Jacco Wallinga, Peter Teunis, Shuqin Xing, and Rafael Mikolajczyk. 2006. "Frequency of Adverse Events after Vaccination with Different Vaccinia Strains." Edited by Mark Slifka. *PLoS Medicine* 3 (8): e272. doi:10.1371/journal.pmed.0030272.
- Kutinová, Luda, Viera Ludvíková, Jitka Kryštofová, Marie Otavová, Věra Simonová, Šárka Němečková, Petr Hainz, and Vladimír Vonka. 1996. "Influence of the Parental Virus Strain on the Virulence and Immunogenicity of Recombinant Vaccinia Viruses Expressing HBV preS2-S Protein or VZV Glycoprotein I." *Vaccine* 14 (11): 1045–52.
- Lane, R., Ruben, Neff, and Millar. 1969. "Complication of Smallpox Vaccination, 1968." *New England Journal of Medicine* 281 (22): 1201–8.
- Leung-Theung-Long, Stéphane, Marie Gouanvic, Charles-Antoine Coupet, Aurélie Ray, Emmanuel Tupin, Nathalie Silvestre, Jean-Baptiste Marchand, et al. 2015. "A Novel MVA-Based Multiphasic Vaccine for Prevention or Treatment of Tuberculosis Induces Broad and Multifunctional Cell-Mediated Immunity in Mice and Primates." Edited by Angelo A. Izzo. *PLOS ONE* 10 (11): e0143552. doi:10.1371/journal.pone.0143552.
- Li, Guiyun, Nanhai Chen, Zehua Feng, R. Mark L. Buller, John Osborne, Tiara Harms, Inger Damon, Chris Upton, and David J. Esteban. 2006. "Genomic Sequence and Analysis of a Vaccinia Virus Isolate from a Patient with a Smallpox Vaccine-Related Complication." *Virology Journal* 3 (1): 88.
- Li, Jun, Mark O'Malley, Julie Urban, Padma Sampath, Z Sheng Guo, Pawel Kalinski, Steve H Thorne, and David L Bartlett. 2011. "Chemokine Expression From Oncolytic Vaccinia Virus Enhances Vaccine Therapies of Cancer." *Molecular Therapy* 19 (4): 650–57. doi:10.1038/mt.2010.312.
- Liu, Ta-Chiang, Taeho Hwang, Byeong-Ho Park, John Bell, and David H Kirn. 2008. "The Targeted Oncolytic Poxvirus JX-594 Demonstrates Antitumoral, Antivascular, and Anti-HBV Activities in Patients With Hepatocellular Carcinoma." *Molecular Therapy* 16 (9): 1637–42. doi:10.1038/mt.2008.143.
- Mackett, M, G L Smith, and B Moss. 1982. "Vaccinia Virus: A Selectable Eukaryotic Cloning and Expression Vector." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (23): 7415–19.
- Mastrangelo, Michael J., Henry C. Maguire, Laurence C. Eisenlohr, Carol E. Laughlin, Claude E. Monken, Peter A. McCue, Albert J. Kovatich, and Edmund C. Lattime. 1999. "Intratumoral Recombinant GM-CSF-Encoding Virus as Gene Therapy in Patients with Cutaneous Melanoma." *Cancer Gene Therapy* 6 (5). <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&profile=ehost&scope=site&authype=crawler&jrnl=09291903&AN=8822790&h=cfNoT0R0ovofv2pT%2Bn1GyGawKMrh8z2iZw8oOb6%2Ff9DirkXLPiJzquxjDVKR3yrPkS2V%2FrOFoi8PVxhLXvf2Fw%3D%3D&crl=c>.
- McCormack, Sheena, Wolfgang Stöhr, Tristan Barber, Pierre-Alexandre Bart, Alexandre Harari, Christiane Moog, Donatella Ciuffreda, et al. 2008. "EV02: A Phase I Trial to Compare the Safety and Immunogenicity of HIV DNA-C Prime-NYVAC-C Boost to NYVAC-C Alone." *Vaccine* 26 (25): 3162–74. doi:10.1016/j.vaccine.2008.02.072.
- Mehendale, Sanjay, Madhuri Thakar, Seema Sahay, Makesh Kumar, Ashwini Shete, Pattabiraman Sathyamurthi, Amita Verma, et al. 2013. "Safety and Immunogenicity of

- DNA and MVA HIV-1 Subtype C Vaccine Prime-Boost Regimens: A Phase I Randomised Trial in HIV-Uninfected Indian Volunteers." Edited by Thomas L. Richie. *PLoS ONE* 8 (2): e55831. doi:10.1371/journal.pone.0055831.
- Mercer, Jason, and Ari Helenius. 2008. "Vaccinia Virus Uses Macropinocytosis and Apoptotic Mimicry to Enter Host Cells." *Science* 320: 531–35.
- Meyer, H., G. Sutter, and A. Mayr. 1991. "Mapping of Deletions in the Genome of the Highly Attenuated Vaccinia Virus MVA and Their Influence on Virulence." *Journal of General Virology* 72 (5): 1031–38.
- Molero-Abraham, Magdalena, John-Paul Glutting, Darren R. Flower, Esther M. Lafuente, and Pedro A. Reche. 2015. "EPIPOX: Immunoinformatic Characterization of the Shared T-Cell Epitome between Variola Virus and Related Pathogenic Orthopoxviruses." *Journal of Immunology Research* 2015: 1–11. doi:10.1155/2015/738020.
- Monath, Thomas P., Joseph R. Caldwell, Wolfgang Mundt, Joan Fusco, Casey S. Johnson, Mark Buller, Jian Liu, et al. 2004. "ACAM2000 Clonal Vero Cell Culture Vaccinia Virus (New York City Board of Health Strain) – a Second-Generation Smallpox Vaccine for Biological Defense." *International Journal of Infectious Diseases* 8 (October): 31–44. doi:10.1016/j.ijid.2004.09.002.
- Mooij, P., S. S. Balla-Jhagjhoorsingh, G. Koopman, N. Beenhakker, P. van Haaften, I. Baak, I. G. Nieuwenhuis, et al. 2008. "Differential CD4+ versus CD8+ T-Cell Responses Elicited by Different Poxvirus-Based Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccine Candidates Provide Comparable Efficacies in Primates." *Journal of Virology* 82 (6): 2975–88. doi:10.1128/JVI.02216-07.
- Morikawa, S., T. Sakiyama, H. Hasegawa, M. Saijo, A. Maeda, I. Kurane, G. Maeno, et al. 2005. "An Attenuated LC16m8 Smallpox Vaccine: Analysis of Full-Genome Sequence and Induction of Immune Protection." *Journal of Virology* 79 (18): 11873–91. doi:10.1128/JVI.79.18.11873-11891.2005.
- Mullin, Jennifer, Muhammed S. Ahmed, Ravi Sharma, Navdeep Upile, Helen Beer, Priya Achar, Suttida Puksuriwong, et al. 2016. "Activation of Cross-Reactive Mucosal T and B Cell Responses in Human Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue in Vitro by Modified Vaccinia Ankara-Vectored Influenza Vaccines." *Vaccine* 34 (14): 1688–95. doi:10.1016/j.vaccine.2016.02.028.
- Najera, J. L., C. E. Gomez, E. Domingo-Gil, M. M. Gherardi, and M. Esteban. 2006. "Cellular and Biochemical Differences between Two Attenuated Poxvirus Vaccine Candidates (MVA and NYVAC) and Role of the C7L Gene." *Journal of Virology* 80 (12): 6033–47. doi:10.1128/JVI.02108-05.
- Nájera, José Luis, Carmen Elena Gómez, Juan García-Arriaza, Carlos Oscar Sorzano, and Mariano Esteban. 2010. "Insertion of Vaccinia Virus C7L Host Range Gene into NYVAC-B Genome Potentiates Immune Responses against HIV-1 Antigens." Edited by Maciej Lesniak. *PLoS ONE* 5 (6): e11406. doi:10.1371/journal.pone.0011406.
- "Notice to Readers: Newly Licensed Smallpox Vaccine to Replace Old Smallpox Vaccine." 2016. Accessed March 24. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5708a6.htm>.
- Ockenhouse, Christian F., Pei-fang Sun, David E. Lanar, Bruce T. Wellde, B. Ted Hall, Kent Kester, Jose A. Stoute, et al. 1998. "Phase I/IIa Safety, Immunogenicity, and Efficacy Trial of NYVAC-Pf7, a Pox-Vectored, Multiantigen, Multistage Vaccine Candidate for Plasmodium Falciparum Malaria." *Journal of Infectious Diseases* 177 (6): 1664–73.
- Osborne, John D., Melissa Da Silva, A. Michael Frace, Scott A. Sammons, Melissa Olsen-Rasmussen, Chris Upton, R. Mark L. Buller, et al. 2007. "Genomic Differences of Vaccinia Virus Clones from Dryvax Smallpox Vaccine: The Dryvax-like ACAM2000 and the Mouse Neurovirulent Clone-3." *Vaccine* 25 (52): 8807–32. doi:10.1016/j.vaccine.2007.10.040.
- Overton, E. T., J. Stapleton, I. Frank, S. Hassler, P. A. Goepfert, D. Barker, E. Wagner, et al. 2015. "Safety and Immunogenicity of Modified Vaccinia Ankara-Bavarian Nordic Smallpox Vaccine in Vaccinia-Naive and Experienced Human Immunodeficiency

- Virus-Infected Individuals: An Open-Label, Controlled Clinical Phase II Trial.” *Open Forum Infectious Diseases* 2 (2): ofv040–ofv040. doi:10.1093/ofid/ofv040.
- Panicali, Dennis, and Enzo Paoletti. 1982. “Construction of Poxviruses as Cloning Vectors: Insertion of the Thymidine Kinase Gene from Herpes Simplex Virus into the DNA of Infectious Vaccinia Virus.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79 (16): 4927–31.
- Parato, Kelley A, Caroline J Breitbach, Fabrice Le Boeuf, Jiahu Wang, Chris Storbeck, Carolina Ilkow, Jean-Simon Diallo, et al. 2012. “The Oncolytic Poxvirus JX-594 Selectively Replicates in and Destroys Cancer Cells Driven by Genetic Pathways Commonly Activated in Cancers.” *Molecular Therapy* 20 (4): 749–58. doi:10.1038/mt.2011.276.
- Park, Byeong-Ho, Taeho Hwang, Ta-Chiang Liu, Daniel Y Sze, Jae-Seok Kim, Hyuk-Chan Kwon, Sung Yong Oh, et al. 2008. “Use of a Targeted Oncolytic Poxvirus, JX-594, in Patients with Refractory Primary or Metastatic Liver Cancer: A Phase I Trial.” *Lancet Oncology* 9: 533–42.
- Parker, Scott, Anthony Nuara, R Mark L Buller, and Denise A Schultz. 2007. “Human Monkeypox: An Emerging Zoonotic Disease.” *Future Microbiology* 2 (1): 17–34. doi:10.2217/17460913.2.1.17.
- Poland, G, J Grabenstein, and J Neff. 2005. “The US Smallpox Vaccination Program: A Review of a Large Modern Era Smallpox Vaccination Implementation Program.” *Vaccine* 23 (17-18): 2078–81. doi:10.1016/j.vaccine.2005.01.012.
- Poon, L. L. M., Y. H. C. Leung, J. M. Nicholls, P.-Y. Perera, J. H. Lichy, M. Yamamoto, T. A. Waldmann, J. S. M. Peiris, and L. P. Perera. 2009. “Vaccinia Virus-Based Multivalent H5N1 Avian Influenza Vaccines Adjuvanted with IL-15 Confer Sterile Cross-Clade Protection in Mice.” *The Journal of Immunology* 182 (5): 3063–71. doi:10.4049/jimmunol.0803467.
- Power, Anthony T, Jiahu Wang, Theresa J Falls, Jennifer M Paterson, Kelley A Parato, Brian D Lichty, David F Stojdl, Peter A J Forsyth, Harry Atkins, and John C Bell. 2007. “Carrier Cell-Based Delivery of an Oncolytic Virus Circumvents Antiviral Immunity.” *Molecular Therapy* 15 (1): 123–30. doi:10.1038/sj.mt.6300039.
- Qin, Li, Nicole Favis, Jakub Famulski, and David H. Evans. 2015. “Evolution of and Evolutionary Relationships between Extant Vaccinia Virus Strains.” Edited by G. McFadden. *Journal of Virology* 89 (3): 1809–24. doi:10.1128/JVI.02797-14.
- Qin, Li, Min Liang, and David H. Evans. 2013. “Genomic Analysis of Vaccinia Virus Strain TianTan Provides New Insights into the Evolution and Evolutionary Relationships between Orthopoxviruses.” *Virology* 442 (1): 59–66. doi:10.1016/j.virol.2013.03.025.
- Qin, L., C. Upton, B. Hazes, and D. H. Evans. 2011. “Genomic Analysis of the Vaccinia Virus Strain Variants Found in Dryvax Vaccine.” *Journal of Virology* 85 (24): 13049–60. doi:10.1128/JVI.05779-11.
- Reed, J. L., D. E. Scott, and M. Bray. 2012. “Eczema Vaccinatum.” *Clinical Infectious Diseases* 54 (6): 832–40. doi:10.1093/cid/cir952.
- Rehm, Kristina E., and Rachel L. Roper. 2011. “Deletion of the A35 Gene from Modified Vaccinia Virus Ankara Increases Immunogenicity and Isotype Switching.” *Vaccine* 29 (17): 3276–83. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.023.
- Rosenthal, Steven R., Michael Merchlinsky, Cynthia Kleppinger, and Karen L. Goldenthal. 2001. “Developing New Smallpox Vaccines.” *Emerging Infectious Diseases* 7 (6): 920.
- Sanchez-Sampedro, L., C. E. Gomez, E. Mejias-Perez, E. Perez-Jimenez, J. C. Oliveros, and M. Esteban. 2013. “Attenuated and Replication-Competent Vaccinia Virus Strains M65 and M101 with Distinct Biology and Immunogenicity as Potential Vaccine Candidates against Pathogens.” *Journal of Virology* 87 (12): 6955–74. doi:10.1128/JVI.03013-12.
- *Sánchez-Sampedro, Lucas, Beatriz Perdiguero, Ernesto Mejías-Pérez, Juan García-Arriaza, Mauro Di Pilato, and Mariano Esteban. 2015. “The Evolution of Poxvirus Vaccines.” *Viruses* 7 (4): 1726–1803. doi:10.3390/v7041726.

- Shida, H., Y. Hinuma, M. Hatanaka, M. Morita, M. Kidokoro, K. Suzuki, T. Maruyama, F. Takahashi-Nishimaki, M. Sugimoto, and R. Kitamura. 1988. "Effects and Virulences of Recombinant Vaccinia Viruses Derived from Attenuated Strains That Express the Human T-Cell Leukemia Virus Type I Envelope Gene." *Journal of Virology* 62 (12): 4474–80.
- Smith-Akin, Kay C. 2003. "Recommendations for Using Smallpox Vaccine in a Pre-Event Vaccination Program - Supplemental Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC)." RR-7. MMWR. CDC.
- Southall, P. J., G. M. Boxer, K. D. Bagshawe, N. Hole, M. Bromley, and P. L. Stern. 1990. "Immunohistological Distribution of 5T4 Antigen in Normal and Malignant Tissues." *British Journal of Cancer* 61 (1): 89.
- Staib, C. 2005. "Inactivation of the Viral Interleukin 1 Receptor Improves CD8+ T-Cell Memory Responses Elicited upon Immunization with Modified Vaccinia Virus Ankara." *Journal of General Virology* 86 (7): 1997–2006. doi:10.1099/vir.0.80646-0.
- Stittelaar, K. J., G. van Amerongen, I. Kondova, T. Kuiken, R. F. van Lavieren, F. H. M. Pistor, H. G. M. Niesters, et al. 2005. "Modified Vaccinia Virus Ankara Protects Macaques against Respiratory Challenge with Monkeypox Virus." *Journal of Virology* 79 (12): 7845–51. doi:10.1128/JVI.79.12.7845-7851.2005.
- Stone, Richard. 2002. "Is Live Smallpox Lurking in the Arctic?" *Science* 295 (5562): 2002–2002. doi:10.1126/science.295.5562.2002.
- Sutter, Gerd, and Bernard Moss. 1992. "Nonreplicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Recombinant Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89 (22): 10847–51.
- Symons, Julian A., David C. Tschärke, Nicola Price, and Geoffrey L. Smith. 2002. "A Study of the Vaccinia Virus Interferon- γ Receptor and Its Contribution to Virus Virulence." *Journal of General Virology* 83 (8): 1953–64.
- Tameris, Michele, Hennie Geldenhuys, Angelique KanyKany Luabeya, Erica Smit, Jane E. Hughes, Samantha Vermaak, Willem A. Hanekom, et al. 2014. "The Candidate TB Vaccine, MVA85A, Induces Highly Durable Th1 Responses." Edited by Anil Kumar Tyagi. *PLoS ONE* 9 (2): e87340. doi:10.1371/journal.pone.0087340.
- Tartaglia, James, Marion E. Perkus, Jill Taylor, Elizabeth K. Norton, Jean-Christophe Audonnet, William I. Cox, Stephen W. Davis, et al. 1992. "NYVAC: A Highly Attenuated Strain of Vaccinia Virus." *Virology* 188: 217–32.
- Thorne, Steve H., Tae-Ho H. Hwang, William E. O’Gorman, David L. Bartlett, Shizuko Sei, Femina Kanji, Christopher Brown, et al. 2007. "Rational Strain Selection and Engineering Creates a Broad-Spectrum, Systemically Effective Oncolytic Poxvirus, JX-963." *Journal of Clinical Investigation* 117 (11): 3350–58. doi:10.1172/JCI32727.
- Wang, Huiqiang, Nanhai G. Chen, Boris R. Minev, and Aladar A. Szalay. 2012. "Oncolytic Vaccinia Virus GLV-1h68 Strain Shows Enhanced Replication in Human Breast Cancer Stem-like Cells in Comparison to Breast Cancer Cells." *J Transl Med* 10: 167.
- Wang, Liang-Chuan S, Rachel C Lynn, GuanJun Cheng, Edward Alexander, Veena Kapoor, Edmund K Moon, Jing Sun, et al. 2012. "Treating Tumors With a Vaccinia Virus Expressing IFN β Illustrates the Complex Relationships Between Oncolytic Ability and Immunogenicity." *Molecular Therapy* 20 (4): 736–48. doi:10.1038/mt.2011.228.
- Weltzin, Richard, Jian Liu, Konstantin V Pugachev, Gwendolyn A Myers, Brie Coughlin, Paul S. Blum, Richard Nichols, et al. 2003. "Clonal Vaccinia Virus Grown in Cell Culture as a New Smallpox Vaccine." *Nature Medicine* 9 (9): 1125–30.
- Wertheimer, Ellen R., Denise S. Olive, John F. Brundage, and Leslie L. Clark. 2012. "Contact Transmission of Vaccinia Virus from Smallpox Vaccinees in the United States, 2003–2011." *Vaccine* 30 (6): 985–88. doi:10.1016/j.vaccine.2011.12.049.
- "WHO | Global Advisory Committee on Vaccine Safety,
2–3 December 2015." 2016. WHO. Accessed March 28. http://www.who.int/vaccine_safety/committee/reports/Dec_2015/en/.

- Yokote, H., Y. Shinmura, T. Kanehara, S. Maruno, M. Kuranaga, H. Matsui, and S. Hashizume. 2014. "Safety of Attenuated Smallpox Vaccine LC16m8 in Immunodeficient Mice." *Clinical and Vaccine Immunology* 21 (9): 1261–66. doi:10.1128/CVI.00199-14.
- Yoshino, N., M. Kanekiyo, Y. Hagiwara, T. Okamura, K. Someya, K. Matsuo, Y. Ami, S. Sato, N. Yamamoto, and M. Honda. 2008. "Mucosal Administration of Completely Non-Replicative Vaccinia Virus Recombinant Dairen I Strain Elicits Effective Mucosal and Systemic Immunity." *Scandinavian Journal of Immunology* 68 (5): 476–83. doi:10.1111/j.1365-3083.2008.02168.x.
- Zhang, Qian, Chunguang Liang, Yong A. Yu, Nanhai Chen, Thomas Dandekar, and Aladar A. Szalay. 2009. "The Highly Attenuated Oncolytic Recombinant Vaccinia Virus GLV-1h68: Comparative Genomic Features and the Contribution of F14.5L Inactivation." *Molecular Genetics and Genomics* 282 (4): 417–35. doi:10.1007/s00438-009-0475-1.
- Zhang, Q., Y. A. Yu, E. Wang, N. Chen, R. L. Danner, P. J. Munson, F. M. Marincola, and A. A. Szalay. 2007. "Eradication of Solid Human Breast Tumors in Nude Mice with an Intravenously Injected Light-Emitting Oncolytic Vaccinia Virus." *Cancer Research* 67 (20): 10038–46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0146.

ⁱ* Sekundární citace